

Microbiologie Environnementale

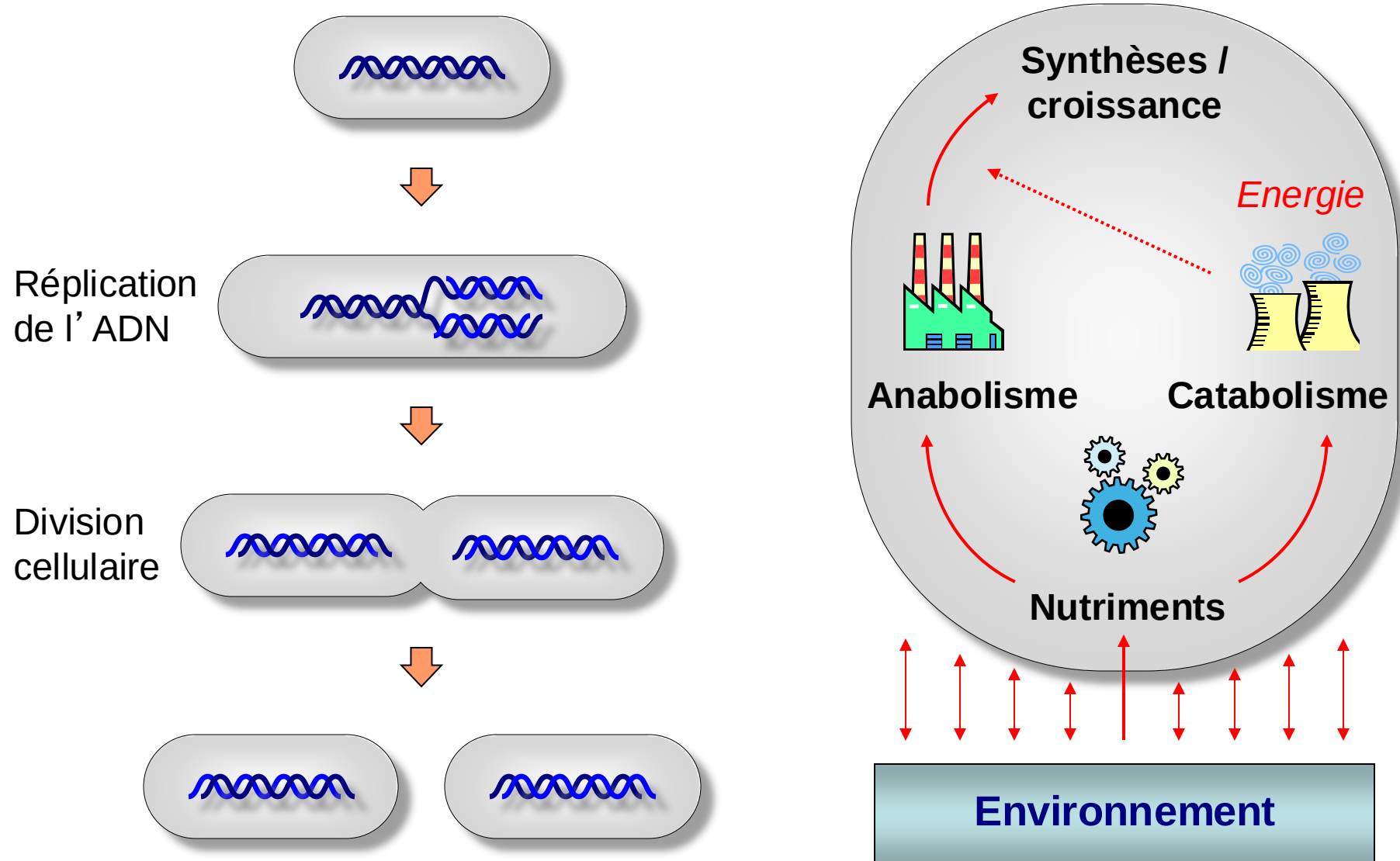
De la connaissance d'une bactérie à son utilisation

Christophe Merlin (LCPME)

03 72 74 72 40

Christophe.Merlin@univ-lorraine.fr

L'histoire d'une vie bactérienne



Plan de cours

de la connaissance d'un microorganisme à la biotechnologie en microbiologie environnementale

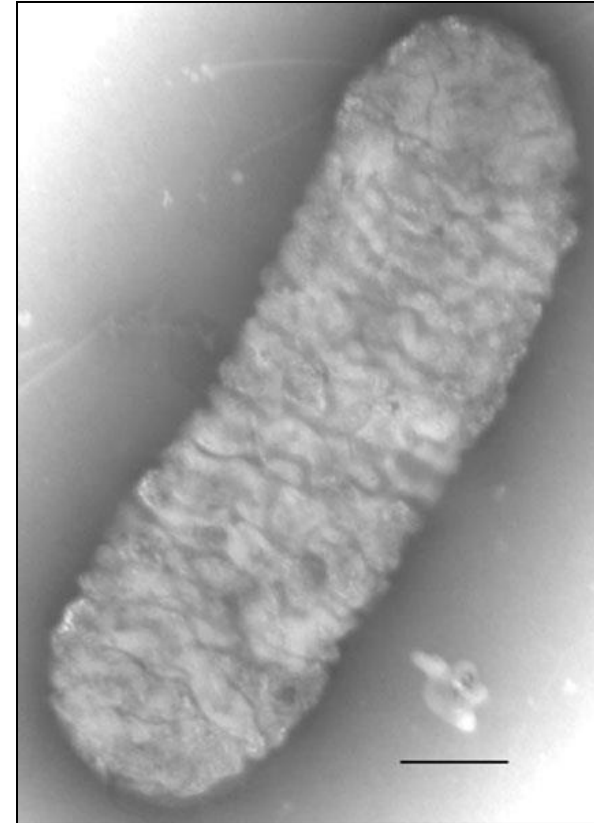
- *Cupriavidus metallidurans* CH34 et résistance aux métaux lourds.
- Bioremédiation.
 - Réacteur à boues
 - Réacteur sur lit de sable
 - Réacteurs à membrane
 - Perspective en phytoremédiation
- Biosenseurs.
 - gène de résistance et expression
 - biodétection

Cupriavidus metallidurans CH34

- Isolée dans le sédiment d'un bassin de décantation à Zinc (10.000 µg/g)
- Bacille Gram-, mobile, flagelles péritriches
- Croissance en autolithotrophie ($H_2/O_2/CO_2$) et en hétérotrophie (Ac. carboxyliques)
- Caractéristique : résistances aux métaux.

Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} , Cu^{2+} , CrO_4^{2-} , Tl^{2+} , ...

Intérêt en biotechnologie



Cupriavidus metallidurans CH34. Observation par microscopie électronique à transmission.
Échelle : 200 nm. © Groupe Toxicologie humaine et environnementale, Laboratoire Pierre Süe, UMR 9956 CNRS/CEA Saclay/Centre commun de microscopie électronique d'Orsay

Toxicité et résistance aux métaux

Table 1. Toxicity of heavy metal ions in *Escherichia coli* conc. in sea water x 1000
MIC

Heavy metal ions	MIC (mM) ^a	CSW ^b (nM)	1000 CSW/MIC ^c	
Hg ²⁺	0.01	0.149	0.015	
Ag ⁺	0.02	2.78	0.139	
Au ³⁺	0.02	0.056	0.003	
CrO ₄ ²⁻	0.2	0.962	0.005	
Pd ²⁺	0.2		0	
Pt ⁴⁺	0.5	n.d.	0	
Cd ²⁺	0.5	0.982	0.002	
Co ²⁺	1.0	4.58	0.005	
Ni ²⁺	1.0	92.0	0.092	
Cu ²⁺	1.0	47.2	0.047	
Zn ²⁺	1.0	158	0.158	
Tl ⁺	2.0	n.d.	0	
UO ₂ ²⁻	2.0	12.6	0.006	
Pb ²⁺	5.0	0.145	0	
Mn ²⁺	20.0	36.4	0.002	

MIC CH34
(mM)

2.5

20

2.5

12

« Metallophile », contient des systèmes de détoxification spécifiques

^aThe minimal inhibitory concentration (MIC) was determined on Tris-buffered minerals salts medium, starting pH 7.0, containing 2 g sodium gluconate/l as carbon source, and 1 g yeast extract/l to complement for *E. coli* auxotrophies, 2 days at 30°C (Nies 1999)

^bConcentration in seawater (CSW) according to Weast et al. (Weast 1984)

^cBecause toxic effects start at about 1/1000 of the MIC, this quotient gives the toxicity of a given metal in seawater

Toxicité et résistance au métaux

TABLE 2. MICs of metal ions for *W. metallidurans* strains with mutations in genes for cation diffusion facilitators^a

Strain	Relevant genotype	Plasmid(s)	MIC of metal salt (μM) ^b			
			CoCl ₂	NiCl ₂	ZnCl ₂	CdCl ₂
AE104			400	400	200	250
AE104	<i>dmeF</i> ::pLO2		4	300	200	100
AE104	<i>fieF</i> ::pLO2		300	400	200	200
CH34		pMOL30, pMOL28	6,000	2,500	4,500	1,500
CH34	<i>dmeF</i> ::pLO2	pMOL30, pMOL28	50	2,500	4,500	1,500
CH34	<i>fieF</i> ::pLO2	pMOL30, pMOL28	50	2,500	4,500	1,500
AE128		pMOL30	4,500	ND	ND	ND
DN182	<i>ΔczcD</i>	pMOL30-4	2,500	ND	ND	ND
AE128	<i>dmeF</i> ::pLO2	pMOL30	15	ND	ND	ND
AE128	<i>dmeF</i> ::pLO2 <i>ΔczcD</i>	pMOL30-4	4	ND	ND	ND

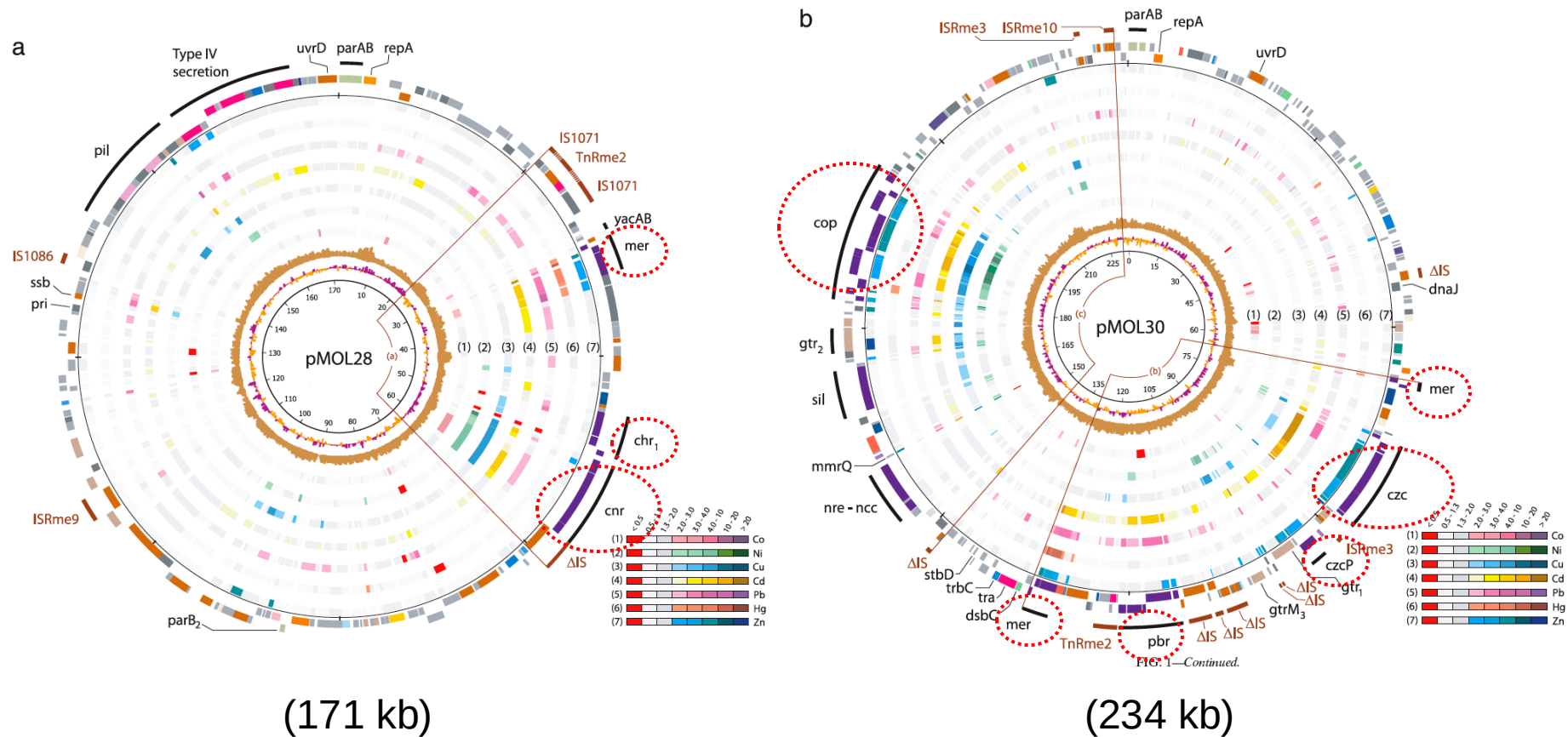
^a Strains were grown for 48 h in minimal medium, diluted 1:100, and streaked on minimal agar plates with increasing metal concentrations. Growth was monitored for 5 days at 30°C. The results were confirmed by at least three independent experiments.

^b ND, not done.

AE104 = CH34 sans plasmide...

Séquençage du chromosome de CH34 et de ses plasmides

1 chromosome de 3.9 Mb, 1 megaplasmid de 2.6 Mb et 2 gros plasmides de 171 kb (pMOL28) et 234 kb (pMOL30).



