

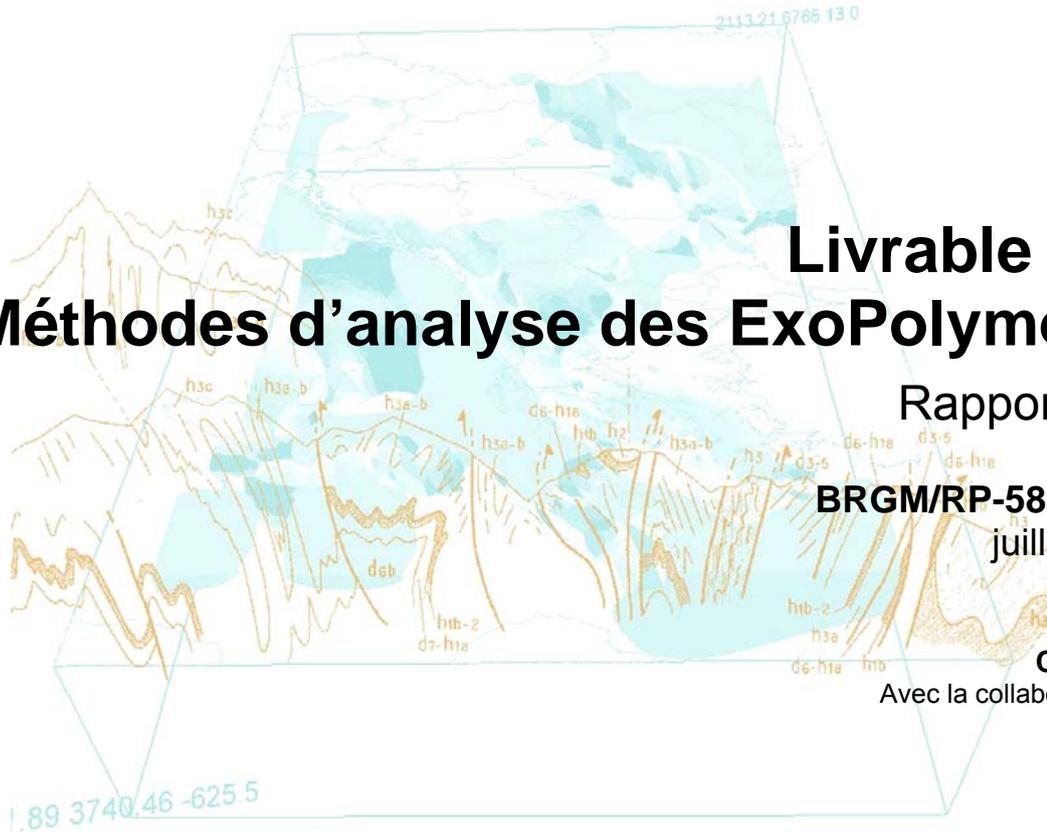


# Livrable D6 - Méthodes d'analyse des ExoPolymères

Rapport final

BRGM/RP-58782-FR  
juillet 2010

C. Michel  
Avec la collaboration de  
E. Roche



Étude réalisée dans le cadre des projets de Recherche du BRGM.

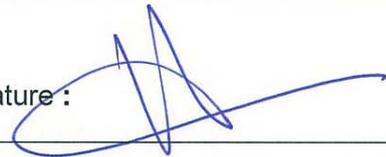
Ce document a été vérifié par : GARRIDO Francis date : 31/07/2010

**Approbateur :**

Nom : GABORIAU

Date : Hervé

Signature :



Le système de management de la qualité du BRGM est certifié AFAQ ISO 9001:2008.

**Mots clés :** Arsenic, Exopolymères, *Thiomonas arsenivorans*, Pouzzolane, Fluorescence.

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

**MICHEL C.** (2010) – Méthodes d'analyses des exopolymères bactériens. Rapport BRGM/RP-58782-FR, 18 p., 4 fig., 3 tabl.

## Synthèse

Dans le cadre du projet COBIAS, il s'agit de développer des méthodes d'analyses et de caractérisation du biofilm formé par la souche *Thiomonas arsenivorans* pour le traitement des eaux et effluents contaminés par de l'arsenic.

Les EPS (ExoPolymeric Substances) sont des constituants majeurs des biofilms, et ils jouent un rôle phare dans l'adhésion, la formation et la structure d'un biofilm, mais aussi dans ses propriétés (d'adsorption de polluants, capacité de résistance à diverses molécules toxiques, comme les antibiotiques, les métaux lourds...). Les EPS sont principalement composés de biomolécules de type glucide, lipide, protéine, acide uronique, acide nucléique... sécrétées par les bactéries.

