

DOCUMENT PUBLIC

Les exopolymères bactériens
Synthèse bibliographique

août 2002
BRGM/RP-51637-FR



DOCUMENT PUBLIC

Les exopolymères bactériens
Synthèse bibliographique

F. Garrido, C. Michel, D. Morin

août 2002
BRGM/RP-51637-FR



Mots clés : Exopolymères (EPS), Biofilms, Lixiviation, Géomicrobiologie, Détoxification, Bioremédiation, Biocorrosion, Interactions bactéries/minéral.

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Garrido F., Michel C., Morin D. (2002) - Les exopolymères bactériens : synthèse bibliographique. BRGM RP-51637-FR, 39 p., 2 fig., 4 tabl.

© BRGM, 2002 ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

Synthèse

L'amélioration des connaissances des interactions entre micro-organismes et minéraux ainsi que l'exploitation pratique de l'activité biologique pour des applications spécifiques constituent la vocation première du projet BIOPROC (code : 02POLD01). Ils sont une source de compétences essentielles à la disposition de travaux comme ceux portant sur les drainages miniers acides, la modélisation hydrogéochimique ou la mise en place de barrières réactives de dépollution des sols et des eaux souterraines. Dans ce contexte, le module « *Biochimie* » a été prévu dans le projet BIOPROC pour étudier plus spécifiquement les systèmes enzymatiques et les molécules excrétées jouant un rôle dans les interactions minéral-bactéries.

La première phase de ce travail consistait à réaliser une synthèse de l'état de l'art constituant l'objet de ce rapport. Cette étude est consacrée aux données de la littérature relatives aux molécules bactériennes excrétées qui jouent un rôle dans leur adhésion à des substrats. L'essentiel de cette revue bibliographique est consacré aux bactéries impliquées dans le cycle du soufre (oxydation et réduction), sujet sur lequel l'équipe EPI/BIO a d'importants acquis scientifiques et techniques. Il est aussi démontré que cette thématique peut avoir d'autres applications possibles, notamment dans le domaine de la bioremédiation des environnements pollués en métaux lourds.

Cette synthèse montre qu'une grande majorité des micro-organismes se développent sous forme agrégée et se fixent sur une matrice à l'aide de composés (ou substances) polymériques extracellulaires, communément appelés EPS (Extracellular Polymeric Substances). Leur composition chimique est très variée, et parmi ces composés, les polysaccharides constituent la principale composante. Néanmoins, des protéines, des acides nucléiques et des (phospho)lipides ont également été recensés. La libération des EPS à l'extérieur de la bactérie peut se réaliser par des processus différents : sécrétions actives, libération spontanée à la surface cellulaire ou libération de vésicules membranaires, lyses cellulaires...

Les études des EPS et de leurs fonctions nécessitent l'utilisation de méthodes et techniques assez diverses qui peuvent être assez délicates à mettre en place à cause de la complexité de l'organisation et de la composition des bio-agrégats. Des étapes d'extraction, de purification et d'analyses des EPS basées sur des compétences de microbiologie, de biochimie, de physique, de microscopie, et d'électrochimie sont nécessaires.

L'ensemble des données montrent que les EPS sont les principaux responsables de la structure des biofilms. Ils sont également impliqués dans les processus de lixiviation, de corrosion, de détérioration et de sorption d'éléments tels que les métaux. Ils sont aussi responsables de la résistance des micro-organismes à certains biocides. Leurs nombreuses propriétés en font des composés pouvant avoir des applications dans les domaines de l'environnement, de l'industrie alimentaire, de la cosmétique, de la médecine et de la pharmacologie...

Par rapport aux principaux axes de recherches développés au BRGM, la caractérisation et les études fonctionnelles des EPS présentent de nombreux intérêts. Cette thématique peut contribuer à une meilleure compréhension des interactions entre les bactéries et les supports minéraux, et à une caractérisation de la formation des biofilms. L'exploitation des propriétés des EPS et des biofilms peut aussi permettre d'envisager la mise au point de nouveaux procédés de dépollution.

Les domaines d'applications possibles de telles études concernent principalement la biolixiviation, la bioremédiation des environnements pollués en métaux lourds, la géomicrobiologie et la lutte contre les problèmes liés au développement de biofilms (traitement des eaux, géothermie...).

Sommaire

1. Introduction	9
1.1. Définition des EPS	9
1.2. Rôles et intérêts des EPS	10
1.3. Caractéristiques écologiques des biofilms liées aux EPS.....	10
2. Composition chimique des EPS	12
2.1. Généralités	13
2.2. Les EPS des bactéries sulfato-réductrices	13
2.3. Les EPS des bactéries sulfo-oxydantes	14
3. Biosynthèse et sécrétion des EPS	17
3.1. Les enzymes	17
3.1.1. Voie dite « ABC » (ATP-Binding Cassette)	17
3.1.2. Voie dite « générale ».....	17
3.1.3. Voie « contact-dépendante ».....	18
3.2. Les polysaccharides	18
4. Fonction des EPS	19
4.1. Généralités.....	19
4.2. Détérioration des métaux.....	19
4.3. Biolixiviation des sulfures	19
4.3.1. Mécanismes	19
4.3.2. Implication des EPS.....	21

5. Méthodes d'étude des EPS	23
5.1. Généralités.....	23
5.2. Extraction des EPS.....	23
5.2.1. Echantillonnage et prétraitement.....	25
5.2.2. Extraction physique.....	25
5.2.3. Extraction chimique.....	25
5.2.4. Problèmes liés à l'extraction.....	26
5.2.5. Efficacité de l'extraction.....	26
5.3. Purification des EPS.....	27
5.4. Analyse des EPS.....	27
5.4.1. Les méthodes destructives.....	27
5.4.2. Les méthodes non destructives.....	28
6. Conclusion et perspectives d'études	29
6.1. Les exopolymères bactériens et la lixiviation.....	29
6.1.1. Synthèse de l'état actuel des connaissances.....	29
6.1.2. Perspectives d'études.....	30
6.2. Détoxification des environnements pollués en métaux lourds.....	31
6.2.1. Rétention des métaux lourds par les EPS.....	31
6.2.2. Utilisation de l'activité réductrice d'enzymes bactériennes.....	32
6.3. Lutte contre la formation de biofilms néfastes.....	33
6.4. Informations complémentaires.....	33
Références bibliographiques	35

Liste des figures

- Fig. 1 - Modèle présentant le mécanisme indirect d'attaque de la pyrite par *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Sand *et al.*, 1999).....20
- Fig. 2 - Colonisation de la pyrite par des cellules de *Leptospirillum ferrooxidans* (photos AFM, Sand *et al.*, 1999)20

Liste des tableaux

- Tabl. 1 - Composition quantitative et qualitative des EPS de *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivés sur sulfate de fer, pyrite ou soufre.....15
- Tabl. 2 - Composition chimique des EPS libérés par des cellules de *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivés sur sulfate de fer, pyrite ou soufre ...16
- Tabl. 3 - Méthodes d'extractions physiques et chimiques combinées pour extraire les EPS de cultures connues (Nielsen and Jahn, 1999).....24
- Tabl. 4 - Méthodes d'extractions physiques et chimiques combinées pour extraire les EPS de cultures non définies (Nielsen and Jahn, 1999)24

1. Introduction

Les bactéries jouent un rôle essentiel dans les transformations des minéraux. Elles sont capables de couvrir leur besoin énergétique en utilisant l'énergie de certaines transformations chimiques qu'elles peuvent contrôler. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont permis d'éclaircir les voies de transferts énergétiques qui existent à l'intérieur des cellules. En revanche, la biochimie de l'interaction entre les bactéries et la matière minérale a été très peu étudiée. Au-delà de l'intérêt fondamental que peuvent présenter de telles études au niveau de l'acquisition des connaissances, il y a aussi un potentiel d'intérêt considérable pour ce sujet quant aux applications dans le domaine de l'environnement.

Afin de disposer d'un premier support de réflexion sur cette thématique, une synthèse non exhaustive de l'état de l'art a été réalisée sur les connaissances actuelles des interactions bactéries/minéral. Pour cela, les données concernant les molécules excrétées par les bactéries et qui jouent un rôle dans leur adhésion à des substrats ont été synthétisées. Compte tenu des acquis scientifiques et techniques du BRGM concernant le rôle des bactéries du cycle du soufre et de l'intérêt qu'elles peuvent avoir, ce travail a été essentiellement focalisé sur les bactéries sulfo-oxydantes et sur les bactéries sulfato-réductrices. Cette synthèse doit être considérée comme un support de réflexion permettant d'évaluer la pertinence d'éventuels nouveaux sujets de recherche qui pourraient être développés dans ce domaine.

1.1. DÉFINITION DES EPS

Une grande majorité des micro-organismes vivent et se développent sous forme agrégée. Les biofilms sont une très bonne illustration de ce type d'organisation. Ce phénomène naturel que l'on trouve à la fois avec les micro-organismes de type Eucaryotes et Procaryotes résulte généralement de la fixation des micro-organismes sur une matrice à l'aide de Composés (ou Substances) Polymériques Extracellulaires, communément appelées SPE ou EPS en anglais (Extracellular Polymeric Substances).

Les EPS microbiens sont des polymères biosynthétiques ou biopolymères. Geesey (1982) les définit comme des « *substances polymériques extracellulaires d'origine biologique qui participent à la formation des agrégats microbiens* ». D'autres auteurs tels que Characklis and Wilderer (1989) vont plus loin en définissant les EPS comme des « *polymères organiques qui sont souvent responsables dans les biofilms de la cohésion des cellules et de leur adhésion sur des substrats* ».