Cupriavidus metallidurans CH34

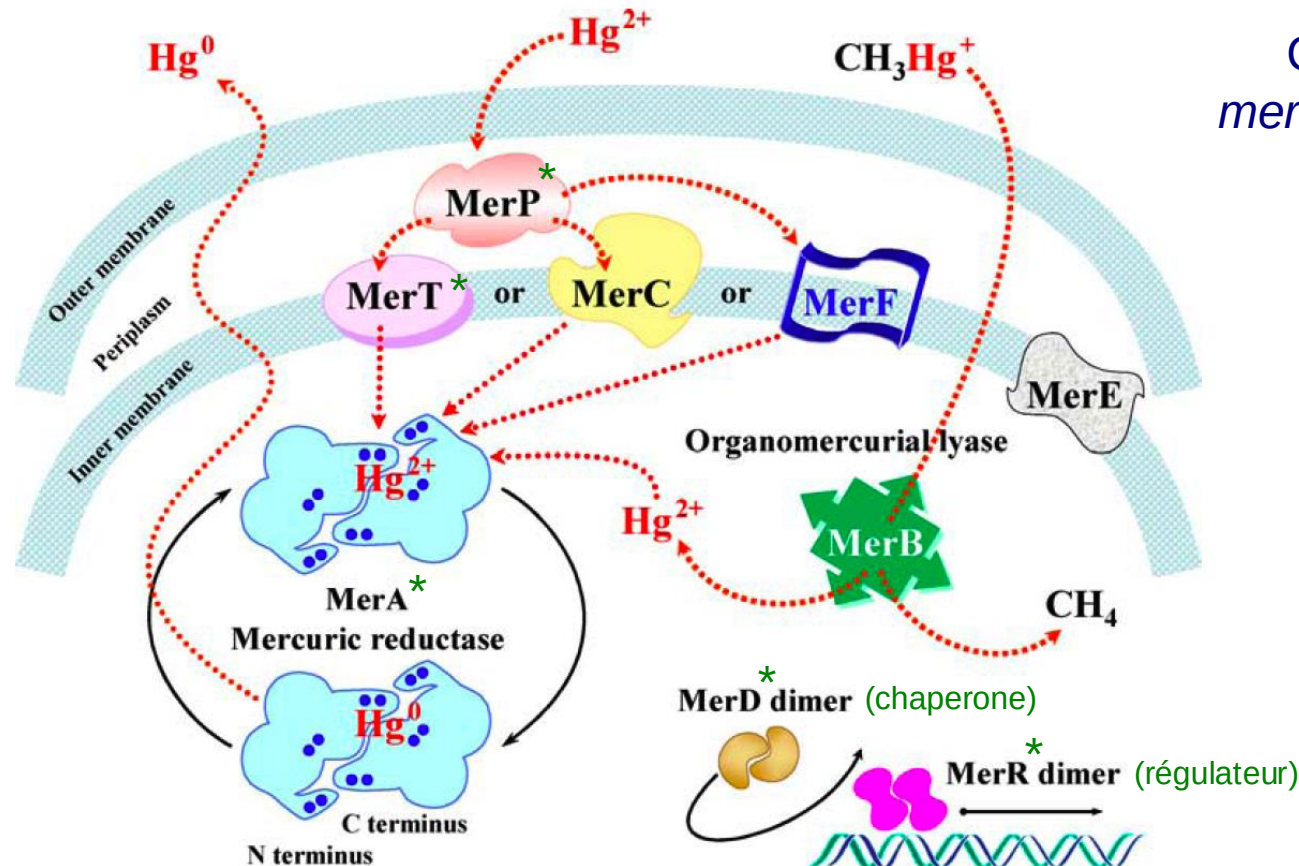
Résistance plasmidique aux métaux

{	CnrYXH	Régulation	Co^{2+} , Ni^{2+}
	CnrCBA	Pompes d'efflux (type RND)	
{	ChrAB	Sulfate/chromate antiporteur	CrO_4^{2-}
	ChrC	? superoxyde dismutase?	
	MerRTPAD	Import et réduction	Hg^{2+}
{	CzcNI	Régulation	Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}
	CzcCBA	Pompes d'efflux (type RND)	
	CzcD	Efflux (type CDF)	
	CzcRS	Régulation	
	CzcE	?	
{	PbrR	Régulation	Pb^{2+}
	PbrA	Efflux à ATPase	
{	CopRS	Régulation	Cu^{2+}
	CopABCD	Efflux & complexation	
	CopF	Efflux à ATPase	
	CopH	?	

Résistance bactérienne au mercure

(système de détoxification par réduction)

P = fixation Hg^{2+} (périplasme) - **T, C, ou F** = transport transmembranaire
A = mercuric réductase - **B** = organomercurial lyase - **R & D** = régulateurs - **E** = ?



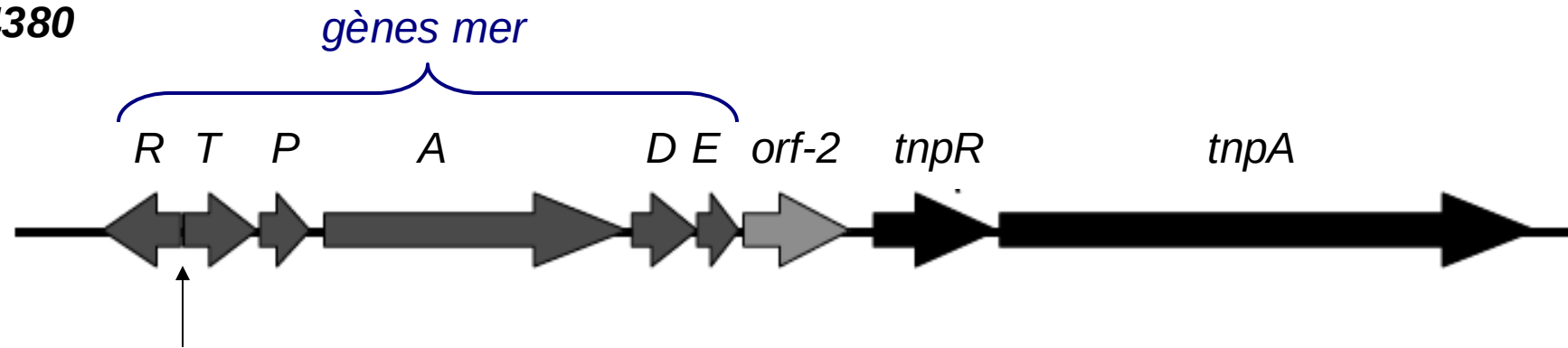
CH_3Hg^+ :
merRTPAD x3

Résistance de CH34 au Hg²⁺

P = fixation Hg²⁺ (périplasme) - **T,C**, ou **F** = transport transmembranaire
A = mercuric réductase - **B** = organomercurial lyase - **R & D** = régulateurs - **E** = ?

CH34: MerRTPAD x3

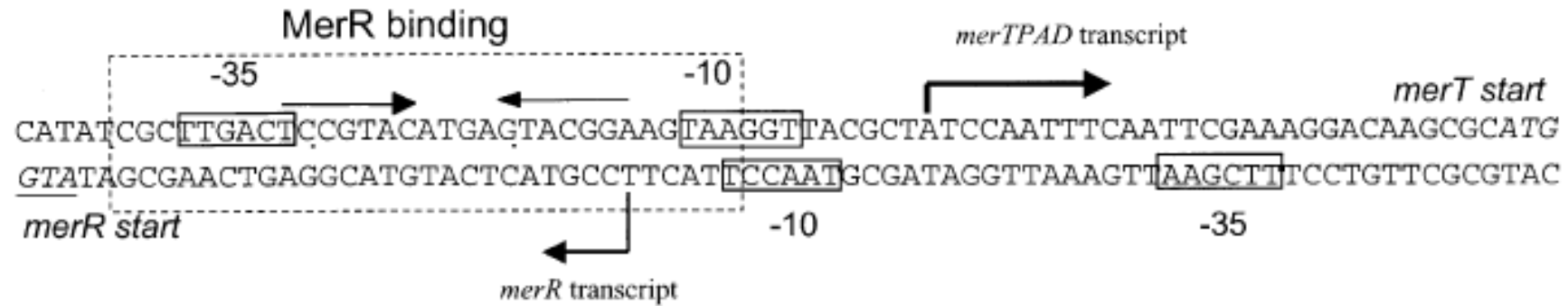
Tn4380



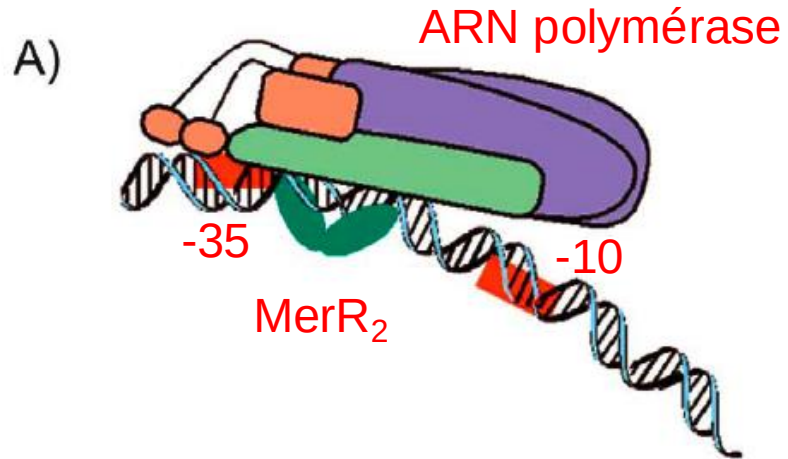
MerR₂
MerR₂ + Hg²⁺
MerD

(pas de transcription de *merTPAD* => répression)
transcription de *merTPAD* => induction)
décrochage de MerR-Hg²⁺
- pas de transcription de *merTPAD*
- transcription de *merR*

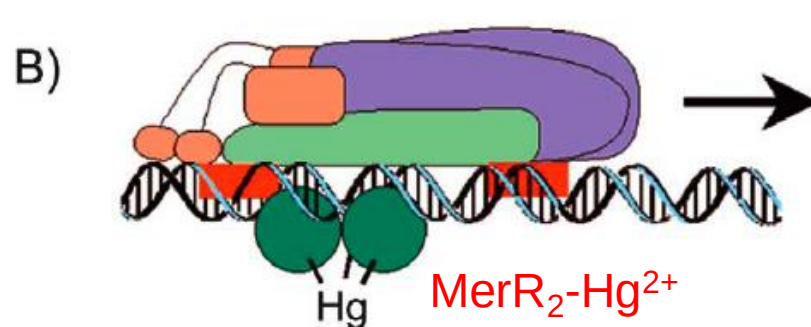
Expression des gènes *mer* - structure du promoteur *mer*



Expression des gènes *mer*



Liaison MerR / ADN / ARN polymérase
mais complexe formé inactif.
Répression des promoteurs P_{merR} et
 $P_{merTPAD}$.

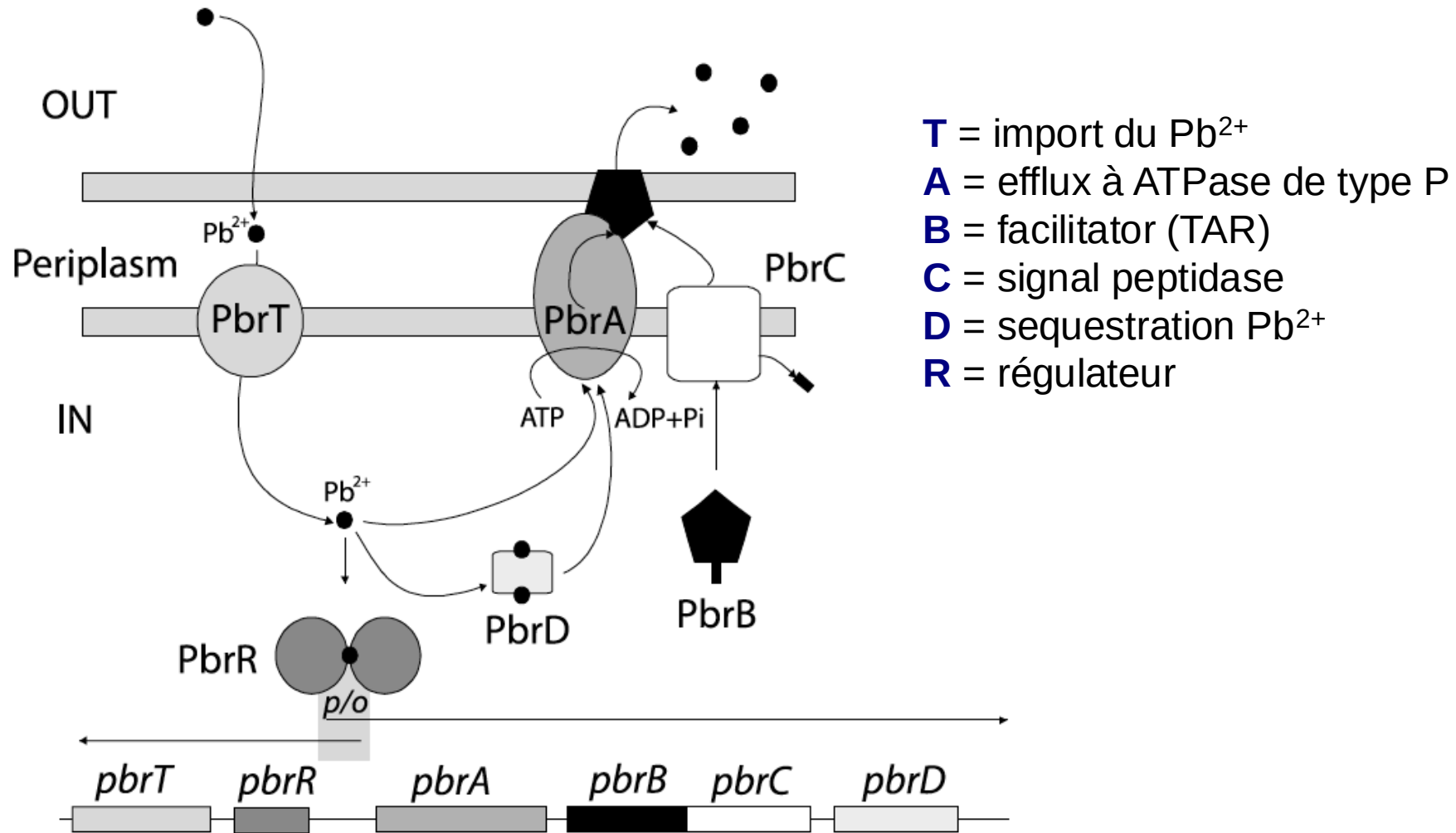


Liaison de Hg²⁺ à MerR , changement
de conformation du complexe et
induction de la transcription