Il est donc important, dans le cadre de l'utilisation du biofilm de *Thiomonas arsenivorans* en bioréacteur pour le traitement d'eaux polluées par de l'arsenic, de mieux caractériser le biofilm de cette bactérie, du point de vue de sa composition notamment, et donc d'étudier les EPS de ce biofilm. Il s'agit de définir le rôle de chacune des familles d'EPS dans la structure du biofilm formée par cette bactérie sur un support de pouzzolane.

Les travaux sur le rôle des EPS au sein du biofilm de *T. arsenivorans* sur support de pouzzolane, ont mis en évidence le rôle des EPS glucidiques et lipidiques dans l'intégrité de la structure du biofilm de cette souche bactérienne. Ils ont également permis de mettre au point un certain nombre de techniques et protocole d'étude des EPS.

# Sommaire

<b>1. Introduction</b> .....	5
<b>2. Matériels et Méthodes</b> .....	7
2.1. PRINCIPE DE L'ETUDE .....	7
2.2. TESTS DE TOXICITE .....	8
2.3. VALIDATION DU TEST UTILISANT LA PROTEASE .....	8
2.4. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE A FLUORESCENCE .....	9
<b>3. Résultats</b> .....	10
3.1. ETUDE DES EPS AU SEIN DU BIOFILM SELON L'APPROCHE 1 .....	10
3.2. ETUDE DES EPS AU SEIN DES BIOFILMS SELON L'APPROCHE 2.....	11
3.3. REPARTITION DES EPS GLUCIDIQUES AU SEIN DU BIOFILM.....	13
<b>4. Conclusions</b> .....	16
<b>5. Bibliographie</b> .....	17

## Liste des figures

Figure 1 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12 % permettant de vérifier que la pronase est bien active dans les conditions expérimentales choisies pour cette étude.....	8
Figure 2 : Test de toxicité selon l'approche n° 1. Effet de la présence d'acide périodique, du calcofluor et des lectines ConA et PNA, sur la croissance et la capacité d'oxydation de l'As(III) de CAsO1 (principalement composé de T. arsenivorans)....	10
Figure 3 : Test de toxicité selon l'approche n° 1. Effet de la présence de protéase, DNase et lipase sur la croissance et la capacité d'oxydation de l'As(III) de CAsO1 (principalement composé de T. arsenivorans).....	11
Figure 4 : Grain de pouzzolane (< 100 µm) colonisé par T. arsenivorans (culture de 11 jours avec 2 renouvellements de milieu).....	15

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Traitements utilisés pour cette étude et EPS ciblés. ....	7
Tableau 2 : Influence des traitements chimiques et enzymatiques sur la viabilité de <i>T. arsenivorans</i> . ....	12
Tableau 3 : Effet de traitements chimiques et enzymatiques sur un biofilm formé par <i>Thiomonas arsenivorans</i> sur pouzzolane, en fonction de l'âge du biofilm. ....	12

# 1. Introduction

Dans le cadre du projet COBIAS, il s'agit de développer des méthodes d'analyses et de caractérisation du biofilm formé par la souche *Thiomonas arsenivorans* pour le traitement des eaux et effluents contaminés par de l'arsenic.

Les EPS (ExoPolymeric Substances) sont des constituants majeurs des biofilms, et ils jouent un rôle phare dans l'adhésion, la formation et la structure d'un biofilm, mais aussi dans ses propriétés (d'adsorption de polluants, capacité de résistance à diverses molécules toxiques, comme les antibiotiques, les métaux lourds...). Les EPS sont principalement composés de biomolécules de type glucide, lipide, protéine, acide uronique, acide nucléique... sécrétées par les bactéries.

Il est donc important, dans le cadre de l'utilisation du biofilm de *Thiomonas arsenivorans* en bioréacteur pour le traitement d'eaux polluées par de l'arsenic, de mieux caractériser le biofilm de cette bactérie, du point de vue de sa composition notamment, et donc d'étudier les EPS de ce biofilm. Des travaux sur le biofilm de *Thiomonas arsenivorans* sur pouzzolane ont déjà été initiés au BRGM (Michel et al., 2007). La pouzzolane est le support de croissance utilisé pour le développement du biofilm en bioréacteur à lit fixe pour plusieurs raisons : elle est inerte, son coût est peu élevé, et elle a une grande surface spécifique. Les travaux réalisés avaient ainsi montré que la colonisation de la pouzzolane par *T. arsenivorans* était hétérogène dans les premiers jours de développement du biofilm, que les EPS produits par cette souche étaient principalement des exopolysaccharides, que l'activité d'oxydation de l'As(III) chez cette souche était induite par l'As(III), et que la structure du biofilm semblait limiter l'accès de l'arsenic vers les couches profondes du biofilm.