Sous le terme générique d'EPS, plusieurs types de composés sont représentés. Les polysaccharides sont considérés comme leur principale composante. Néanmoins, des protéines, des acides nucléiques et des (phospho)lipides ont également été recensés.

1.2. RÔLES ET INTÉRÊTS DES EPS

Les EPS sont impliqués dans la stabilité des biofilms, les processus de lixiviation, de corrosion, de détérioration et de sorption d'éléments tels que les métaux. Ils sont également responsables de la résistance des micro-organismes à certains biocides.

Actuellement, ils sont étudiés et sélectionnés pour leurs applications possibles dans les domaines de l'environnement, de l'industrie alimentaire, de la cosmétique, de la médecine et de la pharmacologie... Les EPS intéressent de nombreux secteurs d'activités essentiellement pour leurs applications industrielles. Dans le domaine de l'Environnement, les EPS sont étudiés par exemple pour leur utilisation dans la biodétoxification de milieux contaminés (Guezennec, 2001). En effet, les EPS peuvent fixer et permettre l'accumulation dans des biofilms de cations tels que Ca^{2+} ou Mg^{2+} , mais aussi des éléments tels que le plomb, le zinc, le cadmium, le fer, le cobalt, l'euporium, le césium, le strontium, le technétium et le gadolinium qui pour certains sont des polluants très toxiques.

Une des fonctions importantes attribuées aux EPS est leur rôle de protection des micro-organismes contenus dans le biofilm contre les attaques biotiques et abiotiques de l'environnement. Il a été montré que les micro-organismes tolèrent de plus fortes concentrations de désinfectants et d'antibiotiques lorsque les cellules se trouvent au sein d'un biofilm (Foley and Gilbert, 1996). Ce rôle protecteur est généralement attribué aux polysaccharides et aux protéines. Cette structure permet aussi d'améliorer les capacités bactériennes. Par exemple, elle peut faciliter la dégradation des substances difficilement biodégradables.

1.3. CARACTÉRISTIQUES ÉCOLOGIQUES DES BIOFILMS LIÉES AUX EPS

Les EPS sont les principaux responsables de l'intégrité fonctionnelle et structurale des biofilms. Ces composés déterminent en partie les propriétés physico-chimiques et biologiques des biofilms. Ils forment un micro-environnement très particulier qui peut constituer un véritable milieu sélectif pour les micro-organismes.

L'organisation des micro-organismes dans des structures telles que les biofilms crée des gradients de concentration d'accepteurs d'électrons (oxygène en particulier), de substrats, de produits et de pH. Ainsi, des micro-environnements aérobies et anaérobies peuvent se créer conjointement, ce qui permet le développement dans un espace très réduit d'un très grand nombre d'espèces bactériennes très différentes phylogénétiquement (Wingender *et al.*, 1999).

Dans de telles microniches où les cellules sont très proches physiquement les unes des autres et où l'ADN peut être libéré, des transferts horizontaux de gènes peuvent être facilités. Quelques travaux ont permis de mettre en évidence des échanges de gènes et des transferts de plasmides entre cellules qui conduisent à des changements phénotypiques des micro-organismes (Lisle and Rose, 1995 ; Bale *et al.*, 1988).

Au sein des biofilms, il existe une autre forme de transfert d'information qui correspond à une sorte de communication entre les cellules par l'intermédiaire de « molécules de signal » de faible poids moléculaire. Ces molécules correspondent à des lactones N-acyl-L-Homoserine (AHLs) (Stickler *et al.*, 1998). La sécrétion de telles molécules est concomitante aux changements phénotypiques et aux transferts de gènes. Les AHLs sont de véritables médiateurs de l'adhésion cellulaire et sont supposés être impliqués dans l'induction de gènes essentiels pour le maintien du mode de croissance du biofilm et pour l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales (Heys *et al.*, 1997).

2. Composition chimique des EPS

2.1. GÉNÉRALITÉS

Les principales fractions organiques qui composent les EPS sont les protéines, les glycoprotéines, les glucides et les substances humiques (Morgan *et al.*, 1991). Toutefois, la classification de ces derniers composés parmi les EPS est encore discutée (Burns, 1989 ; Jahn and Nielsen, 1998). Des taux significatifs d'ADN et d'ARN peuvent également être trouvés.

Les EPS sont composés principalement de macromolécules formées par polymérisation d'unités similaires ou identiques. Les EPS peuvent aussi contenir des groupements non polymérisés de faible poids moléculaire qui modifient fortement la structure et les propriétés physico-chimiques des EPS. Par exemple, les polysaccharides extracellulaires peuvent porter des groupements acétyl, succinyl ou pyruvyl ou des constituants inorganiques tels que les sulfates. Les protéines peuvent être glycosylées avec des oligosaccharides pour former des glycoprotéines ou peuvent être associées à des acides gras pour former des lipoprotéines.

La libération des EPS à l'extérieur de la bactérie peut se réaliser par des processus différents : sécrétions actives, libération spontanée à la surface cellulaire, libération de vésicules membranaires ou lyses cellulaires. Les EPS peuvent faire l'objet de dégradation biotique et/ou abiotique, de modification et de processus de condensation. Les processus de dégradation des molécules résultent principalement d'activités enzymatiques liées à la présence dans les biofilms d'enzymes telles que les hydrolases ou les lyases (Wingender *et al.*, 1999). Ceci peut alors conduire à la modification du comportement du biofilm.

2.2. LES EPS DES BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) forment un groupe de micro-organismes capables de réduire les composés soufrés tels que le sulfate, le thiosulfate ou le soufre en sulfure (Lovley, Philipps, 1994). Ces micro-organismes appartiennent à des genres bactériens très différents et sont souvent présents dans les biofilms. Ils sont capables d'utiliser différentes sources de carbone : alcools, CO₂, acides gras et hydrocarbures. Bien que strictement anaérobies, quelques BSR tolèrent l'oxygène (Hardy and Hamilton, 1981).

Très peu d'études ont été réalisées sur la production d'EPS par les BSR. Les premiers travaux ont été effectués en 1953 par Senez qui a étudié la production d'EPS sur des cultures en batch de *Desulfovibrio desulfuricans* spp. Ces premiers travaux ont permis de mettre en évidence la formation d'un film à la surface des incubateurs sous forme d'une substance visqueuse (Grossman and Postgate, 1955). Des analyses de ce biofilm

par chromatographie ont révélé la présence de protéines et de polysaccharides qui n'étaient pas chimiquement liés à la paroi cellulaire (Ochynski and Postagte, 1963). Un seul type de glucide a ensuite été identifié, le mannose, qui était alors considéré comme le constituant majoritaire des biofilms.

Plus de trente ans après, l'évolution des techniques analytiques a permis d'avoir une image des biofilms de BSR formés sur différentes surfaces (Beech *et al.*, 1991 ; Kang, 1998) et d'analyser les EPS produits par les BSR dans différents environnements. Ces études ont montré que les EPS produits par différentes espèces de BSR sont tous composés d'hexoses neutres (mannose, glucose, galactose, ribose, rhamnose, xylose et allose), de sucres aminés et d'acides uroniques mais dans des concentrations qui varient en fonction des espèces bactériennes. En plus des polysaccharides, des protéines et des acides nucléiques (ADN et ARN) ont été identifiés. En effet, il a été démontré que des bactéries présentes dans des eaux de drainages acides libèrent un mélange de polysaccharides neutres, d'acides et d'ARN. Les composés acides participent alors à l'oxydo-réduction du fer qui se lie à cette matrice. Dans certains cas, la présence de fer dans le milieu entraîne une augmentation de la quantité d'ARN dans le milieu extracellulaire (Zinkevich *et al.*, 1996). Ces études ont été réalisées principalement chez *Desulfovibrio desulfuricans* (Beech, *et al.*, 1991), *Desulfovibrio alaskensis* (Kang, 1998) et *Desulfovibrio indonensis* (Feio *et al.*, 1996).

Des travaux ont mis en évidence que les modifications expérimentales, c'est-à-dire la réalisation de cultures bactériennes en présence ou non de « surfaces », influencent considérablement les types d'exopolymères synthétisés (Beech and Gaylarde, 1991 ; Kang, 1998). Le rendement et la composition des EPS dépendent des espèces bactériennes et des conditions de croissance.

Il existe des différences considérables entre les profils protéiques et les concentrations en polysaccharides des EPS issus de biofilms de BSR et ceux issus de BSR libres. De même, il existe des différences considérables entre les EPS libres sécrétés en présence ou en absence de surfaces en acier (mild steel), ce qui indique que le type de BSR et leur mode de croissance, ainsi que la présence de surface métallique (qui est une source possible d'ion Fe) peuvent influencer le type d'exopolymères synthétisés. Des différences significatives quant à la quantité et la signature chimique d'EPS libres ont été détectées entre des BSR appartenant au même genre et dans les mêmes conditions de culture : les exopolymères sécrétés par *D. indonensis* varient en fonction de la source de carbone, des ions métalliques ajoutés en tant que sel, et des composés antimicrobiens présents dans le milieu de croissance (Chan, 1993).

2.3. LES EPS DES BACTÉRIES SULFO-OXYDANTES

Bien que le rôle des EPS et leur importance ne soient pas encore très bien définis, leur implication dans la lixiviation biologique de métaux précieux et dans les drainages miniers acides est généralement admis. Des bactéries hautement spécialisées oxydent des sulfures métalliques insolubles dans un but énergétique. La destruction de la matrice sulfurée a pour conséquence la production d'acide sulfurique et la mise en solution des

ions métalliques. Par ailleurs, la biolixiviation générée par l'activité minière au sein des gisements de minerais sulfurés s'accompagne d'effets environnementaux négatifs qui concernent notamment la pollution des eaux.