Libération du promoteur via
déplacement de MerR-Hg²⁺ par MerD
transcription de *merR*

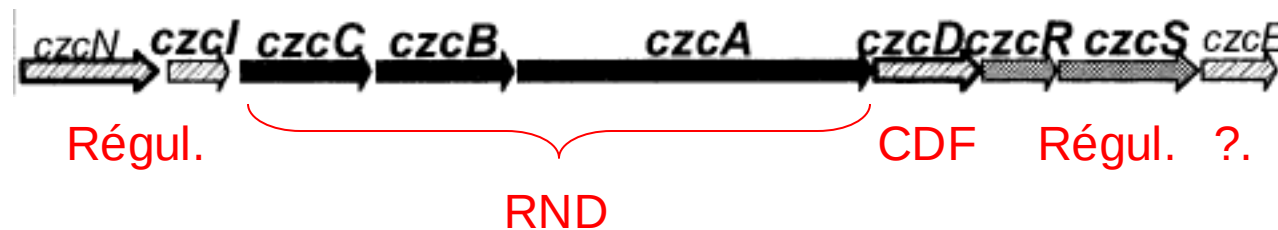
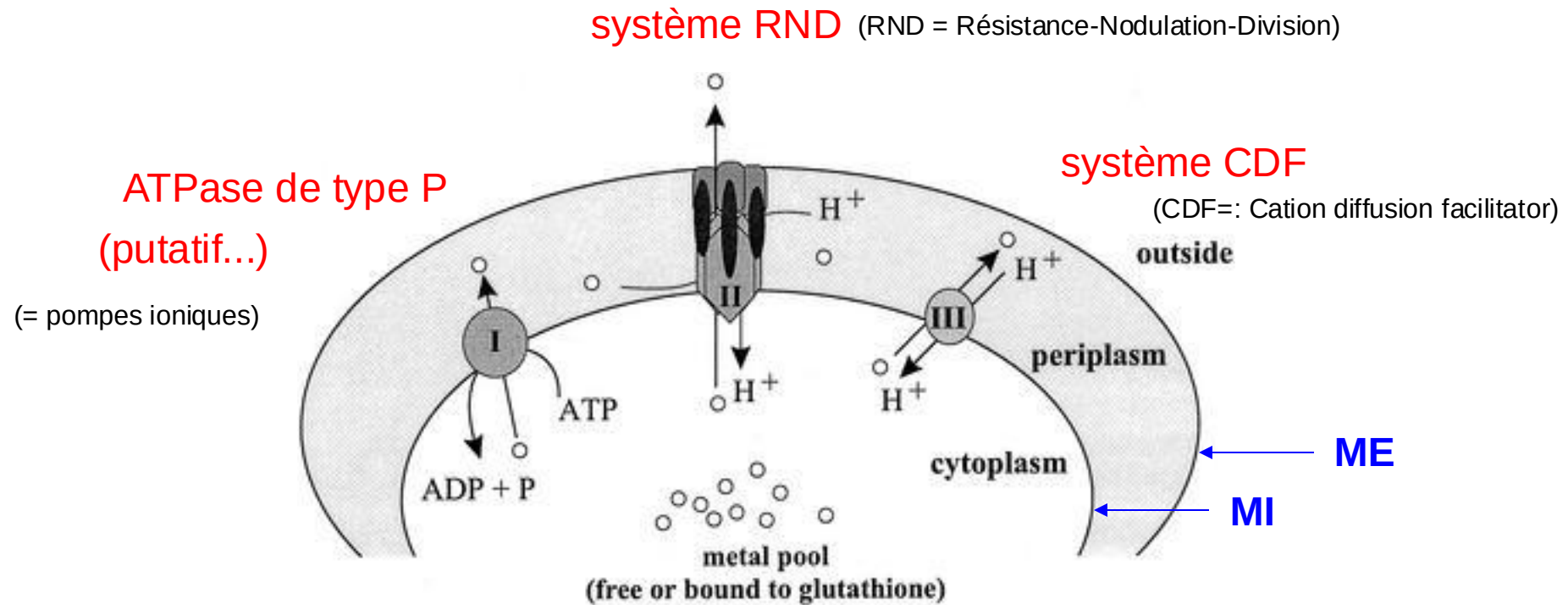
Résistance de CH34 au Pb^{2+}



PbrR (comme MerR) = activation en présence de Pb^{2+}

Résistance de CH34 au Cd^{2+} et au Zn^{2+}

(systèmes de détoxification par efflux)



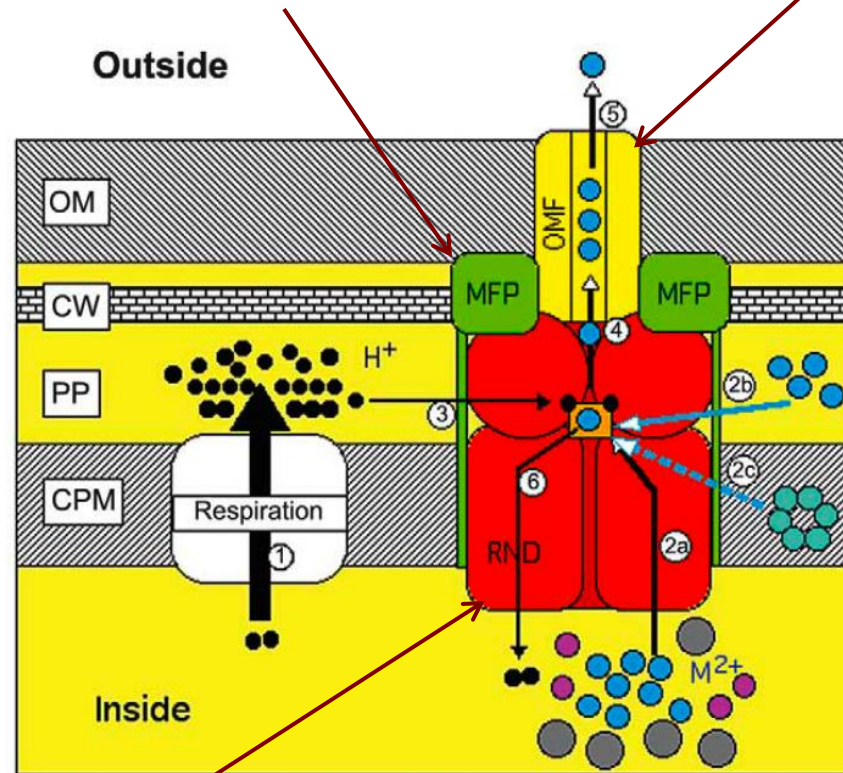


Résistance de CH34 au Cd^{2+} - Zn^{2+} - Co^{2+}

(systèmes de détoxification RND)

MFP = Membrane Fusion Protein

OMF = Outer Membrane Factor

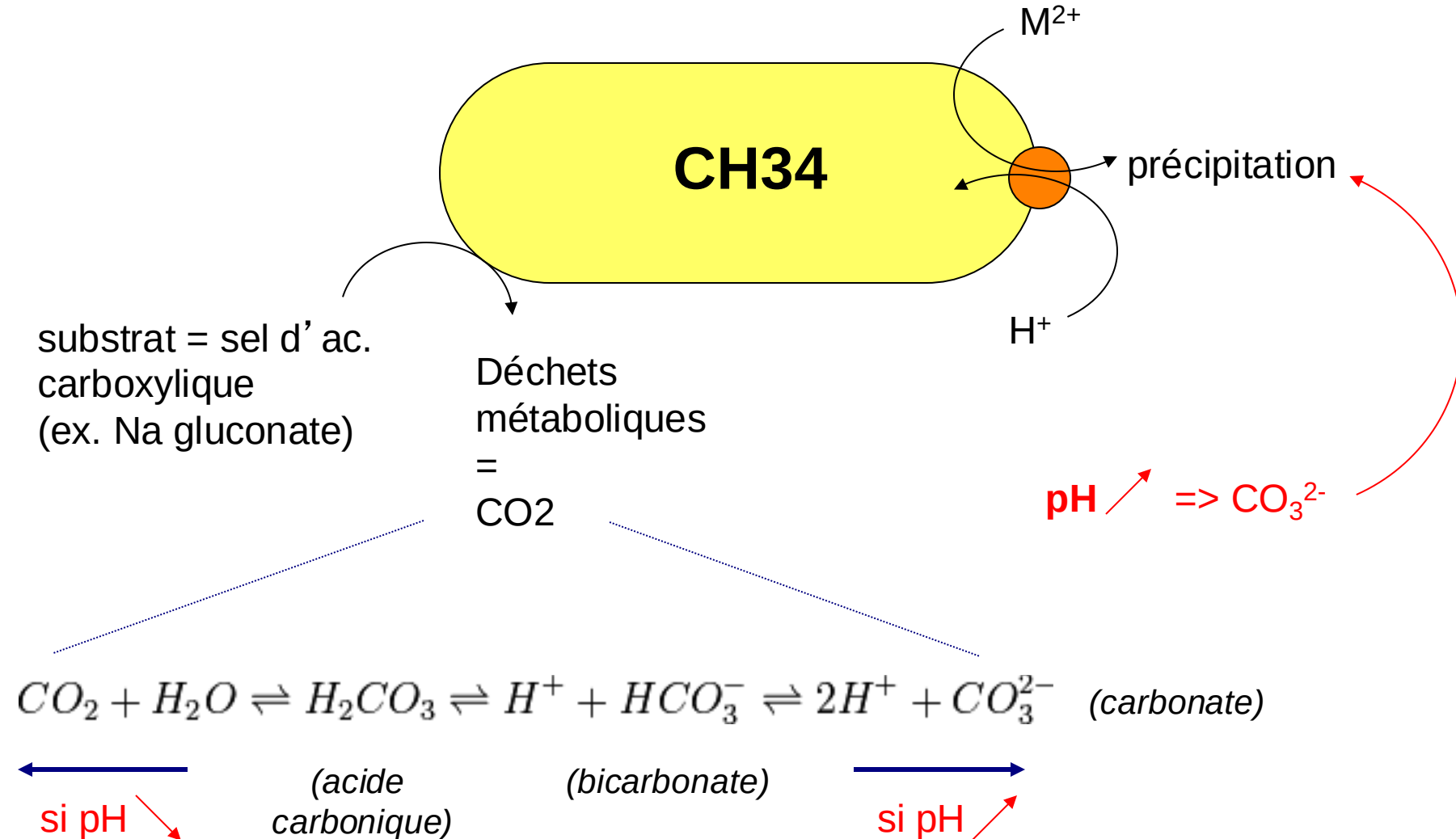


CzcABD chez CH34

- Complexe protéique tripartite propulsé par un gradient de protons (ne consomme pas d' ATP).
- Les ions métalliques peuvent être expulsés à partir du cytoplasme ou du périplasme.

RND = cation/proton antiporteur

Résistance et remédiation



Résistance et remédiation

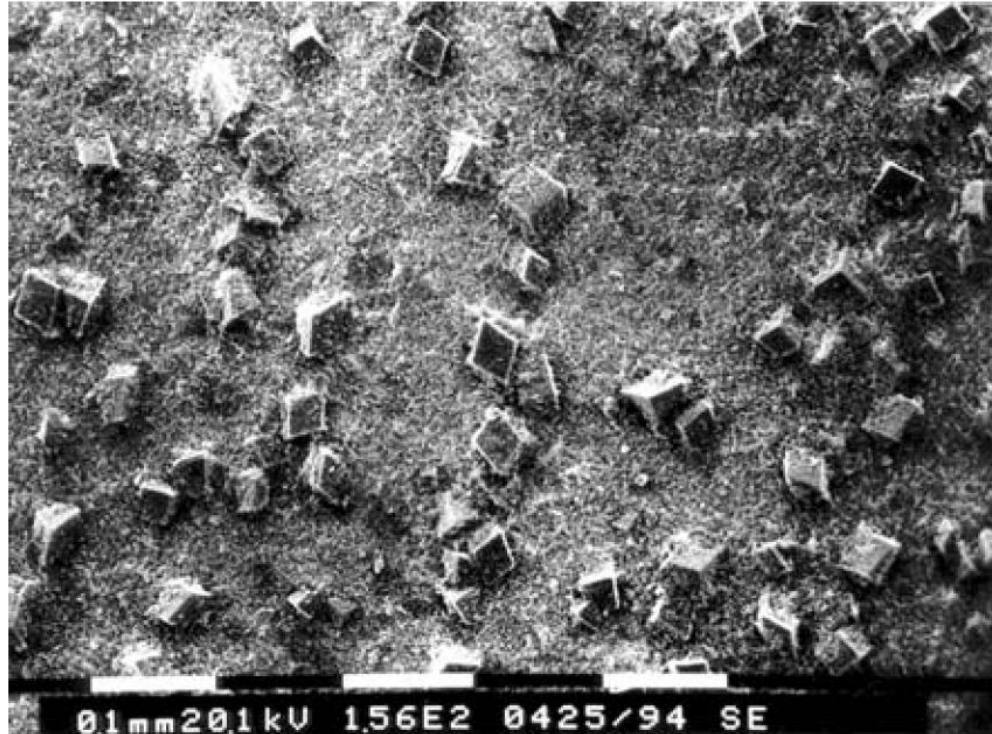


Fig. 9 CdCO₃ crystals formed by *C. metallidurans* in the Bacteria Immobilized Composite Membrane Reactor induced biofilm (SEM-photo)