L'objectif du travail du BRGM sur les EPS de *Thiomonas arsenivorans* dans le cadre du projet COBIAS est de définir le rôle de chacune des familles d'EPS dans la structure du biofilm formée par cette bactérie sur pouzzolane.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. PRINCIPE DE L'ÉTUDE

Suite à une étude bibliographique, une série de protocoles a été sélectionnée pour mettre en évidence la fonction de chacune des familles d'EPS dans la formation d'un biofilm de *Thiomonas arsenivorans*. Ces protocoles font intervenir des traitements chimiques ou enzymatiques qui vont dégrader ou neutraliser spécifiquement une famille d'EPS (tableau 1). Ainsi, si, suite à l'application d'un traitement, le biofilm est affecté, on peut en déduire que la famille d'EPS ciblée par le traitement est impliquée dans la formation du biofilm.

Traitement appliqué	Référence du produit	Famille d'EPS ciblée	Cible	Concentration	Référence
<b>Protéase</b>	Protease (Pronase) from <i>Streptomyces griseus</i> (81748, Sigma)	Protéine	Liaison peptidique	1 mg/mL	Quintero et Weiner, 1995
<b>Lectine Con A</b>	Lectin-Fluorescein isothiocyanate conjugate from <i>Canavalia ensiformis</i> (61761, Sigma)	Glucide	$\alpha$ -D-mannose terminal	50 $\mu$ g/mL	Szwajcer <i>et al.</i> , 2006
<b>Lectine PNA</b>	Lectin from <i>Arachis hypogaea</i> (peanut) (L7381, Sigma). FITC conjugates	Glucide	$\beta$ -galactose(1-3)N-acétylgalactosamine	50 $\mu$ g/mL	Szwajcer <i>et al.</i> , 2006
<b>Calcofluor</b>	Fluorescent brightener 28 (calcofluor white M2R) (F3543, Sigma)	Glucide	(1-3)- $\beta$ et (1-4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl	80 $\mu$ g/mL	Quintero et Weiner, 1995
<b>DNase (+ 4.2 mM Mg<sup>2+</sup>)</b>	Deoxyribonucléase 1 from bovine pancreas (D4263, Sigma)	ADN	Liaison nucléique	20 $\mu$ g/mL	Allesen-Holm <i>et al.</i> , 2006
<b>Lipase</b>	Lipase from <i>Chromobacterium viscosum</i> (L0763)	Lipide	Triglycéride	40 $\mu$ g/mL	Cette étude
<b>Acide périodique</b>	HIO <sub>4</sub> (P7875, Sigma)	Glucide	Glycol	0.2M	Quintero et Weiner, 1995

Tableau 1 : Traitements utilisés pour cette étude et EPS ciblés.

À partir de cette étude bibliographique, et dans le cadre du projet COBIAS, deux approches ont été envisagées pour étudier l'influence de ces traitements sur des biofilms de *T. arsenivorans* :

- la **première approche** consiste à cultiver la souche en présence des composés cités dans le tableau 1, et de voir la capacité de ces composés à **empêcher le biofilm de se former** ;
- la **seconde approche** consiste à faire croître un biofilm, et à voir ensuite la capacité des composés du tableau 1 à **décrocher un biofilm déjà formé**.

## 2.2. TESTS DE TOXICITÉ

Pour ces deux approches, il est nécessaire de réaliser au préalable des tests de toxicité afin de vérifier que les traitements appliqués n'aient pas d'impact sur la viabilité de la souche étudiée, ce qui fausserait l'interprétation des résultats. Ces tests de toxicité ont été réalisés sur une culture de *T. arsenivorans* à l'état planctonique : en effet, les cellules planctoniques sont plus sensibles aux agressions environnementales que les cellules sessiles, il est donc préférable de réaliser les tests de toxicité sur ces cellules de manière à ne pas sous-estimer la toxicité de ces traitements.

La viabilité des cellules est suivie par :

- dénombrement de la biomasse : comptage des bactéries en cellule de Thoma ;
- mesure de pH : l'activité d'oxydation de l'As(III) en As(V) génère des protons ; l'oxydation de l'arsénite s'accompagne donc d'une acidification du milieu ;
- coloration Live/Dead : ce test permet de différencier les bactéries vivantes des bactéries mortes.

