

Matériel et méthodes

I. Synthèse des carrelages

Matériel:

- Bétol 52T
- Métakaolin (Argical M1000)
- Dioxyde de titane (anatase 25nm)
- eau
- pastilles de soude
- spatule
- béciers en plastiques (et non en verre car notre solution est très basique)
- contenants en plastique avec couvercle
- balance et balance de précision
- moules (en silicone de préférence)
- contenant hermétique pour séchage
- parafilm

Composition du Bétol 52T et de l'argical M1000 :

Matière première	Composition	% massique
Bétol 52T	SiO ₂	30.2
	Na ₂ O	14.7
	H ₂ O	55.1
Métakaolin Argical M1000	SiO ₂	54.4
	Al ₂ O ₃	38.4
	TiO ₂	1.6
	Fe ₂ O ₃	1.27
	K ₂ O	0.62
	CaO ₂	0.1

On réalise des carrelages suivant les proportions molaires suivantes :

- $SiO_2/Al_2O_3 = 3.8$
- $Na_2O/H_2O = 11.5$
- $Na_2O/Al_2O_3 = 1$

On ajoute suivant le protocole, 0, 5, 10 ou 15% de la masse de métakaolin en titane.

On calcule les masses de chaque produit avec le tableau suivant :

1	SiO2/Al2O3	3,8	Masses Molaires			à remplir
2	Na2O/H2O	11,5	SiO2	60,08		mcalc (g)
3	Na2O/Al2O3	1	Na2O	61,98		n (mol)
4			Al2O3	101,96		m tot el (g)
5	mMK(g)	180	H2O	18,01		
6			NaOH	39,997		
7	Proportions :					
8	BETOL 52T		ARGICAL M1000			
9	SiO2	0,302	SiO2	0,544		
10	Na2O	0,147	Al2O3	0,384		
11	H2O	0,551				
12						
13	m Al2O3	69,12	nAl2O3	0,67791291		
14	mSiO2	154,770228324833	nSiO2	2,57606901		
15	mBETOL	189,500761082777				
16	mNa2Otot	42,017041977246	nNa2o	0,67791291		
17	mNa2O betol	27,8566118791682				
18	m Na2O manquante	14,1604300980778				
19	m NaOH	18,2760478422981	nNaOH	0,45693541		
20	mH2OTOT	140,405931737937				
21	mH2O BETOL	104,41491935661				
22	mH2O NAOH	4,11470387328786	M totale			
23	mH2O à aj	31,8763085080391	419,653117433114			
24						

Méthode:

On manipule avec des gants.

1. Solution d'activation:

On mélange les comprimés de soude dans l'eau dans un bécher en plastique. On ajoute le Bétol 52T et on continue d'agiter à la spatule (pas d'agitateur magnétique) jusqu'à ce que ce soit homogène. Le fluide est relativement visqueux et très basique (pH \approx 12). On transvase dans un pot et on ferme bien le couvercle. On laisse reposer (au moins) 24h avant la suite.

2. Synthèse du carrelage

Attention bien mettre des gants, des lunettes et manipuler sous hotte car le titane est très volatil.

On pèse le métakaolin dans les béchers en plastique à l'aide de la balance (masse définie grâce au tableau). On ajoute le dioxyde de titane avec la balance de précision (masse souvent très faible).

Enfin on ajoute la masse nécessaire de solution d'activation (balance) et on mélange bien à l'aide de spatules. Il faut qu'il n'y ait pas de grumeaux.

3. Moulage

On coule les carrelages dans les moules. On enlève les bulles d'air qui se forment pour avoir une surface bien plane et éviter des trous qui pourraient favoriser l'accrochage des bactéries. On place les moules dans un contenant hermétique que l'on scelle à l'aide de parafilm.

4. Démoulage

Au de quelques jours de séchage, les carrelages étaient prêts à être démoulés. Une fois démoulés, nous notions les pourcentages en titane sur chaque carrelage puis nous laissons ces derniers une semaine à l'air libre avant de commencer chaque manipulation. Ce dernier séchage permettait d'avoir une surface bien sèche suite à l'évaporation des dernières gouttes d'eau.

5. Remarques sur la synthèse

Lors de notre première synthèse de carrelages, nous avons utilisé des boîtes de pétri à la fois comme moules et comme enceinte hermétique, or le démoulage était difficile et créait des microfissures dans les carrelages. Nous sommes donc passés à l'utilisation de moules en silicone. Nous en avons profité pour réduire la taille de nos échantillons afin que ces derniers puissent rentrer dans des tubes Falcon de 50mL ce qui facilitait les manipulations avec les bactéries.

