

Matériel et méthode

I Culture des bactéries

1 Production du milieu de culture :

Nous avons fixé un milieu de culture propice au développement de *Acetobacter* :

- 50 g/L de glucose, (CAS 50-99-7)
- 5 g/L d'extrait de levure, (CAS 8013 01 2)
- 5 g/L (NH₄)₂SO₄, (CAS 7783 20 2)
- 3 g/L KH₂PO₄, (CAS 7778-77-0)
- 0.05g/L MgSO₄·7H₂O (CAS 10034-99-8)

La solution obtenue est ensuite filtrée sous hotte laminaire grâce à une unité de filtration sous vide "*Millipore® Stericup™ filter units*". Le diamètre des pores utilisées est de 0.22 µm. Elle était ensuite stockée au réfrigérateur dans des tubes Falcon 50mL stériles ou dans les contenants de 500mL fournis avec l'unité de filtration.

2 Insémination du milieu de culture

Afin de limiter l'influence des éléments initialement présents dans la boisson, nous avons procédé par dilutions successives :

Nous avons prélevé un morceau de cellulose (~ 1cm³) provenant d'une plaque de cellulose de Kamboucha, chargée de bactéries, fournie par l'étudiant en architecture avec qui nous avons travaillé.

Puis nous avons placé ce morceau dans un erlenmeyer/bécher, préalablement lavé à l'éthanol, contenant du milieu de culture (200 mL) et un antifongique (50 µg/mL de cycloheximide, CAS 66-81-9) .

Le récipient contenant milieu+bactéries était mis à l'étuve à 29°C pendant une semaine.

Au bout d'une semaine, une nouvelle dilution était effectuée à partir de la peau nouvellement formée. Le processus global était répété au moins 2 fois ce qui permet une dilution importante des molécules initialement présentes dans le thé. Pour des raisons de répétabilité, chaque expérience utilisait des bactéries issues d'un repiquage de l'expérience précédente afin de se placer dans la phase de multiplication exponentielle des bactéries et donc assurer une constance de leur métabolisme.

3 Comptage des bactéries

Afin d'assurer la reproductibilité de nos expériences, la connaissance de la concentration en bactéries de nos milieux était essentielle. La présence de cellulose ne garantissant pas l'exactitude d'une détermination par turbidimétrie, nous avons utilisé une cellule de Malassez. Pour cela, nous procédions à une dilution d'un facteur 10 et appliquions le protocole type pour l'utilisation de ces cellules.¹

II Production de cellulose

1 Formation libre de la cellulose

Une boîte de Pétri stérile est remplie de milieu de culture inséminé (cf I-) et placée sans couvercle à l'étuve à 29°C pour une à 2 semaines (selon expérience). Les concentrations en bactéries utilisées étaient de 13 à 18 millions de bactéries par mL.

De plus grandes surfaces de cellulose ont pu être obtenues dans des bacs en plexiglas de 10x10x4cm usinés à l'atelier. Dans ces cuves, une quantité de 300 à 400mL de milieu de culture inséminé était nécessaire.

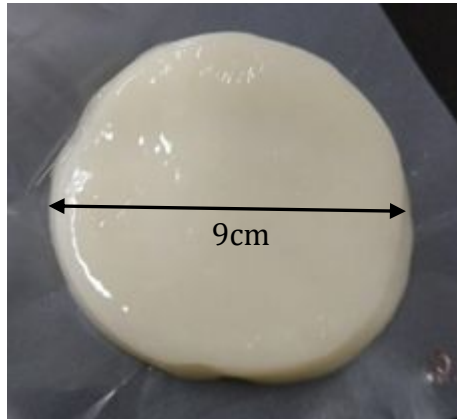


Figure 1 Cellulose obtenue dans une boîte Pétri



Figure 2 Cuve utilisée

2 Formation dirigée

Dans l'optique d'une utilisation en architecture, nous avons ensuite exploré la possibilité de former de la cellulose sur une structure préexistante. Pour cela, nous avons utilisé les cuves présentées en figure 2 et des cadres spécialement usinés pour l'occasion, percés de trous de diamètre inférieur à 1mm et espacés de 2mm (figure 3). Ces cadres nous ont ainsi permis de former des maillages de taille variable à l'aide de fil de coton (figure 4 et 5).