Les bactéries responsables de ce processus de dissolution appartiennent principalement à deux espèces : *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans*. Ils oxydent Fe^{2+} en Fe^{3+} dont on connaît le pouvoir oxydant vis-à-vis des sulfures métalliques. La fonction de ces deux bactéries est de garder les ions fer principalement dans un état oxydé pour permettre l'initiation du procédé. *L. ferrooxidans* est une bactérie qui utilise comme seule source d'énergie l'oxydation des ions Fe^{2+} . Ainsi, les bactéries vivent dans une gamme de pH comprise entre 1 et 3, voire même plus faible, car dans ces conditions, Fe^{2+} et Fe^{3+} sont solubles.

Les principales études sur la composition des EPS de bactéries sulfo-oxydantes ont été réalisées à l'université d'Hambourg sur la souche R1 de *A. ferrooxidans* (Sand and Gehrke, 1999). Pour l'isolation des EPS, la souche a d'abord été cultivée sur milieu contenant soit des ions ferreux (comme le sulfate de fer) soit des solides tels que des fragments de pyrite ou du soufre élémentaire.

Les principaux résultats des analyses chimiques de la composition des EPS (tabl. 1) montrent que les EPS sont essentiellement constitués de sucres et de lipides (Kinzler *et al.*, *in press*).

Substrat	Total $\mu\text{g}/10^{10}$ cellules	Masse (% d'EPS total)				
		Sucres	Lipides	Acides gras libres	Azote	Phosphore
Sulfate de fer (II)	215 ± 30	52,2	36,9	5,5	0,5	0,7
Pyrite	2 760 ± 301	48,5	39,4	5,8	0,5	0,8
Soufre	1 155 ± 94	40,9	53,8	8,0	0,6	2,8

Tabl. 1 - Composition quantitative et qualitative des EPS de Acidithiobacillus ferrooxidans cultivés sur sulfate de fer, pyrite ou soufre.

Des différences majeures entre la composition chimique des EPS produits par les cellules cultivées en présence de sulfate de fer ou en présence de pyrite ont été mises en évidence. En revanche, des taux importants d'acides gras liés et de phosphore (indiquant la présence de phospholipides) ont été détectés pour les cellules cultivées avec le soufre. Par ailleurs, quel que soit le substrat, la présence d'acides nucléiques a été mise en évidence alors que protéines et hexosamines n'ont pas été détectés.

La composition des différents constituants chimiques des EPS produits par des cultures d'*A. ferrooxidans* réalisées en présence de sulfate de fer, de pyrite ou de soufre est répertoriée dans le tableau 2.

Fraction d'EPS	Constituant	% massique des EPS totaux libérés par les cellules cultivées sur		
		Sulfate de fer(II)	Pyrite	Soufre
Sucres	Rhamnose	13,9	10,8	Nd
	Fucose	20,5	17,1	Nd
	Xylose	0,9	0,8	Nd
	Mannose	0,4	0,7	Nd
	Glucose	11,4	15,2	40,4
	Acide glucuronique	4,4	3,3	0,6
	Ions fer(II)	0,7	0,5	Nd
Lipides	C _{12:0}	1,9	2,0	2,7
	C _{14:0}	0,4	0,4	0,6
	C _{16:0}	8,8	9,4	12,9
	C _{17:0}	0,9	1,0	1,3
	C _{18:0}	20,2	21,6	29,5
	C _{19:0}	3,9	4,2	5,7
	C _{20:0}	0,8	0,8	1,1
Acides gras libres	C _{16:0}	1,7	1,8	2,4
	C _{18:0}	3,8	4,0	5,6

Nd : non détecté (< 0,08 %)

Tabl. 2 - Composition chimique des EPS libérés par des cellules de Acidithiobacillus ferrooxidans cultivées sur sulfate de fer, pyrite ou soufre.

3. Biosynthèse et sécrétion des EPS

Malgré la présence d'une très large diversité de composés présents parmi les EPS bactériens, il a été montré que les polysaccharides et les enzymes sont majoritaires. C'est, entre autre, pour cette raison que l'essentiel des travaux d'identification des mécanismes de biosynthèse des EPS a été réalisé sur ces deux types de composés. Polysaccharides et enzymes sont synthétisés à l'intérieur des bactéries et sont ensuite transportés à travers la paroi cellulaire pour être excrétés dans l'environnement extracellulaire grâce à différents types de mécanismes.

3.1. LES ENZYMES

La biosynthèse des enzymes suit la voie classique de synthèse protéique que nous ne présenterons pas dans le cadre de cette synthèse. Les enzymes extracellulaires sont synthétisées dans le cytoplasme et doivent être transportées à travers les membranes interne et externe. Trois types de voies ont été identifiés (Binet *et al.*, 1997 ; Filloux *et al.*, 1998).

3.1.1. Voie dite « ABC » (ATP-Binding Cassette)

La sécrétion des enzymes par cette voie a lieu en une seule étape. Un complexe présent au niveau des membranes interne et externe, et constitué de 3 protéines différentes, forme un véritable canal reliant le cytoplasme au milieu extracellulaire. Il a été montré notamment chez *Pseudomonas aeruginosa* la sécrétion possible de certaines enzymes dans le milieu extracellulaire par cette voie simple et directe.

3.1.2. Voie dite « générale »

La sécrétion des protéines par cette voie qui est la plus fréquemment utilisée a lieu en deux étapes. Celles-ci sont dues au franchissement de la membrane interne et externe des bactéries.

Le passage des protéines à travers la membrane interne est pris en charge par le système Sec-translocase, qui est un complexe multi-protéique. La plupart des protéines sécrétées possèdent une séquence signal N-terminale. Elle est constituée d'un ou plusieurs acides aminés chargés positivement et d'une dizaine d'acides aminés hydrophobes. Après translocation de la protéine à travers la membrane interne, cette séquence signal est clivée par une peptidase. La protéine adopte alors sa conformation « enzymatiquement active », grâce à des protéines chaperonnes. La protéine est ensuite prise en charge par la machinerie de sécrétion Xcp (composée de 12 protéines) qui permet la translocation à travers la membrane externe.

3.1.3. Voie « contact-dépendante »

Cette voie a été mise en évidence chez des bactéries pathogènes (Wingender *et al.*, 1999). Ces bactéries développent un système de sécrétion constitué d'une vingtaine de protéines (localisées dans la membrane interne ou externe) qui ne s'assemblent que lorsqu'il y a contact avec la cellule cible. L'assemblage du système de sécrétion est donc régulé par le contact bactérie-cellule cible. On peut alors imaginer que dans les biofilms, le contact cellule-cellule *via* les EPS pourrait être un signal pour l'assemblage d'un complexe de sécrétion fonctionnel.

Un autre mécanisme de sécrétion d'enzymes a été mis en évidence récemment (Beveridge, 1999). Ce mécanisme, qui semble être commun à l'ensemble des bactéries Gram-négatives, permet une libération non spécifique d'enzymes grâce à la formation de vésicules dérivées de la membrane externe. Dans un biofilm, des vésicules contenant des enzymes hydrolytiques (exemple hydrolases) pourraient ainsi servir à dégrader les cellules avoisinantes, ce qui fournirait des nutriments aux cellules formant ces vésicules.

3.2. LES POLYSACCHARIDES

A l'exception du dextran et du levan, la biosynthèse des polysaccharides se fait à l'intérieur de la cellule. Chez les bactéries Gram-négatives, ces molécules sont sécrétées à travers la membrane externe jusqu'à la surface cellulaire. Elles y restent fixées, ou bien sont libérées dans le milieu extracellulaire. La sécrétion de ces molécules fait intervenir soit des pores situés dans la membrane externe, soit des zones d'adhésion entre les membranes interne et externe.

4. Fonction des EPS

4.1. GÉNÉRALITÉS

Les EPS bactériens ont plusieurs fonctions. Ils interviennent dans l'adhésion des bactéries aux surfaces, l'agrégation des cellules, la formation des biofilms, la reconnaissance cellulaire, la protection cellulaire, la rétention en eau, la fixation de composés organiques ou inorganiques et les activités enzymatiques (Wingender *et al.*, 1999). Les EPS déterminent la stabilité des biofilms par des interactions non-covalentes entre les chaînes de polysaccharides (Higgins and Novak, 1997). Les protéines sont impliquées d'une part dans les ponts électrostatiques avec les cations multivalents et d'autre part dans la digestion de macromolécules exogènes et autres composés présents dans le micro-environnement. Les produits de digestion sont ensuite facilement récupérés et métabolisés par les cellules. Elles sont donc impliquées à la fois dans la stabilité des biofilms et dans la synthèse de nutriments.

4.2. DÉTÉRIORATION DES MÉTAUX

L'implication des exopolymères sécrétés par les BSR dans les processus de dégradation de métaux est largement acceptée. Les EPS peuvent se lier sélectivement à des ions métalliques et provoquer des changements de comportement électrochimique des métaux. L'activité des enzymes hydrogénases, la production de sulfure d'hydrogène conduisant à la formation de sulfures métalliques et la libération de composés phosphorés volatiles résultant du métabolisme cellulaire des BSR ont un rôle majeur dans les processus de corrosion (Iverson, 1987). Bien que la fixation des ions métalliques tels que Fe, Cr, Mo et Ni par les exopolymères de BSR ait été démontrée, peu d'études ont permis de définir le rôle exact des exopolymères dans la détérioration des métaux. Une étude réalisée *in vitro* a permis d'isoler un complexe protéine-polysaccharide thermostable de poids moléculaire supérieur à 200 kDa sécrété par *D. indonensis* et capable d'accélérer le processus d'attaque. L'hypothèse d'explication formulée est la haute affinité de ce complexe pour les ions Fe. Il est intéressant de noter que les EPS produits par *D. indonensis*, qui entraînent une plus grande corrosion de l'acier par rapport à *D. alakensis*, accumulent 20 fois plus de fer issu de la surface de l'acier que les EPS de *D. alakensis* (Beech and Tapper, 1999). D'autre part, des protéines sécrétées par des BSR marines sont suspectées d'être impliquées dans la fixation et/ou le transport du fer (Zinkevich *et al.*, 1996).