II. Mesures du pH

Matériel :

- des tubes falcon 50mL
- Un pH-mètre
- Échantillons de carrelage pour chaque concentration en titane

Protocole :

Les carrelages sont immergés dans de l'eau à hauteur dans des tubes falcons. Les tubes sont laissés quelques minutes le temps que le pH se stabilise et que le relargage possible ait lieu afin d'obtenir la mesure la plus précise du pH. Ensuite ce dernier est mesuré à l'aide du pH-mètre. Les tubes sont vidés puis remplis à nouveau. On y laisse les carrelage une semaine avant de réitérer la mesure selon le même protocole.

Remarques :

Cette mesure, nous ne l'avons faite que sur deux semaines car nous avons récupéré un pH-mètre seulement à la fin des PSE. Cependant, nous avons fait une simple mesure au papier pH selon le même protocole pendant plusieurs semaines et nous avons remarqué que l'eau dans laquelle était plongée les carrelages devenait moins basique après 4 à 5 semaines. Cette mesure n'est cependant pas précise car le papier pH donnait une précision à l'unité seulement. Nous avons décidé de ne conserver que les valeurs au pH-mètre pour nos interprétations.

À partir d'ici toutes les manipulations qui impliquent des bactéries sont à réaliser sous hotte stérile à flux laminaire.

III. Premier test avec des bactéries

Préambule :

Au tout début du projet scientifique, nous n'avions aucune idée de comment nous y prendre afin de tester la résistance aux bactéries du matériau. Nous avons tenté une première expérience qui ne s'est pas avérée intéressante mais qui nous a mis sur la piste d'autres expériences plus complètes.

Matériel :

- Boîtes de pétri stériles
- Solution de bactéries Overnight (= saturée) de E.coli MG1655
- Carrelages avec les différentes proportions de TiO₂
- Parafilm

Protocole :

Un carrelage de chaque pourcentage de dioxyde de titane a été placé dans une boîte de pétri stérile. 10mL d'overnight ont ensuite été versés sur le carrelage lui même puis chaque boîte de pétri a été fermée hermétiquement à l'aide parafilm. Les boîtes ont été laissées pendant 24h. Au bout de 24h les carrelages ont pu être observés au microscope.

Remarques :

- On trouvait que c'était plus représentatif de ce qui arrivait à une surface carrelée (=pas de liquide par dessus en temps normal), mais comme on travaillait avec des souches pures de bactéries et pas avec un cocktail de microorganismes, elles ne se développaient pas, et en plus on avait pas vraiment d'idée pour les quantifier après.
- Cette expérience pose un problème d'interprétation aussi puisque comme on n'a pas mis de milieu de culture on ne peut pas dire si les bactéries ne se développent pas à cause de notre carrelage ou à cause de l'absence de

nutriments. En effet on utilisait directement la solution saturée de bactéries telle quelle sans la diluer au préalable.

IV. Deuxième expérience avec des bactéries : test en bulk

Préambule

Suite à la première expérience, nous nous sommes rendus compte qu'il était important de pouvoir mesurer nos résultats quantitativement. Pour cela nous avons mis au point des tests en bulk, c'est-à-dire en immersion. Ainsi, grâce à une mesure de densité optique il est possible de déterminer la proportion de bactéries. Il est ici nécessaire d'avoir des témoins positifs et négatifs car les mesures de densité optique nous donnent une valeur de l'état de notre solution, plus elle est limpide moins il y a de bactéries et inversement. Si l'on veut pouvoir conclure sur les valeurs il faut les comparer à quelque chose ici la logique veut que l'on compare au milieu nutritif et à la solution diluée mais sans carrelage, là où les bactéries ont pu se développer comme elles le souhaitaient.

Matériel :

- Contenants hermétiques et stérilisables (passage à l'autoclave) ou stériles
- Solution de nutriments pour les bactéries (Lb Broth)
- Solution overnight de bactéries E.Coli MG1655
- Carrelages aux différentes proportions de titane stérilisés par passage à l'autoclave
- Hotte stérile pour manipuler (hotte avec champ laminaire)
- Pipettes et micropipettes

Protocole :

Les carrelages sont stérilisés à l'autoclave pour être sûrs qu'il n'y a rien qui puisse s'y développer en dehors de nos bactéries utilisées pour l'expérience. Les contenants utilisés sont aussi stériles ou stérilisés. La manipulation s'effectue entièrement sous hotte à champ laminaire pour éviter toute source de contamination possible.

Pour commencer, la solution d'overnight est diluée par 100 à l'aide de la solution de LB broth préparée par nos soins et passée à l'autoclave. Ensuite, les carrelages sont placés dans des contenants hermétiques et une quantité X de solution diluée de bactéries est déposée dans chaque contenant afin de recouvrir le carrelage, nous avons aussi un contenant sans carrelage qui sert de témoin, contrôle positif. Les contenants sont scellés à l'aide de parafilm et placés à l'étuve à 37°C sous agitation pendant 24H.

Une fois les 24H passées, des échantillons de chaque contenant sont prélevés et des mesures de densité optique sont effectuées.