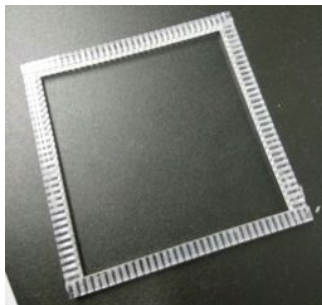


Figure 3 Cadre utilisé

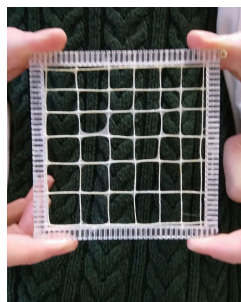


Figure 4 Cadre gros maillage

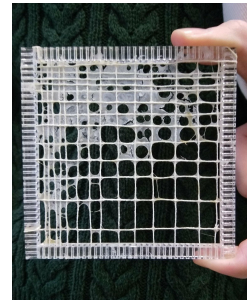


Figure 5 Maillage variable avec cellulose

Enfin, une tentative sur des cadres à 2 dimensions a été réalisée. Une structure en fil de soudure sur laquelle a été déposé un maillage en coton a été immergée dans un bêcher contenant du milieu de culture inséminé.



Figure 6 Structure après 2 semaines d'immersion

Sur les cadres en PVC nous avons fait des maillages en coton. Plusieurs maillages avec des espacements différents entre les fils (2 mm à 1 cm d'écart). Puis nous avons lancé 4 bacs dans le but d'affiner nos conditions de culture :

- Un bac à l'étuve avec un gradient de petit maillage (allant régulièrement de 2mm à 6mm d'écart entre les fils)
 - Un bac à l'étuve grand gradient (8mm à 1,2cm)
 - Un bac petit gradient hors de l'étuve
 - Un bac petit gradient hors de l'étuve avec un bulleur type bulleur d'aquarium réglé de façon à faire des bulles de très petites tailles.
- Tous les bacs ont été recouverts de parafilm percé de trous de diamètre 1mm afin de limiter la contamination.

Cela nous a permis différentes comparaisons:

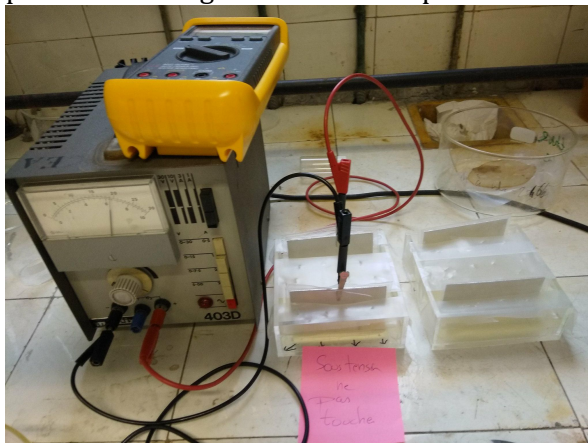
- Le petit et le grand gradient servaient à déterminer l'espace optimal entre 2 fils de coton
- Les bacs petit gradient dans l'étuve, en dehors, et en dehors avec bulleur servaient à savoir s'il fallait mieux oxygéner ou contrôler la température le milieu puisque les deux n'étaient pas compatibles en première approche (le bulleur ne pouvant pas être alimenté dans l'étuve).

Nous avons par la suite abandonné l'usage du bulleur, les vibrations induites semblant perturber la formation de cellulose dans le milieu.

3 Cellulose modifiée par la présence d'un champ électrique

Nous avons ensuite tenté de modifier les propriétés mécaniques de la cellulose formée en appliquant un champ électrique au cours de la production.

Selon la littérature, quand on place *Acetobacter xylinum* dans un milieu ionique (le notre étant quasiment celui employé dans l'article de référence), et que l'on soumet ces bactéries à un champ électrique, les bactéries se déplacent et suivent le champ. De fait la cellulose qu'elles produisent s'alignent sur le champ.