Résistance et remédiation

ex. bioprécipitation du Cd en culture

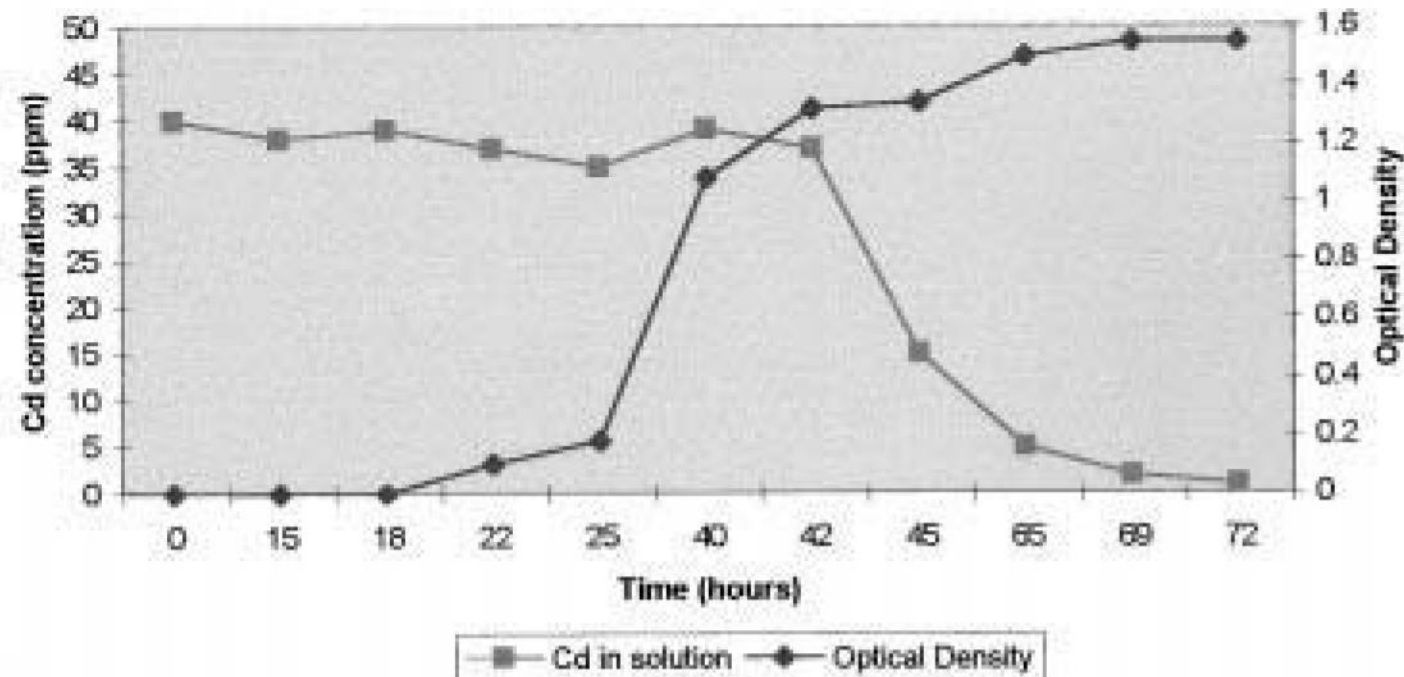
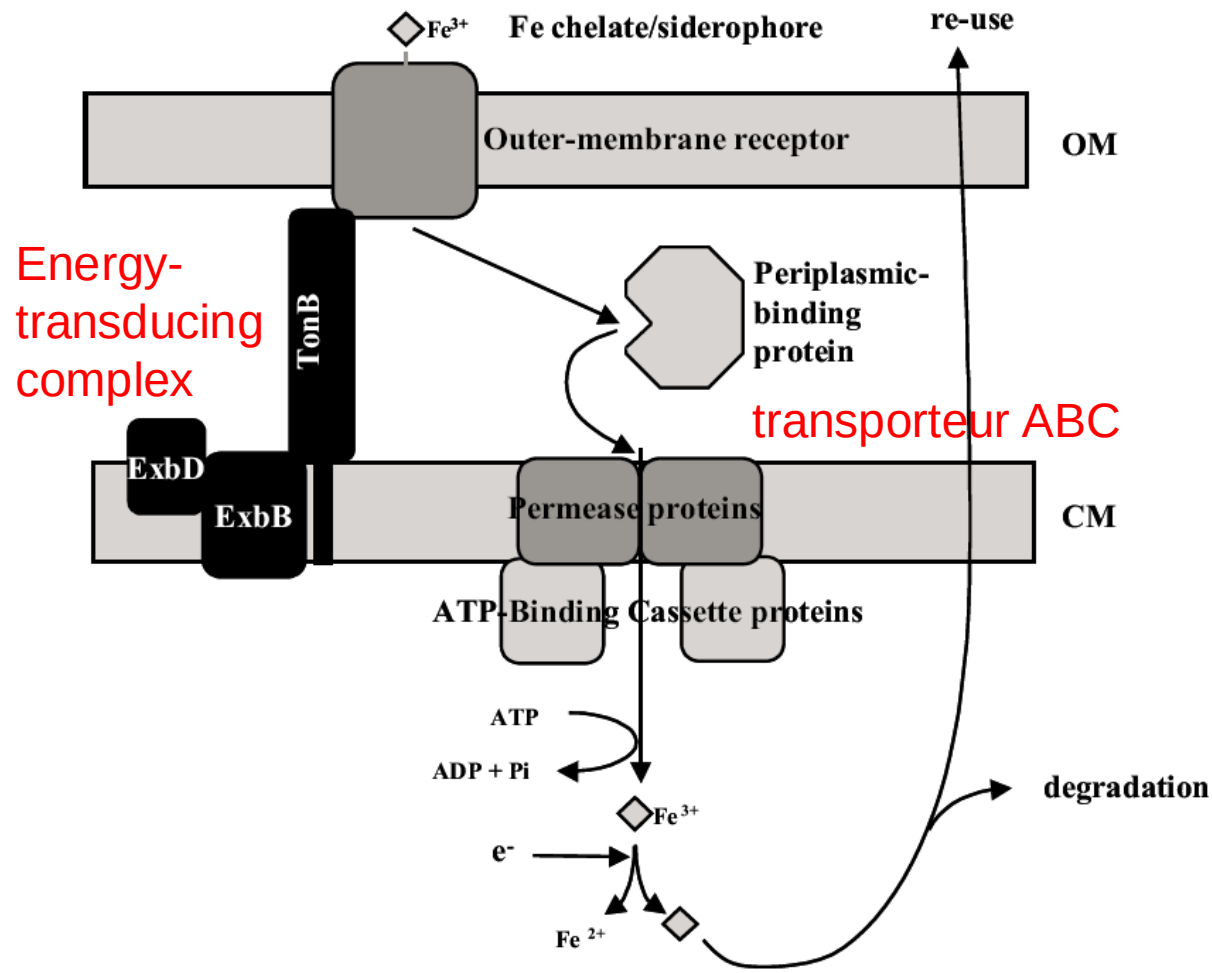


Fig. 2. Cd removal in a liquid culture in function of the growth curve. The Cd concentration in the solution and the optical density of the cells are presented in function of time.

Métaux lourds et sidérophores



Sidérophore = chelateur permettant de capturer et « solubiliser » du Fe³⁺ avant transport.

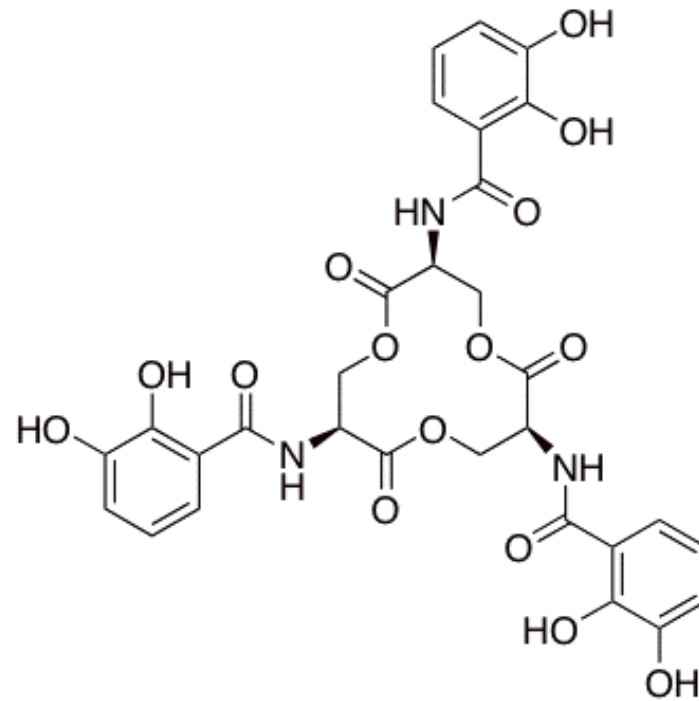
Système généralement induit en carence de Fe.

Chez CH34, la « **staphyloferrin B** » peut complexer des métaux toxiques. Elle est induite par les métaux lourds même en présence de Fe.

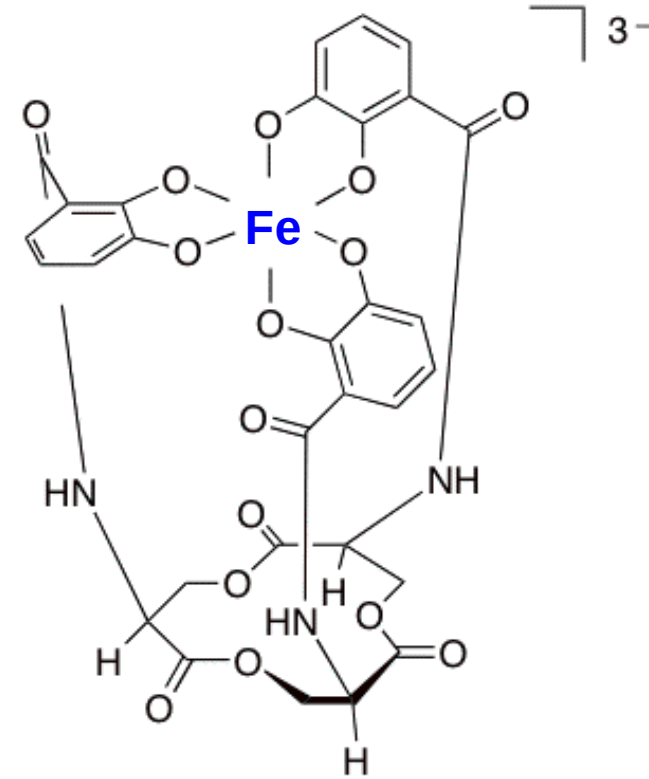
« solubilisation » de métaux & séquestration

Fig. 1. Schematic representation of siderophore-mediated iron uptake in Gram-negative

exemple de sidérophore : entérobactine d' *Escherichia coli*



Enterobactin



Fe(III)-Enterobactin

Production d' EPS et décantation de sol

10% sol
90% eau

idem
+ CH₃4

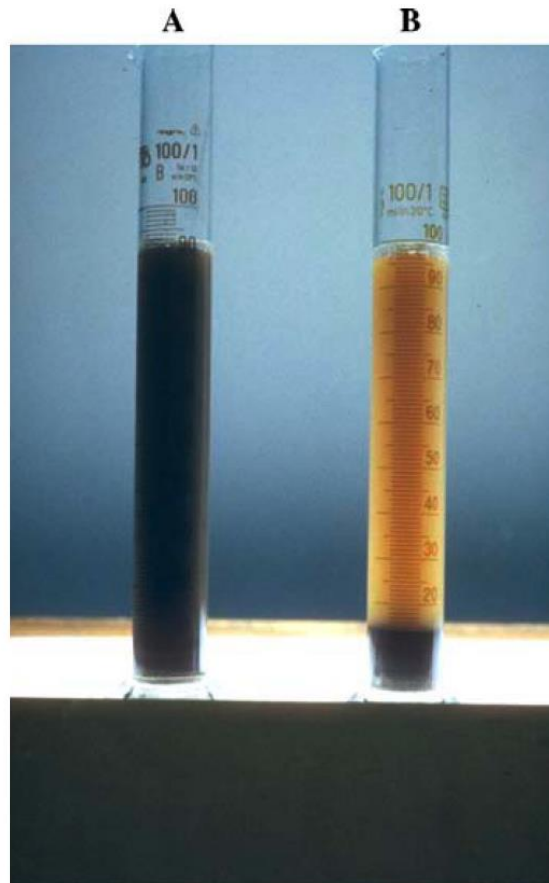
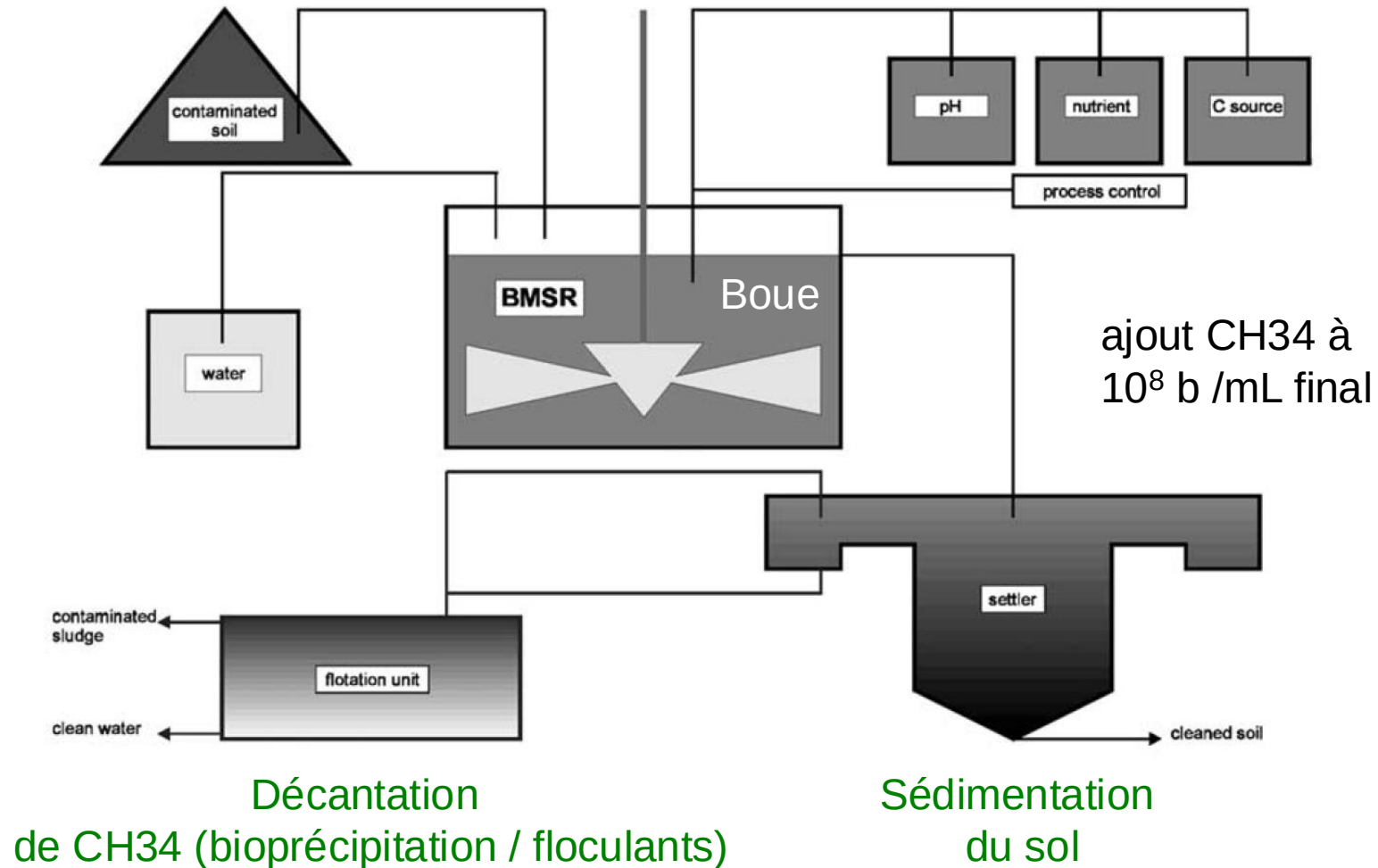