4.3. BIOLIXIVIATION DES SULFURES

4.3.1. Mécanismes

Au cours de la biolixiviation, la plupart des sulfures métalliques sont dissous par l'attaque combinée des protons et/ou des ions Fe^{3+} . Sans rentrer dans le détail des mécanismes proposés dans la littérature pour expliquer le fonctionnement de la biolixiviation des sulfures (Sand and Gehrke, 1999), le modèle le plus couramment

admis suppose que le rôle principal des bactéries dans l'effet de catalyse de l'oxydation des sulfures qu'elles exercent, est l'activation de l'oxydation du fer ferreux à proximité de la surface des sulfures. Les EPS sont très fréquemment évoqués dans la littérature comme intermédiaires de contact entre les micro-organismes et les surfaces des sulfures. Le recouvrement de la surface par les EPS générerait un micro-environnement favorable à l'activation de l'oxydation du fer ferreux (fig. 1 et 2). Par ailleurs, ils permettraient de concentrer les ions Fe^{3+} par complexation avec les acides uroniques ou avec d'autres résidus, au niveau de la surface minérale (Kinzler *et al.*, *in press*).

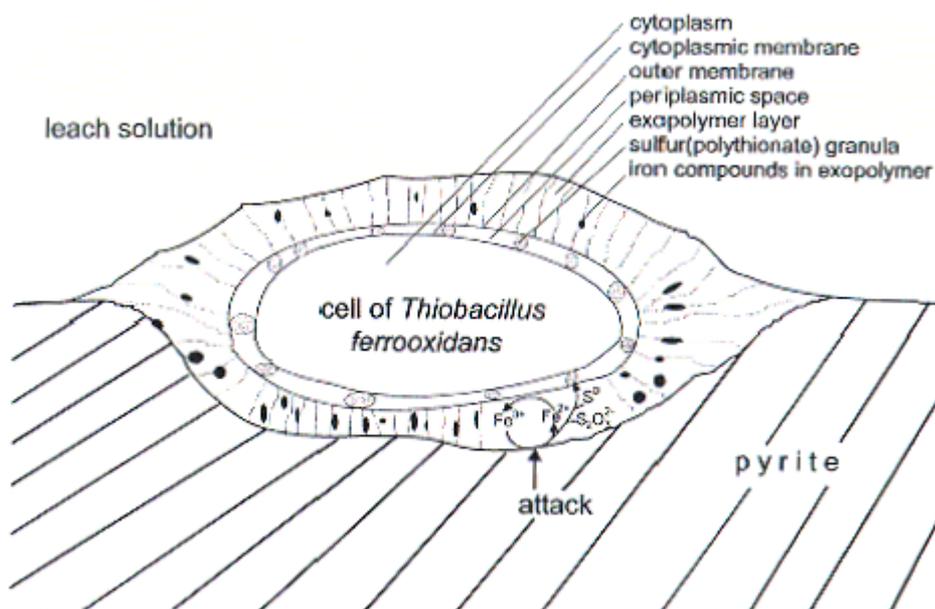


Fig. 1 - Modèle présentant le mécanisme indirect d'attaque de la pyrite par Acidithiobacillus ferrooxidans (Sand et al., 1999).

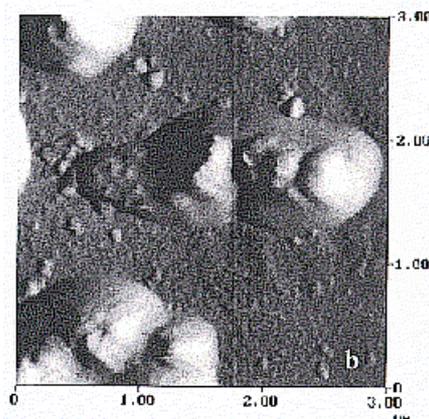


Fig. 2 - Colonisation de la pyrite par des cellules de Leptospirillum ferrooxidans (photos AFM, Sand et al., 1999).

4.3.2. Implication des EPS

En fonction des conditions de cultures et notamment du type de substrat disponible pour les bactéries, la quantité et la composition des EPS produits par les bactéries changent. Les cellules adaptent leur production d'EPS en accord avec leur besoin d'attachement. Dans le cas du sulfate de fer, une large variété de sucres, d'acides uroniques et d'acides gras sont présents dans les EPS. Dans celui de la pyrite, la composition change légèrement. Le taux de sucres est plus faible alors que le taux d'acides gras est plus élevé. Dans les deux types d'EPS, les ions Fe^{3+} sont détectables avec une stœchiométrie de 1/2 par rapport aux acides uroniques. Considérant la charge nette des ions Fe^{3+} à +3 et la charge de l'acide uronique à -1, une charge nette positive de +1 est obtenue. Cette charge nette positive rend les EPS de *A. ferrooxidans* électropositifs. Dans le cas de la pyrite, la surface est chargée négativement, une attraction cellules/EPS avec le substrat en résulte, permettant un attachement primaire grâce à des interactions électrostatiques.

Lorsque les cellules de *A. ferrooxidans* R1 sont cultivées avec le soufre élémentaire, la composition des EPS diffère considérablement. Le taux et la variété de sucres décroissent. Seul le glucose reste détectable. Les acides uroniques passent aussi en dessous de la limite de détection. En revanche, le taux d'acides gras augmente. Ces composés deviennent les principaux constituants des EPS. De façon évidente, les cellules s'adaptent à l'hydrophobicité du substrat en régulant l'excrétion de sucres, d'acides uroniques et d'acides gras en conséquence.

La régulation d'acides uroniques est d'un intérêt particulier du fait qu'ils sont impliqués dans la fixation des cellules au substrat. Les acides uroniques sont capables de se complexer aux ions Fe^{3+} , la fixation devient possible et en même temps, le mécanisme de dégradation utilisant ces ions comme agents oxydants peut commencer. Dans le cas du soufre élémentaire, le mécanisme de dégradation n'est pas dépendant des ions Fe^{3+} . Les acides uroniques ne sont d'ailleurs pas sécrétés. Contrairement à la composition des sucres qui varie en fonction du substrat, la composition en acides gras ne varie pas. Seul le taux d'acides gras dans les EPS est différent suivant les substrats présents mais pas leur composition.

Les composés lipidiques extracellulaires, essentiellement ceux des cellules cultivées en présence de pyrite, peuvent être considérés comme des composés de surface actifs (des biosurfactants). Ils pourraient accroître la solubilité des composés hydrophobes et/ou créer un film à l'interface ou pourraient servir de point d'ancrage pour les composés hydrophiles des EPS dans la partie hydrophobe de la membrane externe (Neu, 1996). De tels composés ont été détectés à la surface extracellulaire de *Thiobacillus* sp et peuvent être impliqués dans l'initiation de l'adhésion à des surfaces hydrophobes (Bryant *et al.*, 1984 ; Escobar *et al.*, 1997).

5. Méthodes d'étude des EPS

5.1. GÉNÉRALITÉS

Les microbiologistes utilisent généralement pour leurs études au laboratoire des cultures pures de bactéries dans du milieu de croissance artificiel. Dans ces conditions, les bactéries peuvent modifier leur comportement notamment vis-à-vis de la synthèse des EPS. Les bactéries peuvent, dans certains cas, perdre totalement leur capacité à synthétiser et libérer des EPS. L'extrapolation des résultats obtenus peut conduire à des interprétations qui ne reflètent pas exactement ce qui se passe en conditions réelles.

Afin d'éviter ce problème, plusieurs techniques ont été développées pour étudier les EPS *in situ*, c'est-à-dire au sein des biofilms. Pour cela, des microélectrodes, des sondes de gènes et de nouvelles techniques de microscopies sont généralement utilisées. Les microélectrodes permettent d'étudier les gradients physico-chimiques et biologiques qui peuvent s'installer à l'intérieur des biofilms (Lassen *et al.*, 1992).

Pour la caractérisation de certains constituants cellulaires, d'importantes évolutions techniques ont été réalisées ces dernières années. Elles concernent notamment l'utilisation de sondes génétiques *in situ* (Neu and Lawrence, 1999 ; Amann *et al.*, 1995).

5.2. EXTRACTION DES EPS

Pour réaliser une étude précise de la composition des EPS, il est souvent nécessaire de les séparer des cellules et de les extraire. De nombreuses méthodes d'extraction existent et sont proposées dans la littérature. Ces méthodes sont généralement basées sur la solubilisation des molécules dans l'eau, ce qui signifie que les molécules hydrophobes ne sont pas extraites.

Elles reposent sur des principes physiques et/ou chimiques. Dans la majorité des études, la combinaison des deux est utilisée (tabl. 3 et 4). La technique d'extraction doit être choisie en fonction des contraintes expérimentales liées au type d'échantillon étudié et aux types de liaisons présentes (force de Van der Waals, interactions électrostatiques, liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, liaisons covalentes...). Ces caractéristiques varient d'une étude à une autre.

Par conséquent, il n'est pas possible de standardiser une méthode qui serait utilisable dans tous les cas. Il est donc nécessaire de tester différentes méthodes d'extraction en début d'étude afin de définir et de sélectionner la plus appropriée.