## 2.3. VALIDATION DU TEST UTILISANT LA PROTEASE

Afin de s'assurer que le test de la pronase était fonctionnel dans nos conditions opératoires, la capacité de la pronase à hydrolyser des protéines dans les conditions du test (incubation d'une heure à température ambiante, à une concentration d'enzyme de 1 mg/mL) a été testée afin de s'assurer que l'enzyme est bien active. Les tests ont été réalisés sur deux protéines : la BSA et le cytochrome  $c_3$ .

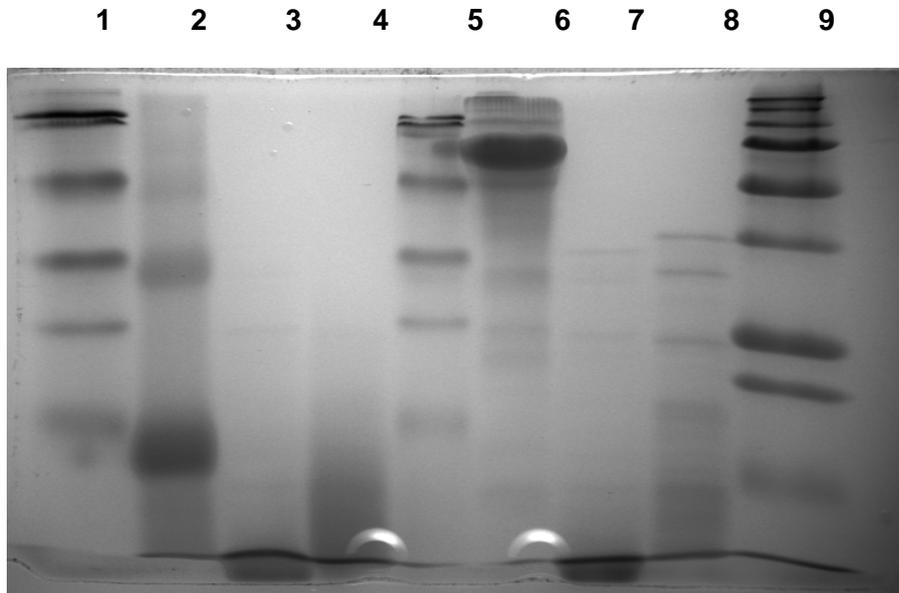


Figure 1 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% permettant de vérifier que la pronase est bien active dans les conditions expérimentales choisies pour cette étude.

1 et 5 : prestained molecular weight ; 2 : Cytochrome  $c_3$  ; 3 : cytochrome  $c_3$  + pronase concentrée ; 4 : cytochrome  $c_3$  + pronase diluée ; 6 : BSA ; 7 : BSA + pronase concentrée ; 8 : BSA + pronase diluée ; 9 : Precision Plus molecular weight. Coloration au bleu de Coomassie.

Les résultats montrent que la pronase hydrolyse ces enzymes dans les conditions citées ci-dessus (Figure 1), dans la mesure où la bande correspondant à la protéine (piste 2 et 6 pour le cytochrome  $c_3$  et la BSA, respectivement) disparaît en présence de l'enzyme (laissant apparaître dans certains cas la présence de peptides de plus petits poids moléculaires). La pronase peut donc bien être utilisée pour nos expérimentations pour étudier la présence ou non d'EPS protéiques dans les biofilms de *T. arsenivorans*.

## **2.4. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE À FLUORESCENCE**

Un certain nombre de coloration (des bactéries ou des exopolysaccharides) par des marquages fluorescents a été réalisé et effectué grâce à un microscope fluorescent (Zeiss-Axio Imager Z1).

- Afin de vérifier la viabilité des cellules, un comptage des bactéries après coloration avec le kit Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability kit (Molecular Probes, Kit L-13152) est réalisé.
- Afin de visualiser l'ensemble des bactéries, une coloration au DAPI est réalisée.
- Afin de visualiser les EPS de type glucidique, un marquage par des lectines marquées a été réalisé.

### 3. Résultats

#### 3.1. ÉTUDE DES EPS AU SEIN DU BIOFILM SELON L'APPROCHE 1

Il s'agit ici de tester la capacité de traitements biologiques et chimiques à empêcher le biofilm de se former. Le principe consiste ainsi à incuber les bactéries avec les différents traitements sélectionnés dès la phase d'ensemencement, et de suivre la capacité des bactéries à se fixer à la pouzzolane malgré l'application des traitements.

La première étape du travail a consisté à effectuer un test de toxicité afin de vérifier la viabilité des cellules et leur capacité à se diviser et à croître en présence des différents traitements.