Fig. 2 Flotation behaviour of CH₃4 in a soil suspension. (A) Soil slurry made from 90% water and 10% soil (by volume), (B) the same soil slurry after inoculation and growth with CH₃4



BioMetal Sludge Reactor

BioMetal Sludge Reactor



Vue d'ensemble & concept

BioMetal Sludge Reactor



Fig. 4 Photograph of BioMetal Sludge Reactor (BMSR).
Marker is 50 cm. Reactor has a volume of 450 L

BioMetal Sludge Reactor

Table 4
Heavy Metals Concentrations in the Soil

Heavy metals concentrations (mg/kg)			
Time (hours)	Cd	Zn	Pb
0	21	1070	459
2	6.7	371	156
24	4.1	208	93
46	3.3	172	74

temps de contact bactérie/boues
(ici prélèvement à intervalles)

Biomasse (jour 2):

- > 100 mg Cd/kg
- > 5000 mg Zn/kg
- > 2000 mg Pb/kg

Phase eau (jour 2):

- < 0.1 ppm Cd
- 0.9 ppm Zn
- 0.2 ppm Pb

fin d'expérience

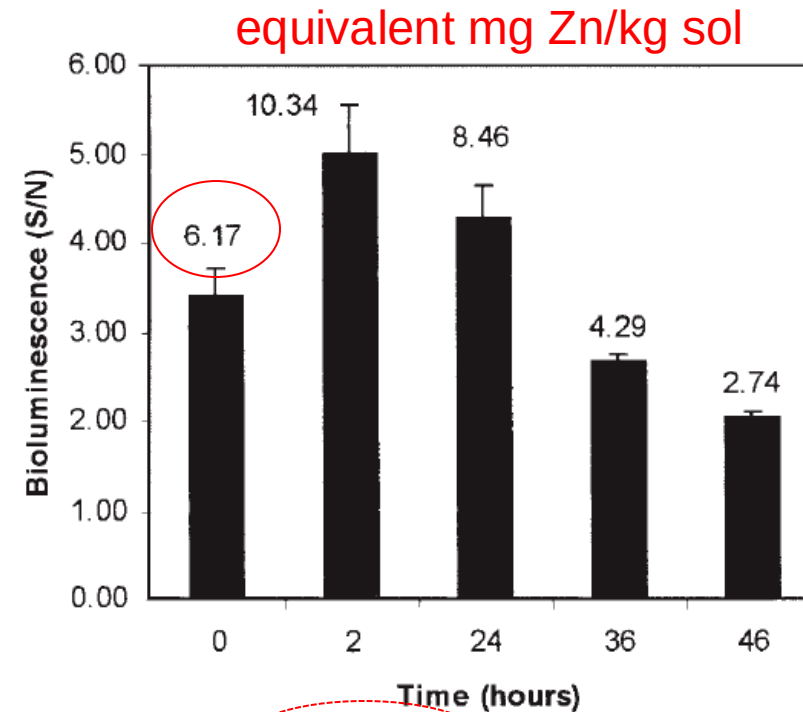


Fig. 5. Zn bioavailability in the treated soil.

Utilisation du « BIOMET-sensor AE1433 »

« Metal removal by sand filter Inoculation »

système MERESAFIN

Mise à profit de la capacité de CH34 à former des **biofilms** et à **piéger** des métaux pour dépolluer des effluents contaminés

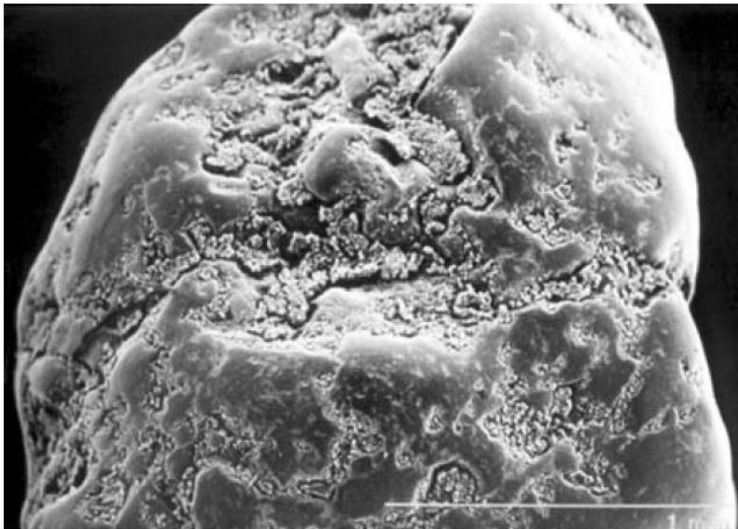
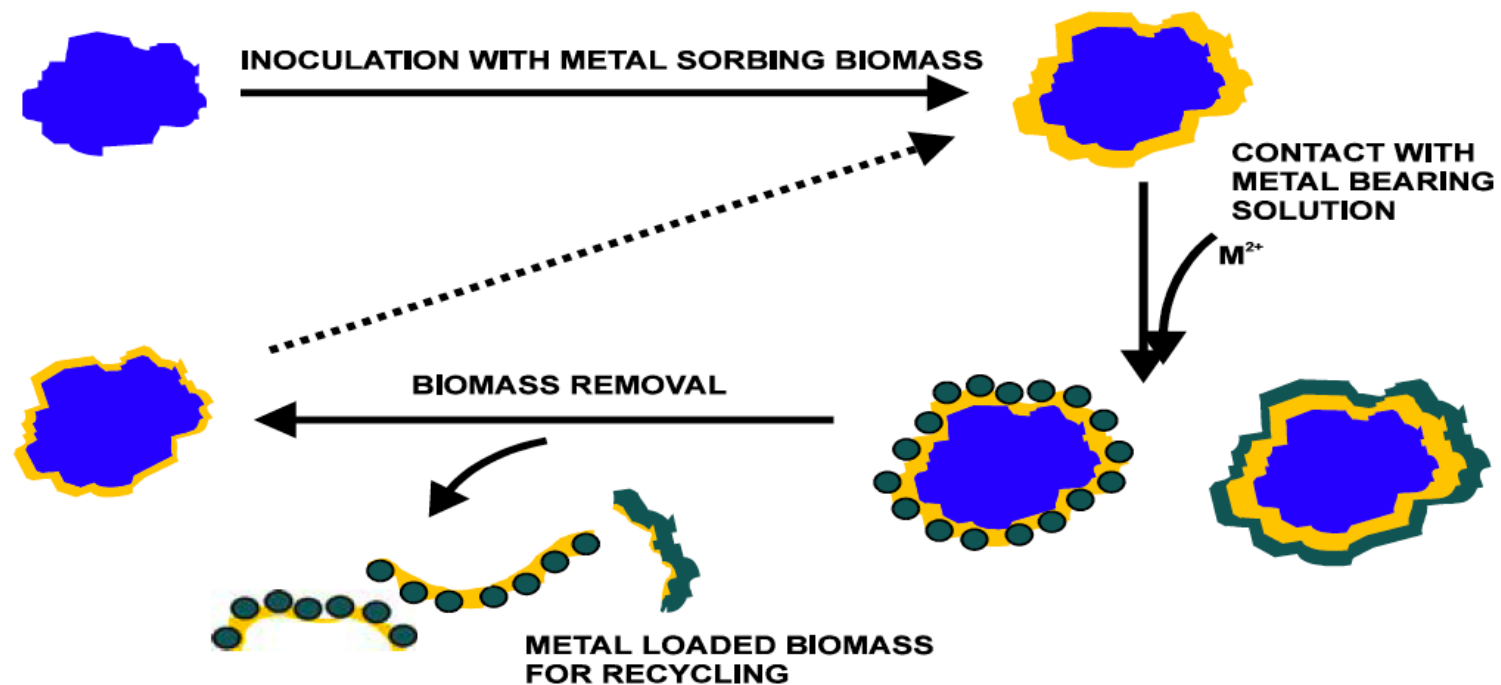


Fig. 1 CH34 growing on the crevasses of sand particles scanning electron microscopy by L. Macaskie (Univ. Birmingham, UK), marker is 500 μm .

« Metal removal by sand filter Inoculation »

Principe du MERESAFIN

Utilisation des propriétés de biosorption et bioprécipitation des ETM de CH34 pour le traitement d'eaux contaminées



« Metal removal by sand filter Inoculation »

Filtre à lit de sable mobile basé sur un principe de contreflux

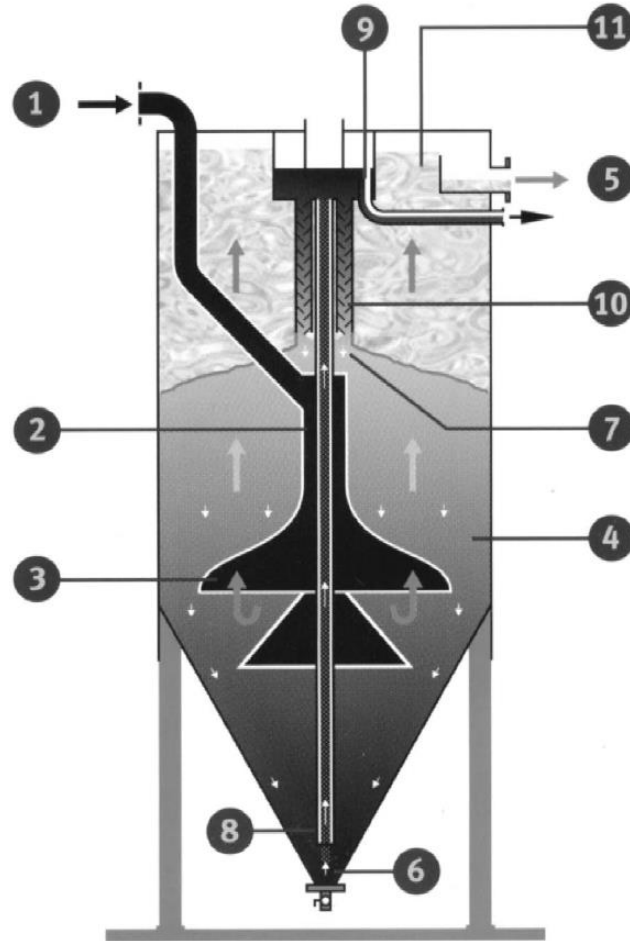
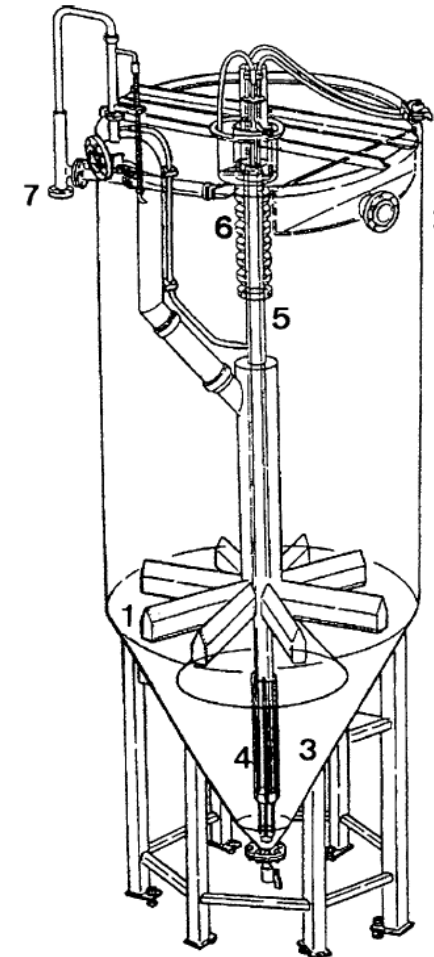


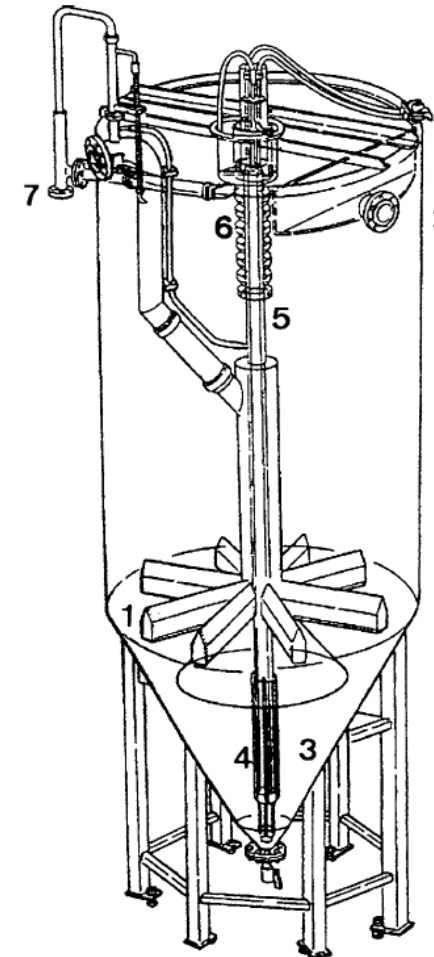
Fig. 2. Construction of the Astrasand[®] moving-bed sand filter.