Nous avons plastifié les électrodes (aluminium) afin d'éviter leur dégradation (comme nous avons pu l'observer avec les électrodes de cuivre utilisées initialement, ce qui était gênant de part les propriétés bactéricides des ions métalliques.

Elles sont alimentées par un générateur de tension continue réglable (0-30V).

Les cuves sont celles utilisées dans les expériences précédentes, elles contiennent le milieu de culture inséminé et ont été recouvertes de parafilm. La cuve de droite sert de témoin, elle est strictement identique à celle

de gauche en dehors de l'alimentation électrique. Le montage est laissé en fonction une semaine à température ambiante. On prélève alors des échantillons de milieu (5) au niveau de chaque électrode pour effectuer un comptage des bactéries. Une surface de cellulose est ensuite récupérée dans chaque cuve.

III Traitement et caractérisation de la cellulose

Chaque échantillon de cellulose était ensuite placé 5min dans un bain de soude à 5% en masse avant d'être rincé à l'eau distillée (jusqu'à pH neutre). Les échantillons étaient ensuite laissés à l'air libre pendant une semaine pour qu'ils sèchent car ils sont constitués à 95% d'eau (d'après nos résultats).

1 Courbes de charge sur un échantillon de cellulose

Une propriété importante que nous souhaitons étudier en vue de possibles applications en architecture est le module d'Young. Pour ce faire nous avons effectué des tests de traction et tracé des courbes de contrainte déformation. A noter que les éprouvettes ne pouvaient être réalisées que sur de la cellulose sèche, le test de traction était impossible autrement car le matériau glisse entre les mors de la machine. Nous avons en particulier examiné l'évolution de E en fonction du nombre des couches de cellulose superposées. En effet, on observe que si on superpose deux couches de cellulose mouillée et qu'on les laisse sécher, ces deux couches se collent et on ne peut plus les séparer sans casser le matériau. Si on les remet dans l'eau, elles se décolle à nouveau.

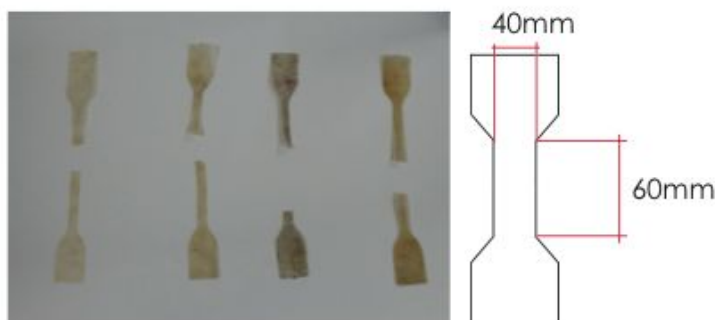


Figure 4 Éprouvettes utilisées

Nous avons ainsi trouvé que la cellulose a un comportement élastique fragile avec un module d'Young de l'ordre de 20GPa. Contrairement à l'intuition, le module d'Young diminue en fonction du nombre de couches superposées.

2 Observation au microscope

Bien que la résolution du microscope accessible en salle de PSE ne nous permette pas en théorie d'observer les fibres de cellulose (μm), nous avons tenté d'observer malgré cela des arrangements des fibres. En utilisant l'objectif x40. Il est toute fois difficile de déterminer si les formes observées sont dues à des défauts de la cellulose (plis, fissures) liés au séchage ou si elle représente un arrangement global des fibres de cellulose. Pour détecter une éventuelle orientation des fibres, nous avons pensé à utiliser un ensemble Polariseur/Analyseur croisé entre lequel on place l'échantillon à observer. En effet, une organisation locale des fibres pourrait modifier la polarisation d'une onde. Toutefois, les polariseurs que nous avons récupérés étant issus d'écrans d'ordinateur, leur qualité n'était pas suffisante pour nos observations (seuls étaient visibles les défauts de ces éléments)

-MEB : pas disponible

¹ Protocole utilisation Malassez : <http://www.bioltrop.fr/spip.php?article>