Méthode	Système	Relargage intracellulaire	Références
Eau déionisée/mélange (2 mn)	<i>Sphaerotilus natans</i>	n.e.	Gaudy and Wolfe, 1962
NaOH (pH 11,5)/chauffage 40 °C	<i>Rhizobacteria</i>	n.e.	Hebbar <i>et al.</i> , 1992
NaOH (1N)/chauffage (70 °C, 15 mn)	<i>Rhizobium trifolii</i>	n.e.	Breedveld <i>et al.</i> , 1990
Conditions/salines /sonication (60 W, 2 mn)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	n.e.	Evans <i>et al.</i> , 1994
EDTA/(mmoll ⁻¹)/mélange (60 s)	Freshwater sediment bacterium	Glucose 6PDH	Platt <i>et al.</i> 1985
NaCl (0.1 mol ⁻¹)/EDTA 0.01 mol ⁻¹ , 30 mn agitation	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	n.e.	Junelles <i>et al.</i> , 1989
Dowex (240 gg ⁻¹ carbone organique/shear)	<i>Pseudomonas putida</i> (biofilm et culture liquide)	Glucose6PDH	Jahn and Nielsen, 1995
Ethanol/ centrifugation haute vitesse (48 000 g)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	n.e.	Streeter <i>et al.</i> , 1994
Cétyltriméthylammonium bromide (1 %w/v/NaCl (0.04 mol ⁻¹)/ chauffage (50 °C, 2 h)	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	n.e.	Omar <i>et al.</i> 1983
Précipitation au hexadécyltriméthylammonium bromide (0.1 %(w/v)/CaCl ₂ (1 mol ⁻¹)	<i>Escherichia coli</i>	n.e.	Schmidt and Jann, 1982 Jann <i>et al.</i> , 1980
NaCl (0,9 %)/chauffage (50°C, 2 h)	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	n.e.	Omar <i>et al.</i> , 1983
K ₂ HPO ₄ (0.02 mol ⁻¹)/mélange (2 mn)	<i>Zoogloea</i>	n.e.	Farrah and Unz, 1976

n.e. : non étudié

Tabl. 3 - Méthodes d'extractions physiques et chimiques combinées pour extraire les EPS de cultures connues (Nielsen and Jahn, 1999).

Méthode	Système	Relargage intracellulaire	Références
Dowex/mélange (65-80gg ⁻¹ VS, 900 rpm, 1-2 h)	Boues activées	Glucose6PDH	Frolund <i>et al.</i> , 1996
Dowex/mélange (240 gg ⁻¹ matière organique, 600 rpm, 1-2 h)	Biofilms marins	Glucose6PDH	Jahn and Nielsen, 1995
NaCl (2,5 %w/v)/EDTA (100 mmoll ⁻¹), pendant 15 mn, mélange au Vortex	Sédiments	n.e.	Underwood <i>et al.</i> , 1995
NaCl (8,5 %w/v)/formaldéhyde (0,22 %v/v)/sonication (40W pendant 3 mn dans la glace)	Boues anaérobies	n.e.	Jia <i>et al.</i> , 1996
Extraction au phénol (20 %v/v), 50 °C, 45 mn, sonication intermittente	Granules méthanogéniques	n.e.	Veiga <i>et al.</i> , 1997

n.e. : non étudié

Tabl.4 - Méthodes d'extractions physiques et chimiques combinées pour extraire les EPS de cultures non définies (Nielsen and Jahn, 1999).

5.2.1. Échantillonnage et prétraitement

Avant de procéder à la phase d'extraction des EPS proprement dite, il y a quelques précautions à prendre au niveau de l'échantillonnage afin d'éviter les modifications de structure et de composition chimique des bio-agrégats. Les échantillons doivent être conservés entre 0 et 4 °C afin d'éviter d'éventuelles activités enzymatiques. Dans ces conditions, les échantillons peuvent être conservés pendant 1 à 2 jours sans avoir de modifications significatives des EPS. Des étapes de congélation/décongélation ne sont pas recommandées car elles peuvent provoquer des lyses cellulaires et conduire à des relargages de protéines périplasmiques (Lall *et al.*, 1989).

Afin d'obtenir une extraction optimale, les échantillons doivent être bien homogénéisés sans pour autant perturber les cellules. Pour cela, il est conseillé de réaliser une vérification au microscope avant et après homogénéisation.

5.2.2. Extraction physique

L'extraction physique des EPS repose sur l'utilisation de techniques de centrifugation, d'homogénéisation, de mélange, de sonication ou de traitement par la chaleur. En général, le rendement d'extraction par simples méthodes physiques est plus faible que celui obtenu en combinant méthodes physiques et chimiques.

La centrifugation est généralement utilisée pour extraire la fraction d'EPS libres et solubles de la biomasse microbienne. La centrifugation à vitesse élevée est quelques fois utilisée pour extraire les EPS liés, mais cette technique n'est généralement pas considérée comme la plus efficace (Brown and Lester, 1980).

5.2.3. Extraction chimique

Cette méthode d'extraction est basée sur l'utilisation de substances chimiques pour rompre les liaisons au sein de la matrice EPS afin de faciliter le relargage des EPS. Pour cela, les principaux produits utilisés sont NaOH, NaCl, KH₂PO₄, EDTA, éthanol ou phénol (Nielsen and Jahn, 1999).

Un traitement alcalin par l'addition de soude induit la formation de groupes chargés tels que des groupes carboxyles dans les protéines et les polysaccharides. Il en résulte une forte répulsion entre les EPS et permet alors leur solubilisation. Une hydrolyse alcaline de certains polymères peut être réalisée pour rompre les liaisons covalentes disulfures des glycoprotéines (Zayas, 1997). De tels traitements sont réalisés dans des conditions de pH variant entre 9 et 13 grâce à l'addition de NaOH.

D'autres méthodes chimiques sont basées sur des échanges d'ions. Dans la matrice, plusieurs cations bivalents (essentiellement Ca²⁺ et Mg²⁺) sont impliqués dans les liaisons entre les EPS. Ces cations peuvent être retirés de la matrice par piégeage sur résine ou par l'utilisation d'agents complexants tels que EDTA ou EGTA. Cependant,

l'utilisation de tels produits peut conduire à la déstructuration des parois cellulaires et donc à la libération de constituants cellulaires dans le milieu, notamment des lipopolysaccharides. Dans ce cas, les résultats d'analyses sont totalement faussés. Par ailleurs, des méthodes d'échanges de cations basées essentiellement sur l'utilisation de NaCl ont été employées pour extraire des exopolymères impliqués dans l'adhésion des cellules de *Pseudomonas putida* et de *Pseudomonas fluorescens* (Read and Costerton, 1987).

Dans d'autres études, des techniques basées sur l'élévation du pH (avec NH₄OH) et sur la digestion enzymatique ont été utilisées pour extraire les EPS (Tago and Aida, 1977).

5.2.4. Problèmes liés à l'extraction

Le problème majeur de cette étape d'extraction est l'endommagement des cellules car cela peut conduire à la libération de macromolécules cellulaires venant « contaminer » l'extraction. Il est très difficile de contrôler cet aspect même si quelques éléments peuvent être des indicateurs de lyse cellulaire. Par exemple, l'accumulation de protéines et d'acides nucléiques dans l'extrait brut peut constituer un indice mais il ne faut pas oublier qu'ils sont aussi reconnus comme constituants des EPS. La lyse cellulaire peut aussi être détectée par l'apparition d'enzymes intracellulaires, telle que la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Platt *et al.*, 1985) ou par simple comptage bactérien afin de suivre l'évolution du nombre de bactéries.

La dénaturation et la modification de certaines macromolécules lors de l'extraction peut aussi constituer un problème important quand on effectue des analyses qualitatives d'EPS. Ce problème peut être évité en partie en utilisant des inhibiteurs de protéases au cours de la procédure d'extraction afin d'éviter la dégradation des protéines.

D'autre part, les techniques classiques d'extraction ne permettent pas d'extraire la fraction la plus hydrophobe des EPS. Très peu d'études ont été consacrées à l'extraction de ces composés car celle-ci est délicate à réaliser sans affecter les cellules. Quelques travaux proposent l'utilisation de certains détergents (Schmidt and Jann, 1982) ou l'éthanol (Forster and Clarke, 1983) pour extraire les lipides. Toutefois, aucun véritable contrôle de l'impact de l'utilisation de ces produits sur les cellules n'a été réalisé au cours de ces études.

5.2.5. Efficacité de l'extraction

Etant donné qu'il n'existe pas de méthodes quantitatives directes pour analyser les EPS dans un échantillon donné et qu'il est souvent nécessaire de les extraire, il est important de pouvoir évaluer l'efficacité de cette phase d'extraction. Ce paramètre est exprimé par le rapport entre le taux d'EPS extraits et le taux de matière organique car le taux d'EPS totaux présents dans un échantillon n'est généralement pas facile à déterminer. C'est un moyen d'évaluer l'efficacité ou plus précisément le rendement de l'extraction. Il a été montré par cette méthode qu'entre 32 et 97 % des EPS ne sont généralement pas extraits et caractérisés (Nielsen and Jahn, 1999).

5.3. PURIFICATION DES EPS

Dans la plupart des études, aucune étape de purification des EPS n'est réalisée avant leurs analyses. Néanmoins, cette étape peut dans certains cas être ajoutée dans la procédure (Morgan *et al.*, 1991). Les étapes suivantes sont réalisées : extraction à chaud, précipitation des macromolécules dans alcool/acétone, rinçage et déshydratation dans acétone/pétrole. Dans le cas d'études spécifiques des polysaccharides, une étape de purification de ces composés dans l'alcool froid et la suppression des protéines par traitement avec des protéases ou par extraction au phénol peuvent être envisagées (Domenico *et al.*, 1989).