Pour la réalisation de ces tests de toxicité, les bactéries sont ensemencées dans du milieu neuf (milieu de culture CAsO1, 10 % v/v) en présence de chacun des composés aux concentrations indiquées dans le tableau 1. La croissance bactérienne (comptage cellule de Thoma) et le pH (indicateur de l'oxydation de l'As(III)) sont suivis au cours du temps. Ce suivi permet d'évaluer la toxicité de chacun des composés sur la souche étudiée. Les résultats sont présentés en Figure 2 et Figure 3.

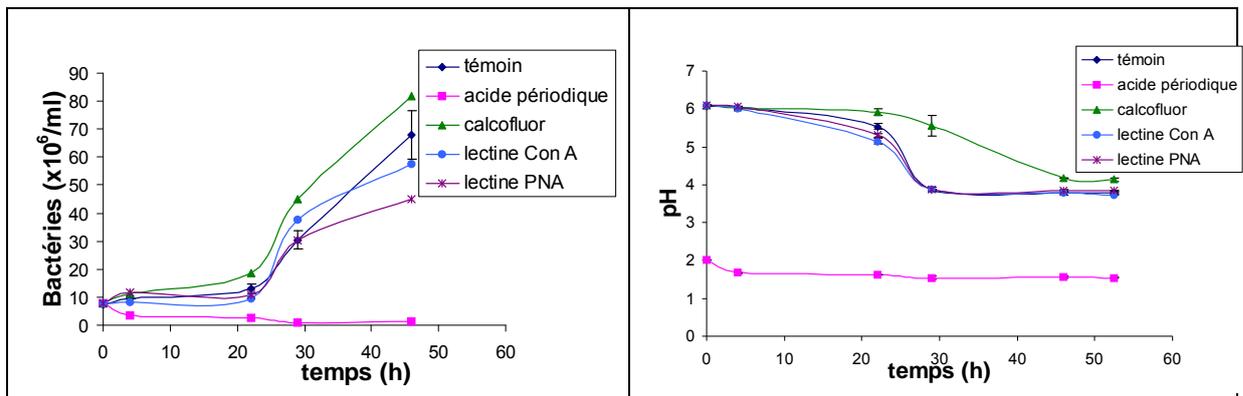


Figure 2 : Test de toxicité selon l'approche n° 1. Effet de la présence d'acide périodique, du calcofluor et des lectines ConA et PNA, sur la croissance et la capacité d'oxydation de l'As(III) de CAsO1 (principalement composé de *T. arsenivorans*)

Les résultats montrent que l'acide périodique entraîne immédiatement une acidification du milieu qui inhibe totalement la croissance bactérienne. Ce traitement ne peut pas être utilisé pour cette étude. En présence de calcofluor, la diminution de pH classiquement observée est ralentie ; l'utilisation de calcofluor dans ces conditions n'est donc pas totalement adaptée pour un suivi correct de l'oxydation de l'arsenic et donc de la croissance bactérienne.

La présence de pronase affecte de manière significative la croissance bactérienne. Ce traitement n'est pas utilisable pour cette étude. En présence de DNase et de lipase, on observe une acidification plus rapide du milieu ; dans ces conditions d'utilisation, la DNase et la lipase ne permettent donc pas un suivi correct de l'oxydation de l'As(III).

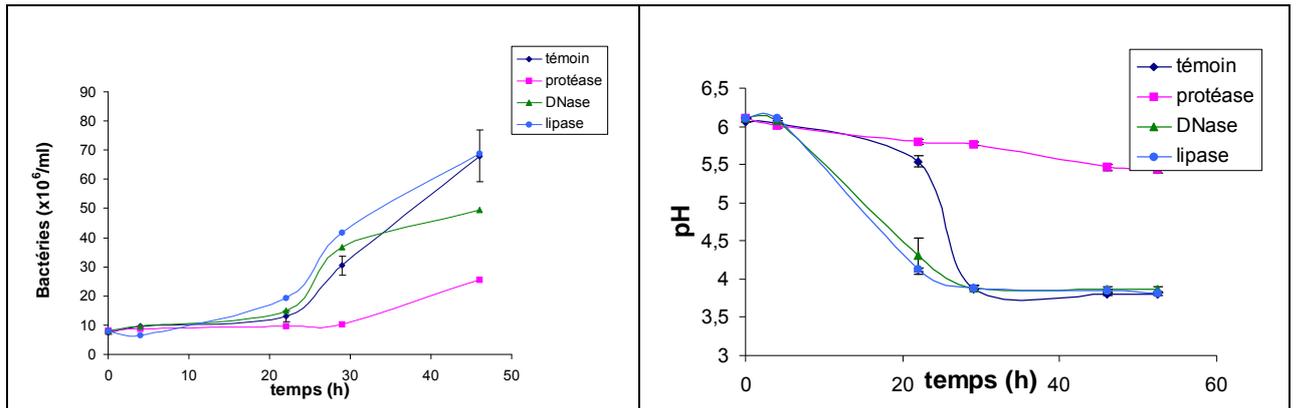


Figure 3 : Test de toxicité selon l'approche n° 1. Effet de la présence de protéase, DNase et lipase sur la croissance et la capacité d'oxydation de l'As(III) de CASO1 (principalement composé de *T. arsenivorans*)