« Metal removal by sand filter Inoculation »

Technical data of the pilot filter (DST-06-D)

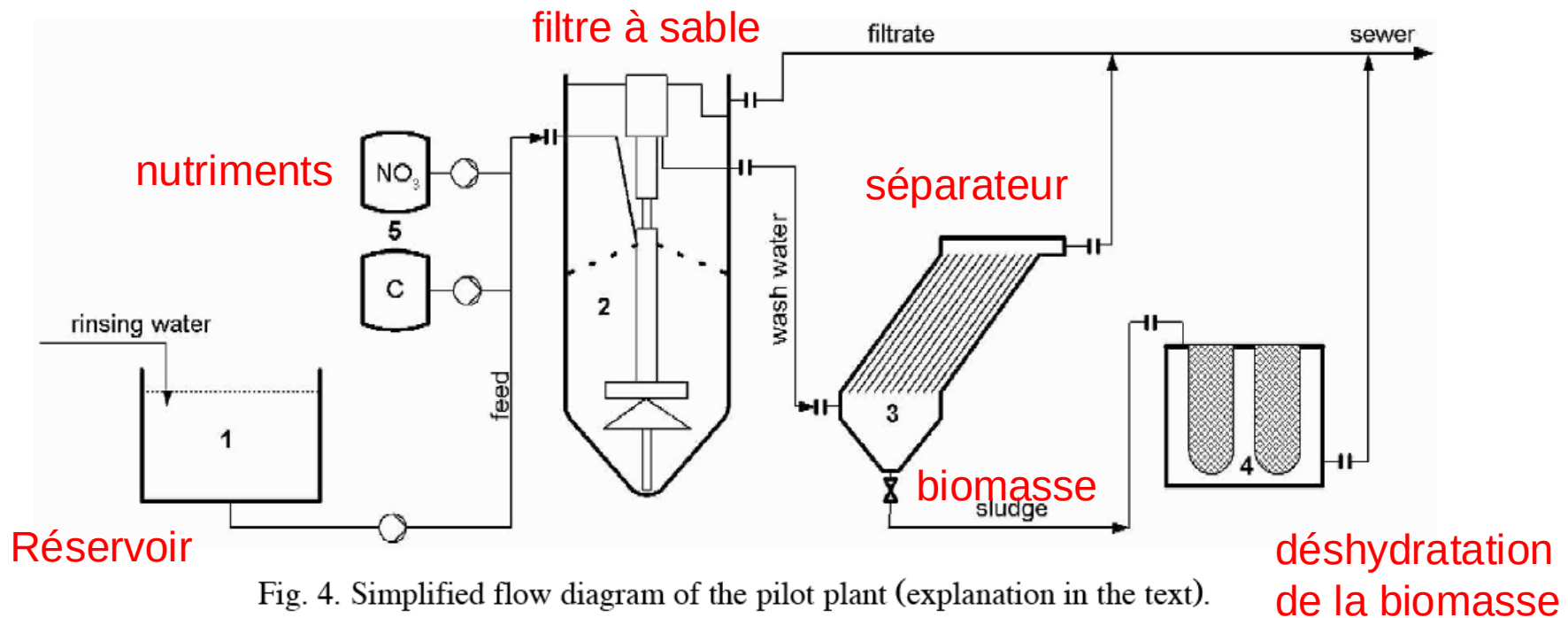
Sand filling	1.7 m ³
Filter bed area	0.6 m ²
Effective bed height	2 m
Total height	4.5 m
Designed surface loading rate	1.7–13 m/h
Feed flow rate	1–8 m ³ /h



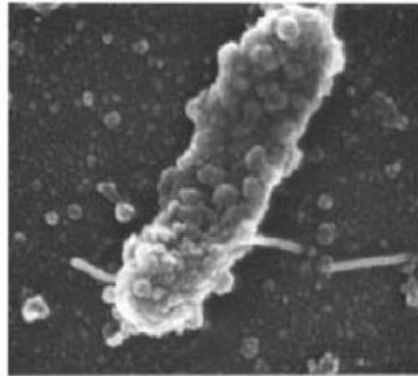
« Metal removal by sand filter Inoculation »

Dispositif complet

- filtre bed = 12 m³
- sable: quartz, diam. 1.2 à 2.0 mm
- flux alim.: 20-45 m³/h
- flux wash water: 3-5 m³/h
- temps de contact lit de sable: 36 min

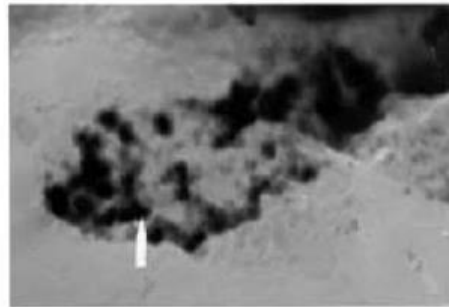


« Metal removal by sand filter Inoculation »

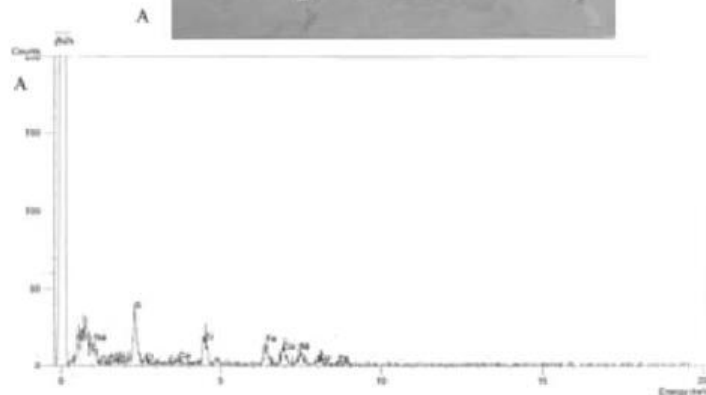


Cellule bactérienne récupérée dans
le filtre de l'eau supérieur

SEM : présence de concrétions sphériques



TEM : particules opaques aux electrons



EDAX : pics pour sulfure, Fe, Co, Ni
(ou EDX = Energy Dispersive X-ray)

Fig. 4. SEM, TEM and EDAX scan of cells from upper water filter.



Biosorption du Ni^{2+} par la biomasse

Table 1. Typical analysis of the filter feed water. (Entrée)

Parameter	Conc. [mg/l]	Parameter	Conc. [mg/l]	Parameter	Value
Ca	34	O ₂	6.1	pH	7.5
Na	18	Carbonate-C	14	E _h	+400 mV
K	9.1	Sulphate-S	8	T	25 °C
Mg	7.9	Phosphate-P	14.5		
Ni	3.9 ^a	Ammonium-N	5.3		
Fe	0.08	Lactate	25.6		
Zn	0.02	Acetate	25		

^aFor modelling purposes the equivalent value of 66 μM was used (Mol. wt. = 58.7).

Table 2. Biosorption results from equilibrated biosludge. (Biomasse concentrée)

C _S [mg Ni/l]	C _{BG} [mg Ni/l]	C ₀ [mg Ni/l]	C _e [mg Ni/l]	pH		Biosorption capacity	
				Start	End	[mg Ni/g dry material]	[mg Ni/ g biomass]
0	76	76	72	3.5	5.7	0.8	2.0
5	79	84	76	3.5	5.7	1.5	4.0
10	80	90	77	3.5	5.7	2.5	6.6
20	84	104	81	3.5	5.7	4.6	12.0
30	86	116	90	3.5	5.8	5.1	13.4
50	88	138	107	3.5	5.8	6.1	16.0
100	92	192	152	3.5	5.7	7.9	20.7

(C_S spiked concentration; C_{BG} leached background; C₀ initial concentration; C_e equilibrium concentration)

dopage « background » initial équilibre

un exemple...

+ biomasse (« sludge »)
+ dopage en Ni
($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

(q = quantité adsorbée)

$$q = V(C_0 - C_e)/M$$

$$C_0 = C_{BG} + C_S$$



« Metal removal by sand filter Inoculation »

Table 2

Average values of selected parameters for the operation phases 2b-1, 2b-2, and 2b-4

Phase	Flow (m ³ /h)		O ₂ (mg/L)		Acetate (mg C/L)		NO ₃ (mg N/L)		pH		Ni (mg/L)	
	feed	wash	feed	rem ^a	feed	rem ^a	feed	rem ^a	feed		rem ^a	
2b-1	1.00	0.83	7.2	5.7	2.5	2.9	0		7.7		0.28	
2b-2	0.94	0.68	7.1	7.4	5.1	5.0	0	0.5	7.8		0.53	
2b-4	1.02	0.67	6.7	6.7	10.4	8.4	3.7	3.4	8.2		0.76	

^aRemoved = difference between feed and filtrate.

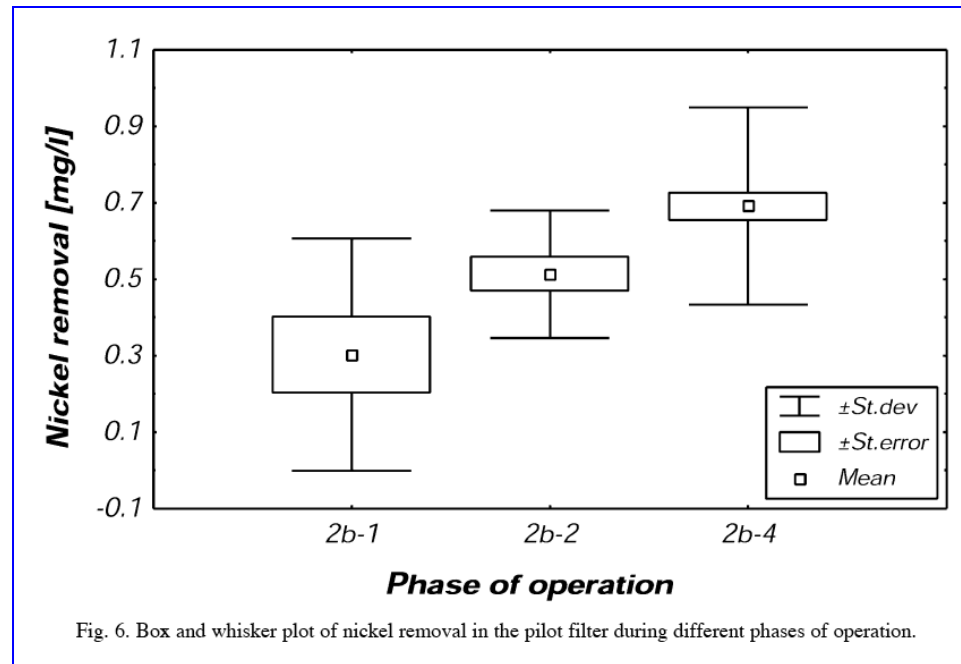


Fig. 6. Box and whisker plot of nickel removal in the pilot filter during different phases of operation.

Effet de l'apport en C et N

- Charge eau traité : 2-5 mg/L
- « biosludge » récupéré :
 - 20 mg/g mat.sèche
 - facteur de concentration 10.000

« Bacteria Immobilized Composite Membrane Reactor »

Principe :

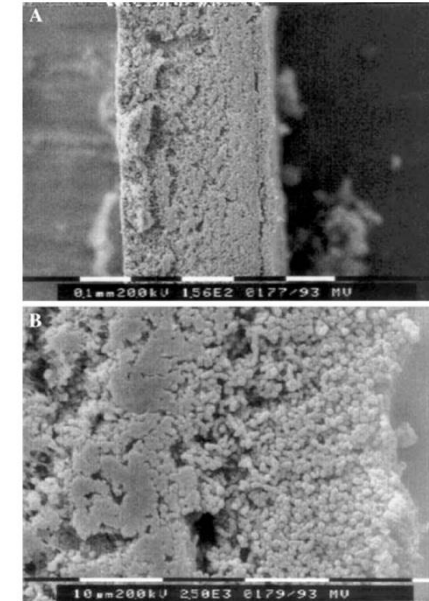
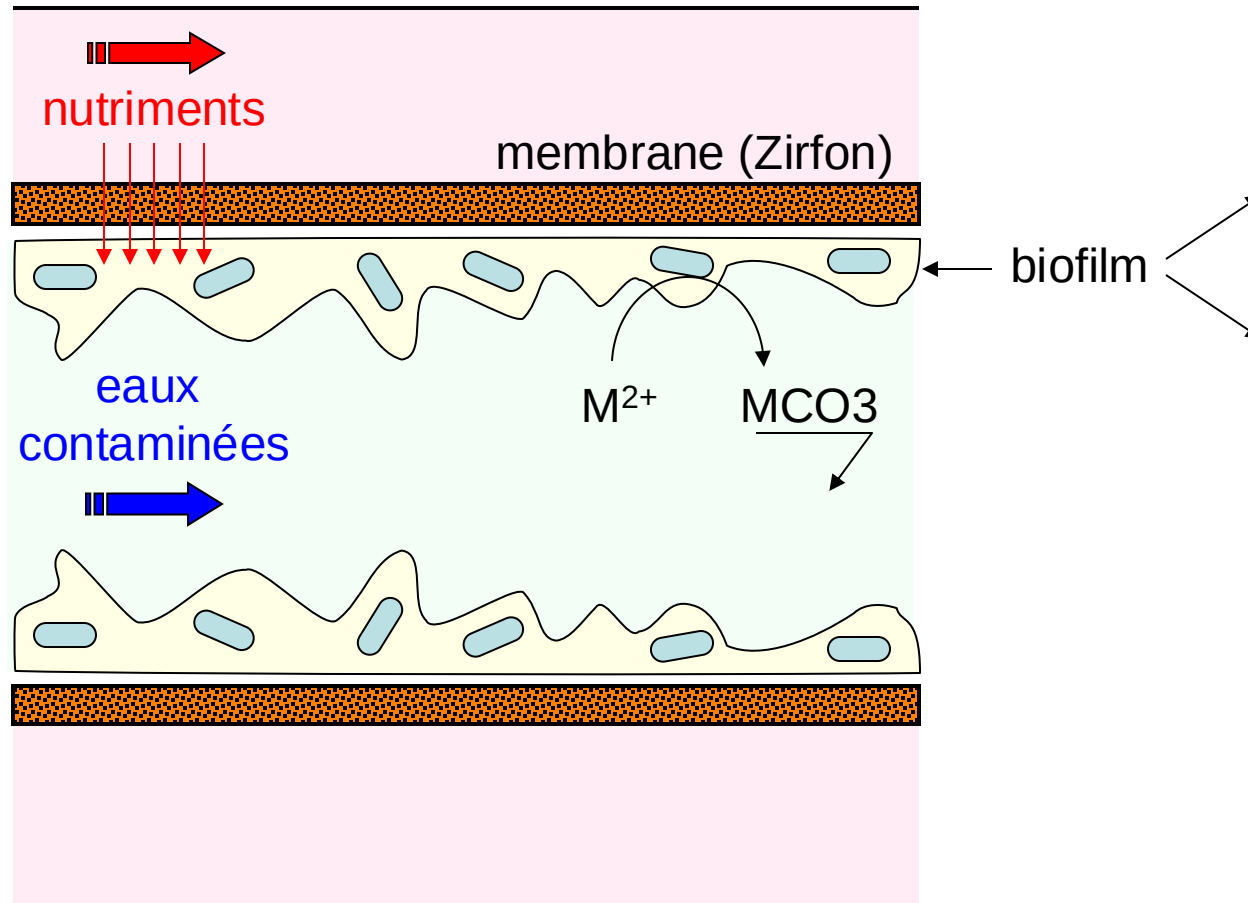