Remarques :

- Lors de nos premières expériences nous avons réitéré cette manipulation avec des carrelages déjà utilisés, toutes les semaines afin de voir l'évolution de la résistance aux bactéries en fonction du nombre d'exposition à ces dernières.
- La quantité X prélevée a évolué au cours du projet puisque nous avons changé la taille des carrelages et donc des contenants jusqu'à utiliser uniquement des Falcons de 50mL dans lesquels les carrelages étaient placés dès le passage à l'autoclave.
- Lorsque la densité optique mesurée était supérieure à 1, nous effectuions une dilution par 2 voire par 10 du prélèvement.
- Le témoin négatif était la solution de LB Broth sans bactéries qui servait aussi à étalonner le spectrophotomètre.
- Nous avons fini par obtenir 3 réplicats techniques et 3 réplicats biologiques grâce à l'utilisation de moules en silicone qui nous permettaient d'obtenir des petits carrelages et de mieux contrôler leur taille.
- On a finalement préféré réduire le temps d'incubation à ~20h car sinon tous les échantillons étaient saturés et donc on devait tous les diluer.

V. Biofilms

Préambule

Les tests en bulk réalisés étaient difficilement comparables, de notre point de vue, à des situations dans la vie réelle. En effet, il est plus que probable que le genre de bactéries que l'on retrouve à la surface de nos carrelages soient des biofilms et non des suspensions de bactéries qui meurent grâce au relargage d'ions basiques dans le milieu de culture.

Matériel :

- boîte 6/12/24 puits dont certains puits sont occupés par notre géopolymère
- overnight de E.Coli MG1655
- overnight de pseudomonas fluorescent
- milieu de culture (LB Broth adapté aux deux souches de bactéries)
- parafilm
- micropipettes et micro pipeteur

Protocole :

Une couche de solution overnight non diluée est déposée dans les puits de manière à pouvoir recouvrir la surface. La quantité déposée dépend du nombre de puits de la boîte. La boîte est fermée puis placée à l'étuve SANS AGITATION pendant 1H30. Une fois cette période passée, on enlève l'excédent de liquide dans chaque puits. On dépose ensuite X mL de solution cette fois diluée par 100 (diluée par du milieu de culture) de bactéries dans chaque puits, sauf un puits contenant du carrelage qui sert de témoin dans lequel on dépose la même quantité de milieu de culture seul. Nous gardons aussi si possible quelques puits sans carrelage dans lesquels nous déposons X mL de la solution diluée par 100. Cette fois, la boîte est fermée hermétiquement puis placée à l'étuve toujours SANS AGITATION pendant 48h.

Au bout de 48h il ne nous reste qu'à observer.

Remarques :

- Pour cette manipulation, nous utilisons des boîtes X trous dans lesquelles nous avons préalablement coulé des carrelages selon le protocole décrit au tout début mis à part le fait que tout est manipulé sous hotte pour garder la stérilité des boîtes. Ce qui est important c'est qu'ici nous avons un nombre de réplicats biologiques importants.
- Nous avons commencé nos essais avec E.Coli mais cela ne donnait rien, nous n'obtenions pas de biofilms donc nous ne pouvons pas conclure. Nous avons décidé d'utiliser pseudomonas fluorescens qui nous a bien donné des biofilms.

VI. Caractérisation des biofilms

Préambule

Nous voulions mettre en place une manière de caractériser, principalement nos biofilms qualitativement dans un premier lieu puis quantitativement si possible. Le problème ici était que nos carrelages étaient opaques. Nous avons trouvé dans des articles l'idée d'utiliser du Cristal Violet qui est un colorant qui semblait répandu dans la mise en évidence de biofilms. Nous avons donc voulu tester si il colorait ou non notre carrelage.

Le cristal violet est soupçonné d'être cancérigène, tout doit être manipulé avec gants, lunettes, blouse et sous hotte. Tout ce qui a été en contact avec ce produit est jeté dans une poubelle CMR.

Matériel :

- cristal violet
- un ou deux carreaux de carrelage peu importe la concentration en titane

- eau distillée
- boîte de petri

Protocole :

Le cristal violet est dilué à 0.2% dans de l'eau distillée puis il est déposé sur un carrelage pendant 2 minutes avant d'être rincé deux fois à l'eau distillée.

Remarques :

- À 0.2% le cristal violet est trop concentré et colore notre carrelage. Nous avons donc fait d'autres essais en diluant encore plus ce dernier mais même en s'éloignant beaucoup de la concentration permettant la mise en évidence de bactéries, notre carrelage devenait violet.
- Nous aurions peut-être dû chercher un autre colorant puisque le cristal violet chargé + réagit de manière attractive avec le carrelage chargé -.
- Si on avait voulu voir du matériel vivant (la plupart des colorants sont cytotoxiques), il faut utiliser un microscope à fluorescence avec des bactéries qui fluorescent déjà. Il n'y avait pas de microscope à fluorescence fonctionnel en salle de PSE au moment de l'expérience.