En conclusion, ni l'acide périodique ni la pronase ne peuvent être utilisées pour cette approche, et la présence de calcofluor, de DNase et de lipase a un impact sur le suivi du pH. Par conséquent, cette approche semble peu adaptée pour une étude correcte de la croissance d'un biofilm par *T. arsenivorans* et du rôle des EPS dans la formation de ce biofilm. L'approche 1 a ainsi été abandonnée.

### 3.2. ÉTUDE DES EPS AU SEIN DES BIOFILMS SELON L'APPROCHE 2

Il s'agit ici de tester la capacité de traitements biologiques et chimiques à décrocher un biofilm déjà formé. Pour cette étude, des biofilms d'âges différents ont été cultivés (en condition batch avec renouvellement d'une partie du milieu de culture tous les 2-3 jours), et soumis aux traitements décrit précédemment pendant 1 heure (6 heures dans le cas du calcofluor) (cf. Matériels et Méthodes). Après traitement, le nombre de bactéries décrochées est déterminé et comparé au nombre de bactérie décrochées en absence de traitement afin de déterminer un facteur de décrochage.

Le test de toxicité est réalisé sur une culture de *T. arsenivorans* âgée de 48 heures (croissance sur milieu minimum CASO1, en conditions statiques, à 25 °C, en tant que cellule planctonique). Les bactéries sont incubées 1 heure (6 heures dans le cas du calcofluor) avec chacun des composés décrits (Tableau 1). Après incubation, les bactéries sont soumises à la coloration LIVE/DEAD afin de déterminer la toxicité de chaque traitement (Tableau 2).

L'acide périodique, probablement parce qu'il conduit à une chute de pH instantanée et forte, entraîne la mort des bactéries, et n'est donc pas utilisable pour ce type d'étude, avec cette bactérie.

Les autres traitements n'ont pas d'effet négatif sur la viabilité des cellules (les valeurs obtenues pour les traitements sont comparables à celle obtenue pour le témoin sans traitement). Il est donc possible d'utiliser ces traitements pour étudier les EPS impliqués dans l'intégrité d'un biofilm de *T. arsenivorans*.

Des biofilms de *T. arsenivorans* formés sur pouzzolane, en conditions statiques, en milieu minimum (milieu CASO1), à 25 °C, avec renouvellement du milieu toutes les 48

heures, et âgés de 4, 6 et 8 jours, sont soumis aux traitements décrits dans le Tableau 1.

Traitement appliqué	Durée du traitement (h)	Pourcentage de bactéries vivantes après traitement (%)
Témoin (pas de traitement)	1 et 6	79
Protéase	1	70
Lectine Con A	1	87
Lectine PNA	1	75
Calcofluor	6	75
DNase (+ 4.2 mM Mg <sup>2+</sup> )	1	80
Lipase	1	95
Acide périodique	1	0

Tableau 2 : Influence des traitements chimiques et enzymatiques sur la viabilité de *T. arsenivorans*.

La viabilité des bactéries a été déterminée grâce au LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability kit (Molecular Probes, Kit L-13152).

Traitement appliqué	Facteur de décrochage		
	Biofilm âgé de 4 jours	Biofilm âgé de 6 jours	Biofilm âgé de 8 jours
Protéase	1	1	1
Lectine Con A	2 ± 0.7	1	1
Lectine PNA	2.75 ± 0.65	1	1
Calcofluor	1.85 ± 0.15	1.75 ± 0.45	1.65 ± 0.25
DNase (+ 4.2 mM Mg <sup>2+</sup> )	1	1	1
Lipase	2.7 ± 0.3	1.5 ± 0.23	2.3 ± 0.9

Tableau 3 : Effet de traitements chimiques et enzymatiques sur un biofilm formé par *Thiomonas arsenivorans* sur pouzzolane, en fonction de l'âge du biofilm.

Le facteur de décrochage correspond à la quantité de bactéries décrochées après traitement par rapport à la quantité de bactéries décrochées en absence de traitement (témoin). Expérimentations répétées en duplica.