5.4. ANALYSE DES EPS

5.4.1. Les méthodes destructives

Dans ce cas, l'analyse réalisée sur les EPS constitue une étape après laquelle l'échantillon ne pourra pas être réutilisé pour d'éventuelles observations ou analyses complémentaires. Les analyses chimiques et certaines techniques de microscopie sont concernées.

a) Les analyses chimiques

Les analyses chimiques des polysaccharides sont essentiellement utilisées pour réaliser les analyses de sucres, les analyses de liaisons, les séquençages et la détermination de la configuration de certaines molécules. Pour cela, les techniques classiquement utilisées sont l'électrophorèse, la chromatographie en phase liquide (HPLC) et en phase gazeuse (CPG).

b) La microscopie électronique

La microscopie électronique à balayage (MEB) qui nécessite une fixation et une déshydratation de l'échantillon est utilisée pour étudier la structure fibrillaire des EPS et mettre en évidence leur implication dans la fixation des bactéries sur des supports et à la fixation des bactéries entre elles (Richards and Turner, 1984).

La microscopie électronique à transmission (MET) qui nécessite une certaine préparation de l'échantillon a également été utilisée dans le cadre d'études qui ont permis de montrer que les EPS avaient une structure fibrillaire dépendante de la composition chimique du polymère (Leppard *et al.*, 1996).

La microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE) permet en théorie d'effectuer des observations sur des échantillons hydratés, mais en réalité les échantillons sont déshydratés en fin d'observation. Cette technique est généralement utilisée pour réaliser les observations de biofilms et d'agrégats microbiens (Lavoie *et al.*, 1995 ; Surman *et al.*, 1996).

Le principal inconvénient de ces techniques d'analyse est la difficulté d'interprétation des observations et de la prise en compte des artefacts induits par la préparation des échantillons (fixation, déshydratation...).

5.4.2. Les méthodes non destructives

Dans ce cas, il est possible d'utiliser à nouveau l'échantillon pour d'éventuelles autres observations après analyses.

a) Spectroscopie Infrarouge (FT-IR)

Cette technique peut être utilisée pour étudier l'adhésion des bactéries et le développement des biofilms aussi bien que l'adsorption de polysaccharides isolés (Schmitt *et al.*, 1995 ; Nivens *et al.*, 1995). Elle a aussi été très utilisée pour étudier les processus de corrosion accélérée par les bactéries et leurs exopolymères.

b) Spectroscopie en résonance magnétique nucléaire (RMN)

Cette technique est indispensable dans l'étude des polysaccharides. Elle permet entre autre de contrôler la dégradation chimique de certains composés (Neu and Lawrence, 1999).

c) Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

D'après certaines comparaisons de techniques de microscopie, la CLSM est la plus performante pour étudier les biofilms (Surman *et al.*, 1996). Le principal avantage de cette technique est l'étude tridimensionnelle non destructive possible des biofilms à « l'état frais ».

L'analyse *in situ* des EPS repose sur l'utilisation de sondes plus ou moins spécifiques pour les molécules EPS ou pour les groupes chimiques caractéristiques des EPS. Les sondes utilisées en général sont des sondes pour polysaccharides, protéines et acides nucléiques. Par exemple, le calcofluorwhite et le rouge Congo sont utilisés pour révéler les polysaccharides beta-D-glucanes (Wood, 1980), le bleu Alcian pour révéler des molécules anioniques tels que les glycosaminoglycane (Wetzel *et al.*, 1997). Les lectines sont également utilisées par association au fluor pour établir la composition chimique de certains exopolymères. La lecture de la fluorescence est réalisée par microscopie en épi-fluorescence ou par CLSM.

Les anticorps constituent un second moyen pour mettre en évidence les polysaccharides. Ils ont été largement utilisés dans différents types d'écosystèmes. La technique est utilisable sur des polysaccharides purs afin de pouvoir fabriquer les anticorps spécifiques (par voie animale principalement). Il existe aussi des anticorps spécifiques pour les protéines. Ses anticorps sont actuellement utilisables en solution ou en gel mais ils n'ont pas encore été testés en biofilms (Neu and Lawrence, 1999).

6. Conclusion et perspectives d'études

Les études des exopolymères bactériens présentent de nombreux intérêts. Dans le cadre de cette synthèse, nous avons privilégié ceux qui sont en rapport avec les orientations de la recherche du BRGM.

Cette synthèse souligne la difficulté de la réalisation technique de telles études. Ceci résulte essentiellement de la complexité de l'organisation et de la composition des bio-agrégats. De tels travaux font appel à différents domaines de compétences de la microbiologie, de la biochimie et de la chimie, qu'il est nécessaire d'associer pour mener à bien une analyse rigoureuse du système complexe des EPS au sein des biofilms.

6.1. LES EXOPOLYMÈRES BACTÉRIENS ET LA LIXIVIATION

6.1.1. Synthèse de l'état actuel des connaissances

Dans le cadre des études de biolixiviation, *Acidithiobacillus ferrooxidans* a souvent été utilisé comme support et comme modèle d'étude.

Tout d'abord, les cellules de *A. ferrooxidans* s'adaptent au milieu en fonction de l'hydrophobicité de leur substrat par un changement de composition chimique des EPS libérés. Par ailleurs, les ions Fe^{3+} complexés avec les acides uroniques jouent un rôle crucial dans la dégradation de la pyrite et d'autres matériaux. Les produits de cette réaction sont les ions Fe^{2+} et le thiosulfate lequel est ensuite successivement oxydé par des réactions péri et/ou cytoplasmiques (Sand *et al.*, 1995 ; Schippers *et al.*, 1996). Le processus de dissolution ne commence que si les EPS des cellules vivantes sont complexés avec les ions Fe^{3+} .

Avec d'autres substrats tels que ZnS ou MnS_2 , les ions Fe^{3+} améliorent le taux de dissolution bien que le début de l'attaque du solide semble être obtenu par l'intermédiaire des protons. Dans ce cas, le soufre et non le thiosulfate est le principal intermédiaire (Sand and Gehrke, 1999).

Dans le cas du soufre élémentaire, les ions Fe^{3+} complexés aux EPS ne sont apparemment pas impliqués dans le processus de dégradation. D'autres mécanismes sont susceptibles d'être impliqués telle que l'excrétion d'exoenzymes probablement combinée avec l'excrétion d'agents émulsifiants (biosurfactants) comme les phospholipides (Sand and Gehrke, 1999). Une étude présente toutefois l'implication des ions Fe^{3+} dans la dégradation du soufre élémentaire (Sugio *et al.*, 1989).

Malgré l'ensemble des travaux réalisés, le rôle des ions Fe^{3+} dans la dégradation des sulfures reste encore à élucider.

6.1.2. Perspectives d'études

L'état actuel des connaissances souligne le rôle majeur que joue la « composante glucidique » des exopolymères bactériens dans le processus de lixiviation. Une grande partie des études a été réalisée en utilisant les micro-organismes suivants : *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans*. Dans le cadre de l'attaque de la pyrite, l'attachement des cellules sur le substrat semble indispensable. Les glucides et notamment des acides uroniques (ou glucuroniques) sont souvent présentés comme les composés qui permettent cette fixation sur la pyrite. Par ailleurs, dans le cas d'autres substrats tel que le soufre élémentaire, les glucides et les lipides semblent être des éléments essentiels aux processus de fixation et de lixiviation. Dans ce cas, seul le glucose est présent et serait donc susceptible de jouer un rôle intéressant avec les lipides qui ne sont pas encore réellement identifiés.

L'étude de l'attaque de la pyrite peut constituer un sujet de recherche en soi. Nous pouvons envisager d'**approfondir les connaissances sur la libération des acides glucuroniques par les bactéries, vérifier et comprendre la fixation des ions Fe^{3+} sur ces molécules et tester l'impact d'un tel complexe sur la stabilité de la pyrite et sur les caractéristiques physico-chimiques micro-environnementales.**

Par ailleurs, étant donné que la synthèse de ces molécules est influencée par les substrats, il serait aussi intéressant d'étudier le(s) mécanisme(s) pouvant être à l'origine de cette régulation. Pour cela, on peut envisager de tester des facteurs physico-chimiques de régulation directs mais aussi d'étudier la possible synthèse de molécules « chaperonnes » qui sont classiquement mises en évidence dans les processus de régulation et d'adaptation des fonctions microbiennes lorsque les cellules sont en condition de stress physiologique.

D'autres aspects de la biolixiviation nécessitent aussi un approfondissement des connaissances. Ils concernent notamment les caractéristiques de la fixation. Il a été observé lors d'études menées avec *A. ferrooxidans* que les bactéries se fixent préférentiellement dans certaines régions de la pyrite. **Il serait donc intéressant de savoir quels sont les facteurs qui orientent cette fixation vers des sites préférentiels et étudier les éventuels chimio- et magnéto-tactismes pouvant orienter le déplacement des bactéries et la formation d'amas cellulaires très localisés.**

Il apparaît également important de développer des études portant plus spécifiquement sur les enzymes bactériennes susceptibles d'intervenir dans l'attaque du substrat. Il est tout d'abord **nécessaire de caractériser au mieux les exo-enzymes sécrétées par les bactéries**, tester leur effet sur différents substrats afin de déterminer quelles sont les enzymes essentielles au processus de lixiviation et de définir leur rôle. Il serait également intéressant de tester leur effet dans différentes conditions en particulier en présence et en l'absence d'acides glucuroniques complexés au Fe^{3+} pour apprécier le véritable rôle fonctionnel de ce complexe.

Ceci ne constitue qu'un premier élément de réflexion sur les travaux qui peuvent être développés pour améliorer les connaissances relatives au rôle des exopolymères

bactériens dans la biolixiviation et aussi **dans le but éventuellement, à plus long terme, d'exercer un contrôle sur les processus de biolixiviation.**

6.2. DÉTOXIFICATION DES ENVIRONNEMENTS POLLUÉS EN MÉTAUX LOURDS

6.2.1. Rétention des métaux lourds par les EPS

En se plaçant dans un contexte plus large, les exopolysaccharides bactériens peuvent être étudiés dans le but de les utiliser dans les processus de détoxification des milieux contaminés.