Fig. 8 Biofilm formation on a Zirfon® membrane (SEM-photo). A Zirfon®-membrane + biofilm, B detailed photo of the biofilm

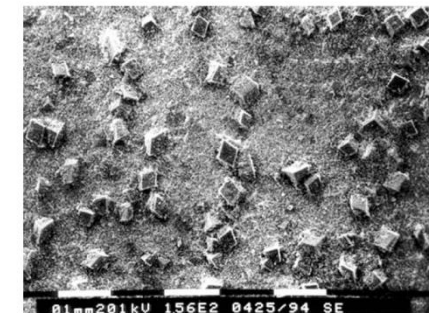
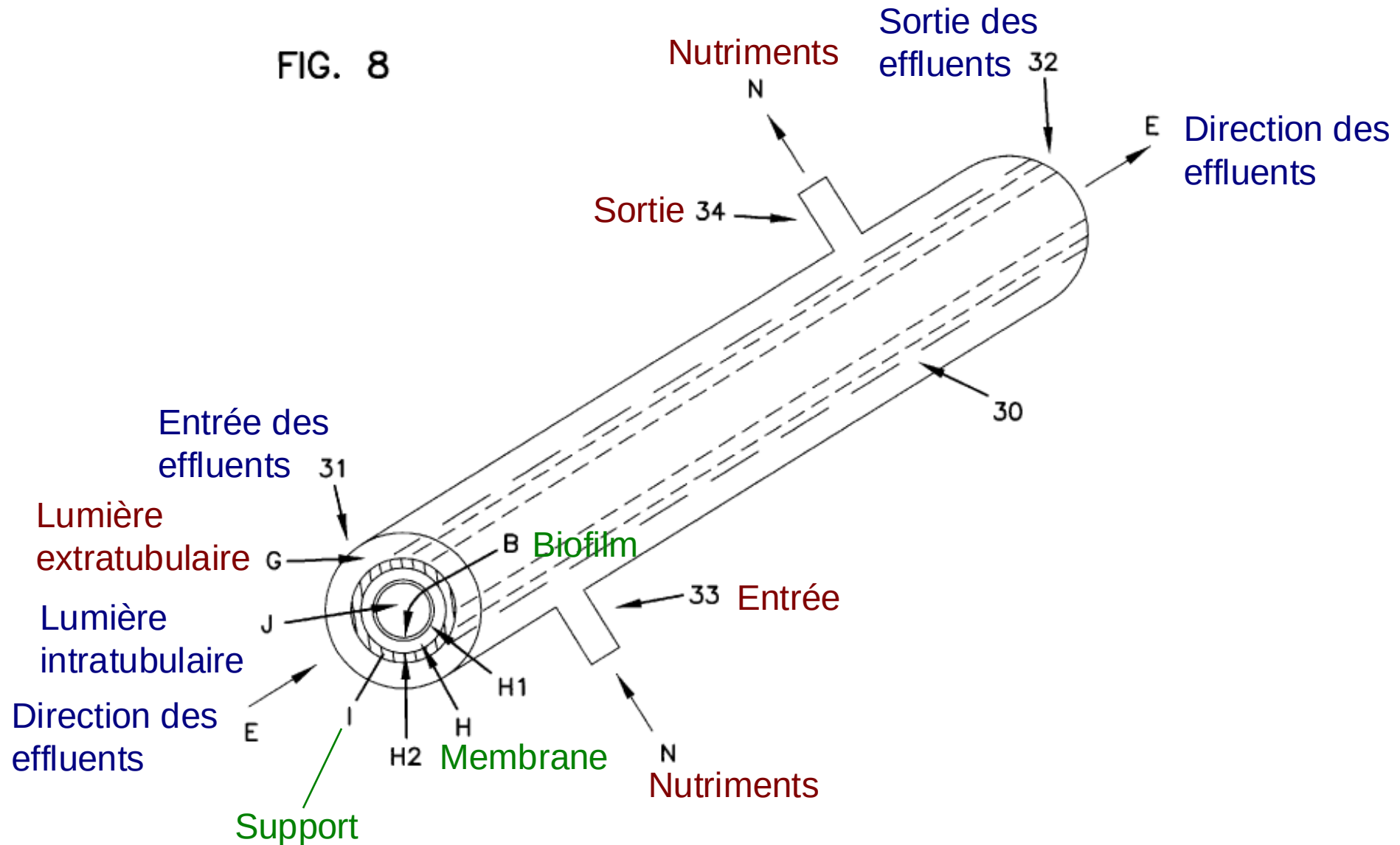


Fig. 9 $CdCO_3$ crystals formed by *C. metallidurans* in the Bacteria Immobilized Composite Membrane Reactor induced biofilm (SEM-photo)

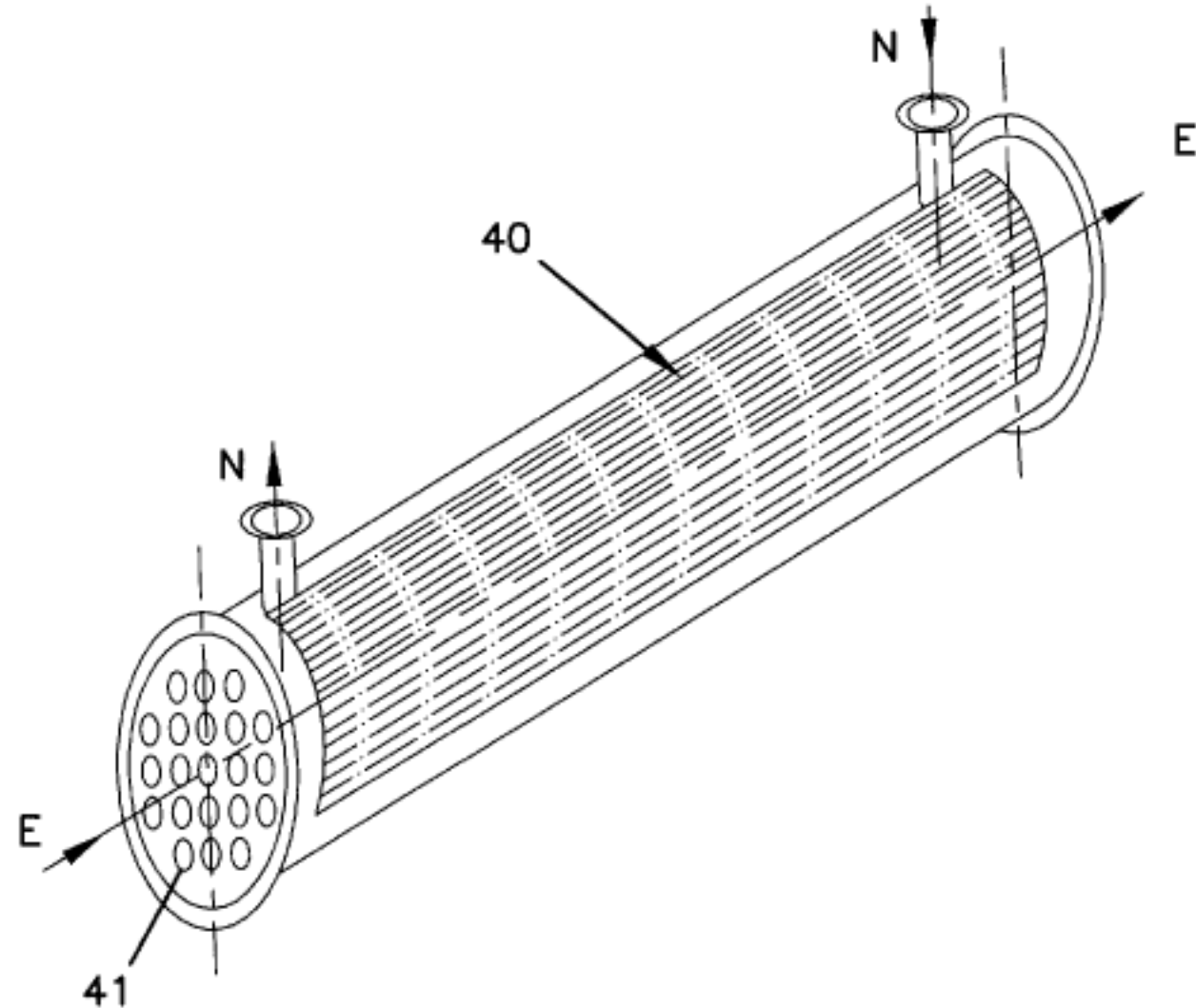
Réacteur à membrane tubulaire





Réacteur à membrane tubulaire multiple

FIG. 9



Membrane en fibres (pas de support)



Différents modèles de réacteur

Flat Sheet Reactor

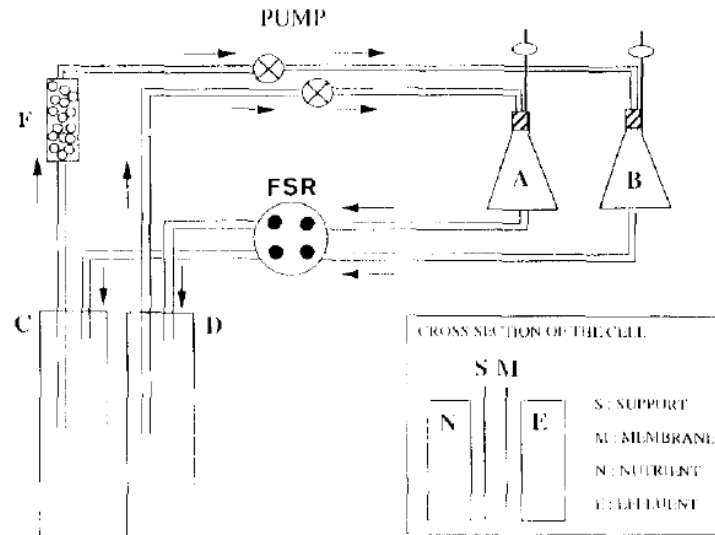


Fig. 2. Flat sheet reactor. A: nutrient; B: effluent; C, D: siphons; F: glass bead column (only used for the removal of heavy metals); FSR: flat sheet reactor.