Les résultats montrent qu'*a priori*, aucun EPS de type protéine ou acide nucléique ne semble être impliqué dans l'intégrité du biofilm durant les premières phases de développement d'un biofilm par *T. arsenivorans* (i.e. biofilm âgé de 8 jours maximum) (Tableau 3). Des lipides extracellulaires semblent par contre être impliqués dans la cohésion des bactéries au sein du biofilm, et ceci tout au long de la croissance du biofilm.

On observe que les lectines ont principalement un effet sur un biofilm très jeune. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat :

- hypothèse 1 : les sucres ciblés par les lectines ne sont pas localisés dans les couches supérieures du biofilm (= EPS inaccessibles).
- hypothèse 2: la structure du biofilm évolue et est de plus en plus « forte », et le biofilm est moins sensible aux traitements (agressions extérieures).
- hypothèse 3 : les exopolysaccharides sont moins ou pas produits lorsque le biofilm arrive à maturité.

Afin d'apporter des éléments de réponse, un marquage de biofilm ciblant les exopolysaccharides a été réalisé.

### 3.3. RÉPARTITION DES EPS GLUCIDIQUES AU SEIN DU BIOFILM

Cette étude des EPS glucidiques est en cours et est réalisée par marquage fluorescent. Le calcofluor utilisé pour cette étude est du calcofluor white M2R, qui fluoresce dans l'UV et peut être observé en fluorescence avec un filtre DAPI. Il est de plus possible de trouver dans le commerce des lectines marquées, telle que la ConA-FITC et la PNA-FITC qui peuvent être observé en fluorescence avec un filtre FITC. Il s'agit donc ici d'utiliser des molécules fluorescentes ou marquées, spécifiques d'un type d'EPS pour localiser les EPS au sein d'un biofilm. Un double marquage des bactéries d'une part, et des EPS d'autre part, permet donc de réaliser ce type d'étude.

Une série d'essais (témoins négatifs, élaboration des protocoles...) a été réalisée sur une culture de *T. arsenivorans* planctonique. Ces essais on montré que :

- le calcofluor se fixe sur des cellules planctoniques
- Le calcofluor ne semble pas se fixer sur la pouzzolane seule mais ceci doit être vérifié
- Le marquage à la ConA est positif, donc la ConA se fixe sur les cellules planctoniques. Par contre, le marquage à la PNA a donné de mauvais résultats, ce qui semble indiquer que soit la PNA ne se fixe pas sur des cellules planctoniques, soit c'est un problème de détection de la fluorescence.
- Le marquage des cellules au DAPI dans un premier temps, et aux lectines dans un deuxième, donne de bons résultats, et a donc été appliqué au biofilm de *T. arsenivorans*.

Ainsi, d'après ces premiers essais, un protocole pour une double coloration DAPI/lectine a été mis au point et est présenté ci dessous :

300 µl de culture + 300 µl de glutaraldéhyde dilué

(pas d'utilisation de formaldéhyde)

Ou

pouzzolane en grain + 300 µl H<sub>2</sub>O + 300 µl de glutaraldéhyde dilué

↓

5 min d'incubation

↓

+ 5 %l d'une solution de DAPI (stock à -20°C) à 1 mg/ml

↓

20 min d'incubation

↓

Filtration (filtre noir polycarbonate, Black, 0.22 µm, 25 mm diamètre, 100/PK)

↓

Rinçage H<sub>2</sub>O distillée

↓

+ 292 µl H<sub>2</sub>O + 8 µL lectine-FITC (stock à 2 mg/ml, -20°C)

↓

Incubation 30 minutes (ou 1 heure, à voir)