En effet, de récents travaux ont montré qu'un certain nombre de polysaccharides sécrétés par des bactéries extrémophiles possèdent un pouvoir de rétention des métaux lourds. Ces études, réalisées à l'IFREMER, ont permis d'extraire des exopolysaccharides bactériens d'origine hydrothermale capables de fixer essentiellement le plomb, le zinc, le cadmium et le fer. La quantité de métaux fixés est relativement élevée. En effet, elle peut atteindre, pour le plomb par exemple, 350 mg Pb^{2+} /g de polymère. Par ailleurs, les molécules extraites ont le même comportement vis-à-vis de radioéléments, lanthanides et actinides. Les auteurs mettent donc en avant l'utilisation possible des biopolymères dans le domaine de la biodétoxification de milieux contaminés soit en tant que molécules isolées soit en association avec des bactéries productrices (Guezennec, 2001).

D'autres travaux ont également montré que les exopolymères des BSR sont capables d'interagir avec les métaux. En effet, de nombreux exopolymères agissent en tant que polyanions portant une charge qui est à l'origine de liaisons ionique et électrostatique avec des contre-ions dont les métaux (Beech and Cheung, 1995). Ainsi un grand nombre de métaux sont connus pour établir des « cross-link » avec les polysaccharides.

Certains auteurs rapportent également que la fraction protéique des EPS jouerait également une part importante dans la complexation des métaux. La séquestration dans un biofilm est aussi un autre moyen de réduire la mobilité des métaux, et pourrait être utilisée en bioremédiation (White and Gadd, 2000). La liaison des métaux se fait ainsi par la biomasse et/ou par les EPS. Il a de plus été démontré que des biofilms de BSR exposés à du cadmium ou à du cuivre accumulent du CdS ou du CuS (formes solides). Dans le cas du cuivre, la synthèse de polysaccharides et de protéines augmentent alors de 10 et 2 fois respectivement. Les métaux précipités adhèrent aux biofilms, mais ne semblent pas pénétrer à l'intérieur. Le piégeage des métaux par un biofilm semble donc être un bon moyen pour réduire la mobilité des métaux dans un environnement donné.

Sur cette base de connaissance, il serait intéressant d'étudier l'éventuelle potentialité et les caractéristiques de sorption d'éléments métalliques des exopolymères sécrétés dans des environnements particuliers. **Dans ce contexte, les études des propriétés des acides uroniques peuvent être envisagées afin de savoir si ces composés qui présentent l'aptitude à fixer les ions Fe^{3+} peuvent fixer d'autres ions métalliques.**

6.2.2. Utilisation de l'activité réductrice d'enzymes bactériennes

Des travaux récents ont mis en évidence la capacité de certaines enzymes bactériennes à réduire les métaux. Ces enzymes sont des protéines d'oxydo-réduction, de type cytochrome c_3 (Lovley and Phillips, 1994), hydrogénase (Michel *et al*, 2001), nitrite-réductase (DeMoll-Decker and Macy, 1993), etc. La réduction enzymatique de métaux tels que le chrome, le fer, le manganèse, l'uranium, etc. conduit à la précipitation de ces derniers, et représente ainsi un moyen de bio-détoxification des environnements pollués en métaux lourds.

Les travaux sur la réduction enzymatique des métaux ont été réalisés chez diverses bactéries aérobies ou anaérobies du sol, mais les études les plus importantes ont été faites chez les bactéries soufre- et sulfato-réductrices. L'intérêt de ces bactéries pour la bioremédiation des métaux lourds est d'ailleurs à l'origine des travaux du BRGM dans le cadre du projet européen METALBIOREDUCTION.

L'ensemble des résultats obtenus sur la bioremédiation des métaux -par les bactéries en général et par les BSR en particulier- suggèrent que toute protéine d'oxydo-réduction de bas potentiel redox est susceptible de posséder une activité de réduction des métaux. La majorité des enzymes métal-réductions étudiées jusqu'à présent pour la réduction des métaux sont localisées à l'intérieur de la cellule, mais des protéines telles que les cytochromes c_3 (chez les BSR) peuvent également être exprimées à la surface des cellules.

Parmi les EPS produits par les BSR, on trouve des enzymes qui n'ont pour l'instant fait l'objet d'aucune étude approfondie (Beech and Tapper, 1999). **L'étude et la caractérisation de ces biomolécules pourraient permettre de déterminer leur capacité à réduire différents métaux.** Cette étude pourrait bien évidemment être étendue aux enzymes sécrétées par d'autres bactéries.

Dans le cadre de la détoxification d'environnements pollués l'étude des EPS pourrait donc permettre de déterminer le rôle de chacun des biopolymères vis-à-vis des métaux. Ce type d'étude offre notamment la possibilité de mieux comprendre les facteurs régulant la production d'exopolymères par les bactéries et donc d'optimiser la synthèse de ces biomolécules qui pourraient être utilisées à des fins de détoxification d'environnements pollués. Il est également possible d'envisager de surproduire les EPS d'intérêt afin de les utiliser en tant que molécules isolées.

Bien sûr, ceci ne constitue qu'une première piste et donne l'ouverture à des travaux sur d'autres micro-organismes et d'autres biomolécules excrétées.

6.3. LUTTE CONTRE LA FORMATION DE BIOFILMS NÉFASTES

L'excrétion de molécules par les bactéries est largement impliquée dans la formation des biofilms. Nous avons vu précédemment que ces exopolymères peuvent avoir de nombreuses applications possibles, notamment dans la biolixiviation et dans la détoxification des milieux pollués en métaux lourds. Dans ces cas, la formation des biofilms peut être considérée comme une « organisation » qui est positive et qui présente des intérêts. En revanche, dans certains cas, la formation de biofilms et les actions bactériennes directes ou indirectes (par l'intermédiaire des EPS) qui en résultent sont néfastes. Il est alors nécessaire de mettre en place des moyens afin de les éviter. Par exemple, dans le secteur de l'industrie et du biomédical, le développement de bactéries et la formation de biofilms peuvent entraîner des colmatages de filtres et la corrosion de canalisations ou autres structures métalliques. Ces problèmes concernent essentiellement l'industrie agroalimentaire, le secteur de la santé, les réseaux de distribution et de traitement des eaux, l'industrie pétrolière, la géothermie et l'industrie nucléaire.

Dans ces situations, il est important de pouvoir lutter contre la formation des biofilms. Ceci met en évidence une autre utilisation possible qui peut résulter de la connaissance de la mise en place des biofilms, de ses propriétés et des mécanismes d'adhésion des micro-organismes.

6.4. INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

Quelques équipes françaises travaillant directement sur les EPS ou étant susceptibles de posséder un savoir-faire scientifique et technique utile au développement de travaux de recherche sur la thématique des exopolymères bactériens sont référencées dans la liste suivante :

- LSGC, CNRS de Nancy
- IFREMER de Brest
- IPGP, LMC de Paris Jussieu
- LGC, CNRS - Université de Picardie Jules Verne
- LPBM-SAM, CNRS de Rouen
- URLGA, INRA - DRJ de Jouy en Josas
- CBM, CNRS d'Orléans

Quelques sites internet français :

<http://www.ensic.u-nancy.fr/ENSIC/LSGC/fr/gpba.htm>

<http://www.sciences-ouest.org>

<http://www.univ-rouen.fr/pbm>

<http://www.u-picardie.fr>

<http://web.cnrs-orleans.fr>
<http://www.theochem.uni-duisburg.de/AMB/conf.html>
<http://www.ifremer/drvvpbm/polymeres%20marins.htm>
http://www-dta.cea.fr/home_cerem.htm
<http://www-dta.cea.fr/CEREM/FR/Pages/corrosion/bacterie.htm>

Autres sites étrangers qui présentent en particulier les EPS dans les biofilms et qui proposent un modèle simulant la formation des biofilms, modèle qui prend en compte la production d'EPS :

<http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/kreft/eps.html>
<http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/kreft/bacsim.html>
http://www.umr.edu/~environ/faculty/xzhang_resume.html
<http://www.erc.montana.edu/CBEssentials-SW>
<http://ww2.mcgill.ca/bisorption/publication/index.htm>

Références bibliographiques

- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995) - Phylogenic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, p. 143-169.
- Bale M.J., Fry J.C., Day M.J. (1988) - Transfer and occurrence of large mercury resistance plasmids in river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, p. 972-978.
- Beech I.B. and Tapper R.C. (1999) - Exopolymers of sulphate-reducing bacteria. In : Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (eds) Microbial extracellular polymeric substances. Springer-Verlag, Berlin, p. 119-126.
- Beech I.B. and Cheung C.W.S. (1995) - Interactions of exopolymers produced by sulphate-reducing bacteria with metals ions. *Int. Biodet. Biodeg.*, p. 59-72.
- Beech I.B. and Gaylarde C.C. (1991) - Microbial polysaccharides and corrosion. *Int. Biodeterior.*, 27, p. 95-107.
- Beech I.B., Gaylarde C.C., Smith J.J., Geesey G.G. (1991) - Extracellular polysaccharides from *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence of mild and stainless steel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, p. 65-71.
- Beveridge T.J. (1999) - Structures of Gram-negative cell walls and their derived membranes vesicles. *J. Bacteriol.*, 181(16), p. 4725-4733.
- Binet R., Létoffé S., Ghigo J.M., Delepaire P. and Wandersman C. (1997) - Proetin secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters- a review. *Gene*, 192, p. 7-11.
- Brown M.J. and Lester J.N. (1980) - Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, p. 179-185.
- Bryant R.D., Costerton J.W., Laishley E.J. (1984) - The role of *Thiobacillus albertis* glycocalix in the adhesion of cells to elemental sulfur. *Can. J. Microbiol.*, 30, p. 81-90.
- Burns R.G. (1989) - Microbial and enzymic activities in soil biofilms. In: C Characklis W.G. and Wilderer P.A. (eds) Structure and function of biofilms. Wiley, Chichester, p. 333-349.
- Chan C.P. (1993) - The effect of Fe, Cr and Mo on growth and exopolymer production of sulphate-reducing bacteria. PhD thesis. University of Portsmouth, UK.
- Characklis W.G. and Wilderer P.A. (1989) - Glossary. In: C Characklis W.G. and Wilderer P.A. (eds) Structure and function of biofilms. Wiley, Chichester, p. 369-371.
- DeMoll-Decker H. and Macy J.M. (1993) - The periplasmic nitrite reductase of *Thaueria selenatis* may catalyse the reduction of selenite to elemental selenium. *Arch. Microbiol.*, 160, p. 241-247.