↓

Filtration et rinçage H<sub>2</sub>O distillée

↓

+ 20 µl de Antifade reagent (Slow Fade Gold, invitrogen) sur le filtre

↓

Mettre lamelle / conservé dans papier alu et à 4°C

↓

Observation

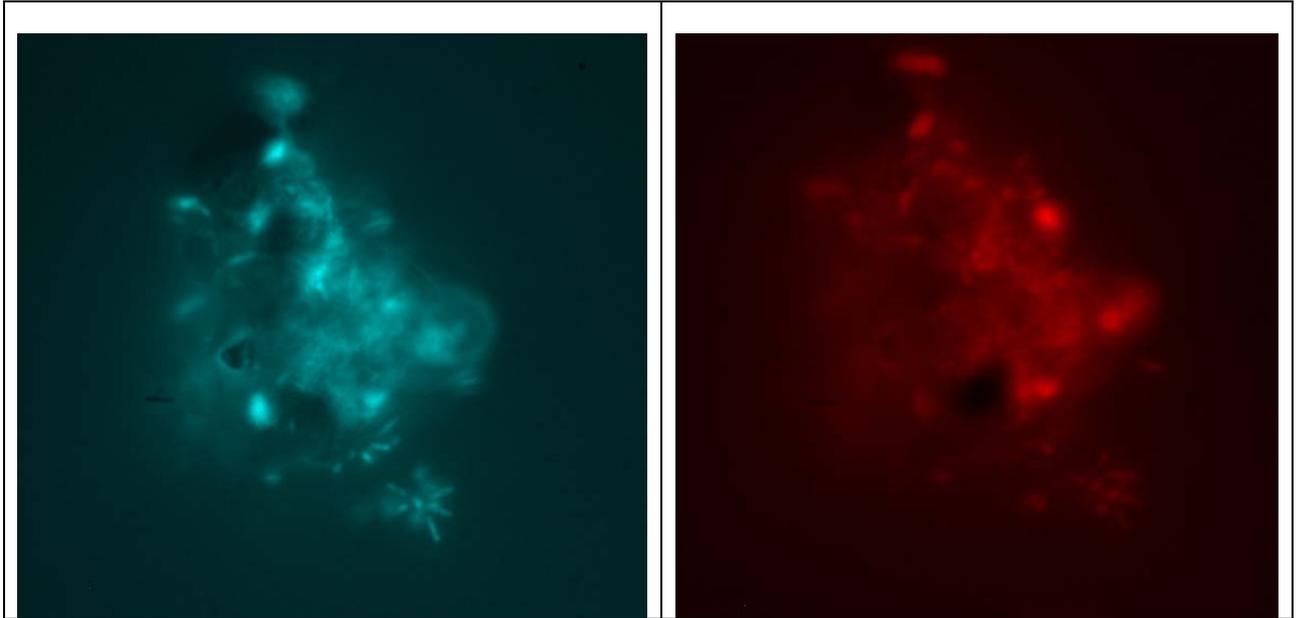


Figure 4 : Grain de pouzzolane (< 100  $\mu\text{m}$ ) colonisé par *T. arsenivorans* (culture de 11 jours avec 2 renouvellements de milieu).

À gauche : coloration au DAPI ; à droite, marquage avec la concanavaline A.

Les résultats du double marquage DAPI/Lectine sont présentés Figure 4. On observe ainsi une colocalisation des marquages DAPI et ConA. La ConA est localisée autour des cellules : ceci indique une présence d'exopolysaccharides et une répartition homogène de ces biomolécules au sein (ou peut être plutôt à la surface) du biofilm. Ces résultats permettent donc d'éliminer l'hypothèse 3 selon laquelle il n'y aurait plus de synthèse de ces biomolécules, ainsi que l'hypothèse 2 puisque les lectines peuvent se fixer sur des exopolysaccharides accessibles. Ces résultats suggèrent ainsi que lorsque le biofilm devient mature, sa structure se modifie de telle sorte qu'il devient plus stable et plus résistant aux agressions environnementales.

Ces résultats montrent également que le protocole doit encore être amélioré, notamment en diminuant le nombre de lavage qui sont potentiellement responsable du décrochage d'un certain nombre de bactéries.

Ces travaux devraient également être complétés par des essais supplémentaires avec un marquage au calcofluor.

## 4. Conclusions

Ces travaux sur le rôle des EPS au sein du biofilm de *T. arsenivorans* ont permis de mettre en évidence de rôle des EPS glucidiques et lipidiques dans l'intégrité de la structure du biofilm de cette souche bactérienne. Ils ont également permis de mettre au point un certains nombre de techniques et protocole d'étude des EPS. Ces travaux doivent être poursuivis et complétés afin d'améliorer les protocoles mis en œuvre, et afin de mieux caractériser le rôle des EPS du biofilm de *T. arsenivorans*.

## 5. Bibliographie

**Allesen-Holm M., Bundvig Barken K., Yang L., Klausen M., Webb J., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T.** (2006) - A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol*, 59, p. 1114-1128.

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

**Michel C., Jean M., Coulon S., Dictor M.-C., Delorme F., Morin D., Garrido F.** (2007) - Biofilms of As(III)-oxidising bacteria : formation and activity studies for bioremediation process development. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 77, p. 457-467.

**Quintero E., Weiner R.** (1995) - Evidence for the adhesive function of the exopolysaccharide of *Hyphomonas* strain MHS-3 in its attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol*, 61, p. 1897-1903.

**Szwajcer E., Szewczyk E., Wawrzynczyk J., Norrlöv O.** (2006) - A novel approach for characterization of exopolymeric material in sewage sludge. *J. Res. Sci. Technol*, 3, p. 97-103.







Géosciences pour une Terre durable

**brgm**

**Centre scientifique et technique**

**Service environnement industriel et procédés innovants**

3, avenue Claude-Guillemin

BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34