- Domenico P., Diesrich D.L., Cunha B.A. (1989) - Quantitative extraction and purification of exopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Microbiol. Methods*, 9, p. 211-219.
- Escobar B., Huerta G. and Rubio J. (1997) - Influence of lipopolysaccharides on the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to minerals. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 13, p. 593-594.
- Feio M.J., Beech I.B., Carepo M., Lopes J., Cheung C.W.S., Franco R., Guezennec J., Smith J., Mitchell J., Moura J.G., Lino A.R. (1998) - Isolation and characterisation of a novel sulphate-reducing bacterium of the *Desulfovibrio* genus. *Anaerobe*, 4, p. 117-130.
- Filloux A., Michel G. and Bally M. (1998) - GSP-dependant protein secretion in Gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22, p. 177-198.
- Foley I. and Gilbert P. (1996) - Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling*, 10, p. 331-346.
- Forster C.E. and Clarke A.R. (1983) - The production of polymer from activated sludge by ethanolic extraction and its relation to treatment plant operation. *Wat. Pollut. Contr.*, 82, p. 430-433.
- Geesey G.G. (1982) - Microbial exopolymers : ecological and economic considerations. *ASM News*, 48, p. 9-14.
- Grossman J.P. and Postgate J.R. (1955) - The metabolism of malate and other compounds by *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Gen. Microbiol.*, 12, p. 429-434.
- Guezennec J. (2001) - Les exopolysaccharides bactériens d'origine hydrothermale : un exemple de valorisation de micro-organismes extrêmophiles., p. 22-24.
- Hardy J.A. and Hamilton W.A. (1981) - The oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria isolated from the North Sea waters. *Curr. Microbiol.*, 6, p. 259-262.
- Heys S.J.D., Gilbert P., Eberhard A., Allison D.G. (1997) - Homoserine lactones and bacterial biofilms. In: Wimpenny J., Handley P., Gilbert P., Lappin-Scott H., Jones M. (eds) *Biofilms: community interactions and control*. BioLine, Cardiff p. 103-112.
- Higgins M.J. and Novak J.T. (1997) - Characterization of exocellular protein and its role in biofloculation. *J. Environ. Eng.*, 123, 479-485.
- Iverson W.P. (1987) - Microbial corrosion of metals. *Adv. Appl. Microbiol.*, 3 p. 1-13.
- Jahn A. and Nielsen P.H. (1998) - Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Wat. Sci. Tech.*, 3 p. 17-24.
- Kang H. (1998) - Characterisation of bacterial exopolymers using analytical techniques. PhD thesis. University of Portsmouth, UK.
- Kinzler K., Gehrke T., Telegdi J. and Sand W. (in press) - Bioleaching -a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS)
- Lall S.D., Eribo B.E., Jay J.M. (1989) - Comparison of four methods for extracting periplasmic proteins. *J. Microbiol. Methods*, p. 195-199.

- Lassen C., Ploug H., Jørgensen B.B (1992) - A fibre optic scalar irradiance microsensors: application for spectral light measurements in sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 8 p. 247-254.
- Lavoie D.M., Little B.J., Ray R.I., Bennett R.H., Lambert M.W., Asper V., Baerald R.J. (1995) - Environmental scanning electron microscopy of marine aggregates. *J. Microsc.*, 17, p. 101-106.
- Leppard G.G., Heissenberger A., Herndl G.J. (1996) - Ultrastructure of marine snow. I. Transmission electron microscopy methodology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 13, p. 289-298.
- Lisle J.T. and Rose J.B. (1995) - Gene exchange in drinking water and biofilms by natural transformation. *Wat. Sci. Tech.*, 31, p. 41-46.
- Lovley D.R. and Philips E.J.P. (1994) - Novel processes for anaerobic sulfate production from elemental sulfur by sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, p. 2394-2399.
- Michel C., Brugna M., Aubert C., Bernadac A. and Bruschi M. (2001) - Enzymatic reduction of chromate : comparative studies using sulfate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, p. 95-100.
- Morgan J.W., Evison L.M., Forster C.F. (1991) - An examination into the composition of extracellular polymers extracted from anaerobic sludges. *Trans IChemE Part B*, 69, p. 231-136.
- Neu T.R. and Lawrence J.R. (1999) - In situ characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm systems. In : Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (eds) *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer-Verlag, Berlin, p. 22-47.
- Neu T.R. (1996) - Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.*, 60, p. 151-166.
- Nielsen P.H. and Jahn A. (1999) - Extraction of EPS. In: Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (eds) *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer-Verlag, Berlin, p. 49-72.
- Nivens D.E., Palmer R.J. Jr, White D.C. (1995) - Continuous non-destructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques. *J. Induct. Microbiol.*, 15, p. 263-276.
- Ochynski F.W. and Postgate J.R. (1963) - Some biological differences between fresh water and salt water strains of sulphate reducing bacteria. In: Oppenheimer C.H. (eds) *Marine microbiology III*. Thomas, Springfield, p. 426-441.
- Platt R.M., Geesey G.G., Davis J.D., White D.C. (1985) - Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium. *Can. J. Microbiol.*, 31, p. 675-680.
- Read R.R. and Costerton J.W. (1987) - Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Microbiol.*, 33, p. 1080-1090.

- Richards S.R. and Turner R.J. (1984) - A comparative study of techniques for the examination of biofilms by scanning electron microscopy. *Wat. Res.*, 18, p. 767-773.
- Sand W. and Gehrke T. (1999a) - Analysis and function of the EPS from the strong acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (eds) Microbial extracellular polymeric substances. Springer-Verlag, Berlin, p. 127-141.
- Sand W., Gehrke T., Jozsa P.G., Schippers A. (1999b) - Direct versus indirect bioleaching. In: Amils R. and Ballester A. (eds) Biohydrometallurgy and the environment toward the minig of the 21st century Part A. Elsevier, Amsterdam, p. 27-49.
- Sand W., Gehrke T., Hallmann R., Schippers A. (1995) - Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism -acritical evaluation of bacterial leaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, p. 961-966.
- Sand W., Rohde K., Sobotke B., Zenneck C. (1992) - Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, p. 85-92.
- Schippers A., Jozsa P.G., Sand W. (1996) - Sulfur chemistry of bacterial leaching of pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, p. 3424-3431.
- Senez J.C. (1953) - The activity of anaerobic sulphate-reducing bacteria in semi autotrophic cultures. *Ann. Inst. Pasteur*, 84, p. 595-603.
- Schmitt J. Nivens D., White D.C., Flemming H.C. (1995) - Changes of biofilm properties in response to sorbed substances -an FTIR-ATR study. *Water Sci. Technol.*, 32, p. 149-155.
- Shmidt M.A. and Jann K. (1982) - Phospholipid substitution of capsular (K) polysaccharide antigens from *Escherichia coli* causing extraintestinal infections? *FEMS Microbiol. Lett.*, 14, p. 69-74.
- Stickler D.J., Morris N.S., McLean R.J.C., Fuqua C. (1998) - Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, p. 3486-3490.
- Sugio T., Katagiri T., Inagaki K., Tano T. (1989) - Actual substrate for elemental sulfur : ferric ion oxidoreductase purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* 973, p. 250-256.
- Surman S.B., Walker J.T., Goddard D.T., Morton L.H.G, Keevil C.W., Weaver W., Skinner A., Hanson K., Caldwell D., Kurtz J. (1996) - Comparison of microscopic techniques for examination of biofilms. *J. Microbiol. Meth.*, 25, p. 57-70.
- Tago Y. and Aida K. (1977) - Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, p. 306-314.
- Wetzel R.G., Ward A.K., Stock M. (1997) - Effects of natural dissolved organic matter on mucilaginous matrices of biofilm communities. *Arch. Hycrobiol.*, 139, p. 289-299.
- White C. and Gadd G.M. (2000) - Copper accumulation by sulfate-reducing bacterial biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 183, p. 313-318.

- Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (1999) - What are bacterial extracellular polymeric substances ? In : Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (eds) Microbial extracellular polymeric substances. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-19.
- Wood P.J. (1980) - Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 85, p. 271-287.
- Zayas J.F. (1997) - Functionality of proteins in food. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Zinkevich V., Bogdarina I., Kang H., Hill M.A.W., Tapper R. and Beech I.B. (1996) - Characterization of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria. *Int. Biodet. Biodeg.*, 37, p. 163-172.

BRGM
SERVICE ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL ET PROCÉDÉS INNOVANTS
Unité Biotechnologies

BP 6009 - 45060 Orléans cedex 2 - France - Tél. : 33 (0)2 38 64 34 34