Tubular Membrane Reactor →

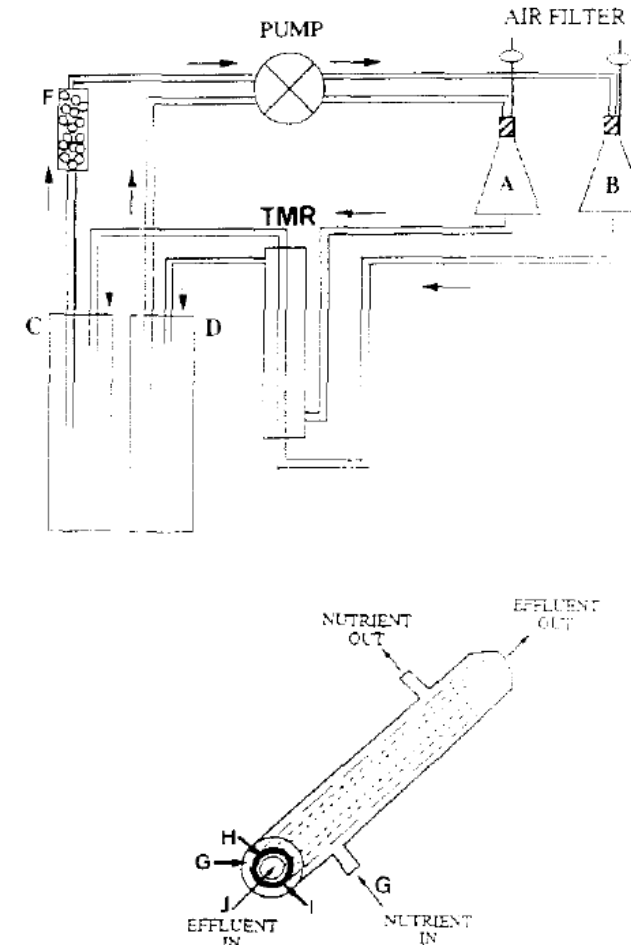
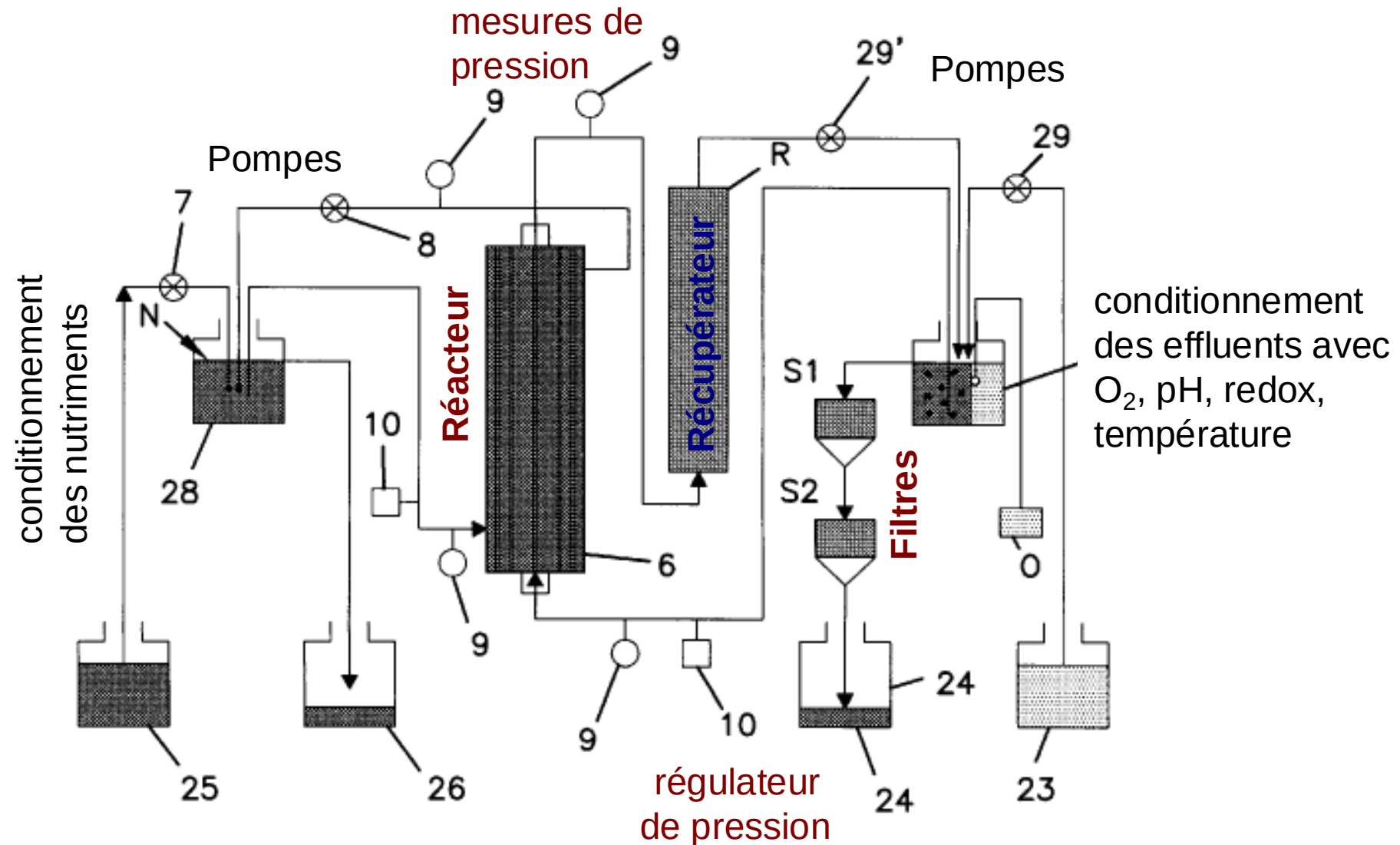


Fig. 3. Overview of a tubular system. A: nutrient; B: effluent; C, D: siphons; F: glass bead column (only used for the removal of heavy metals); G: extralumen space; H: membrane; I: polyester support; J: intralumen space; TMR: tubular membrane reactor.

« Bacteria Immobilized Composite Membrane Reactor »



« Bacteria Immobilized Composite Membrane Reactor »

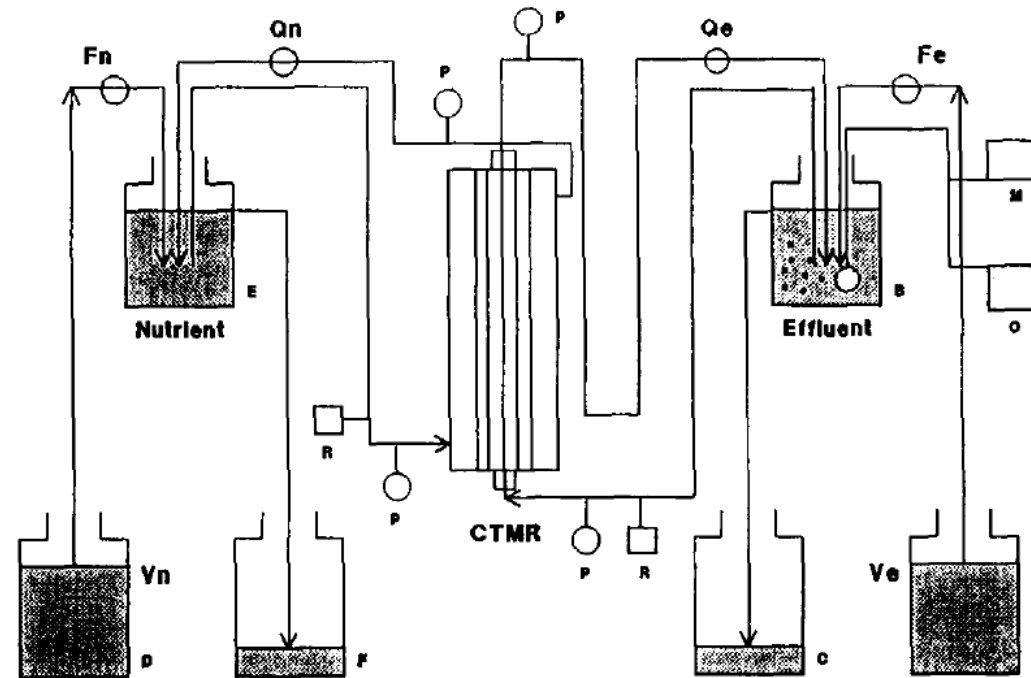
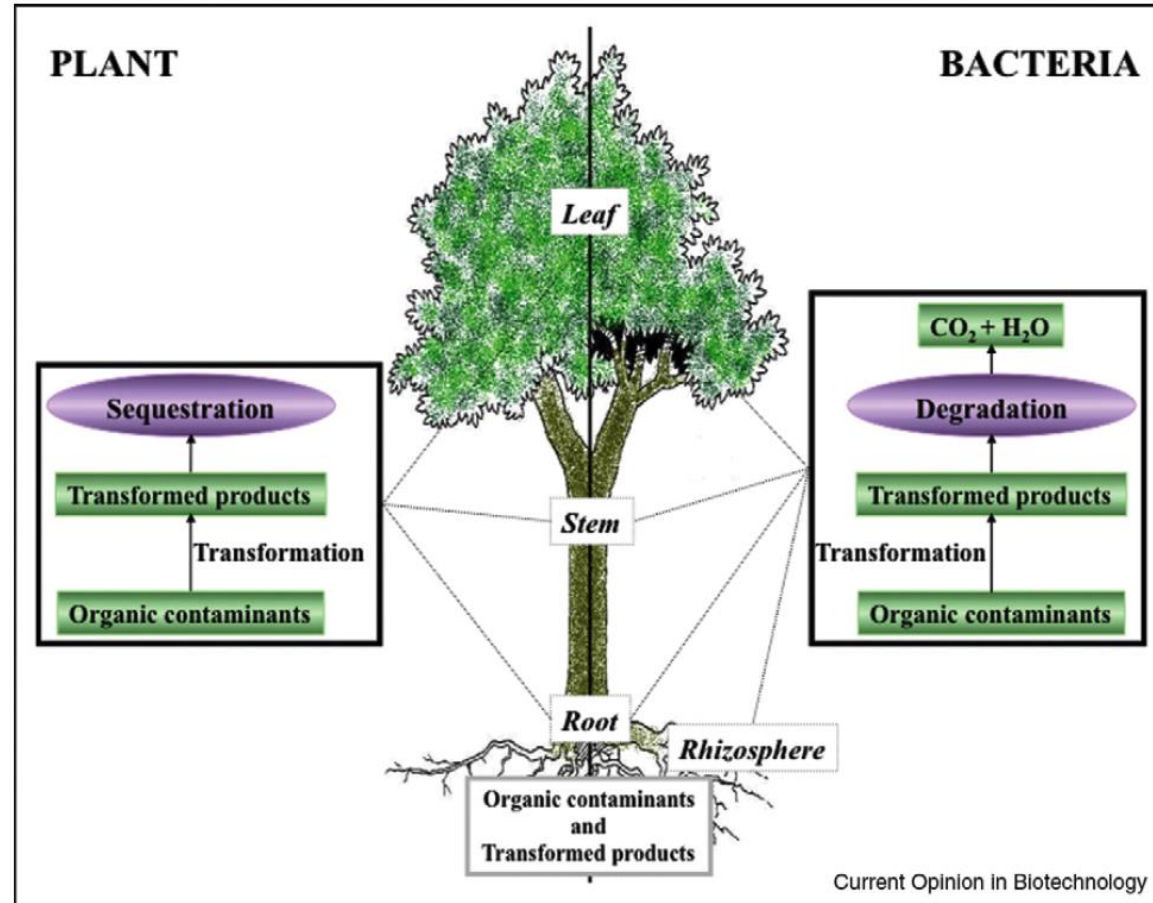


Fig. 4. Presentation of a BICMER. Continuous tubular membrane reactor (CTMR). A total flow sheet is presented. A: effluent stock; B: effluent conditioning; C: effluent output; D: nutrient stock; E: nutrient conditioning; F: nutrient output; TMR: membrane module; M: monitor for pH, O₂ and temperature; O: O₂ provision; P: manometer; R: pressure regulation; Fe and Qe: effluent pumps; Fn and Qn: nutrient pumps.

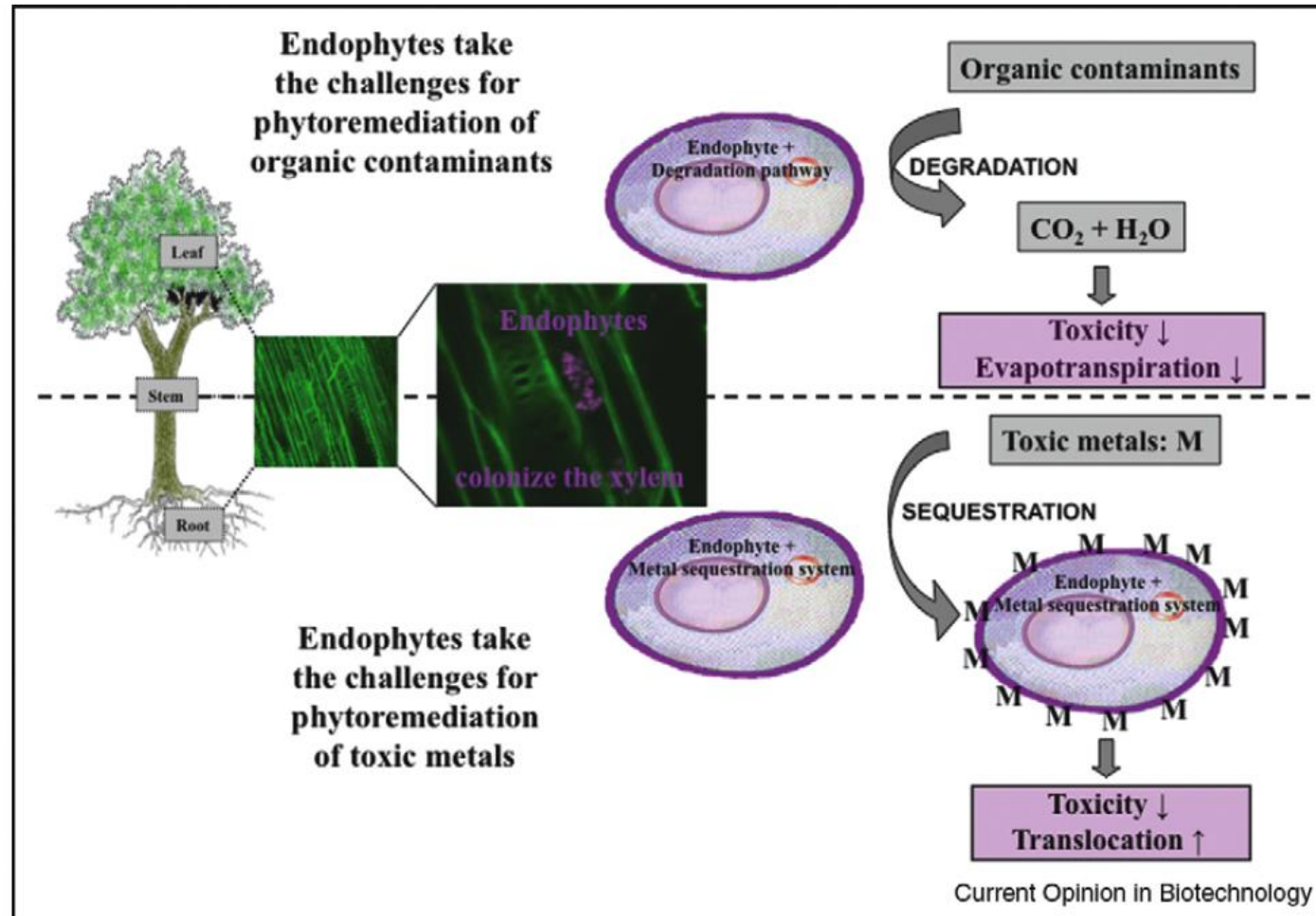
Phytoremédiation

Bactérie endophytique & phytoremédiation

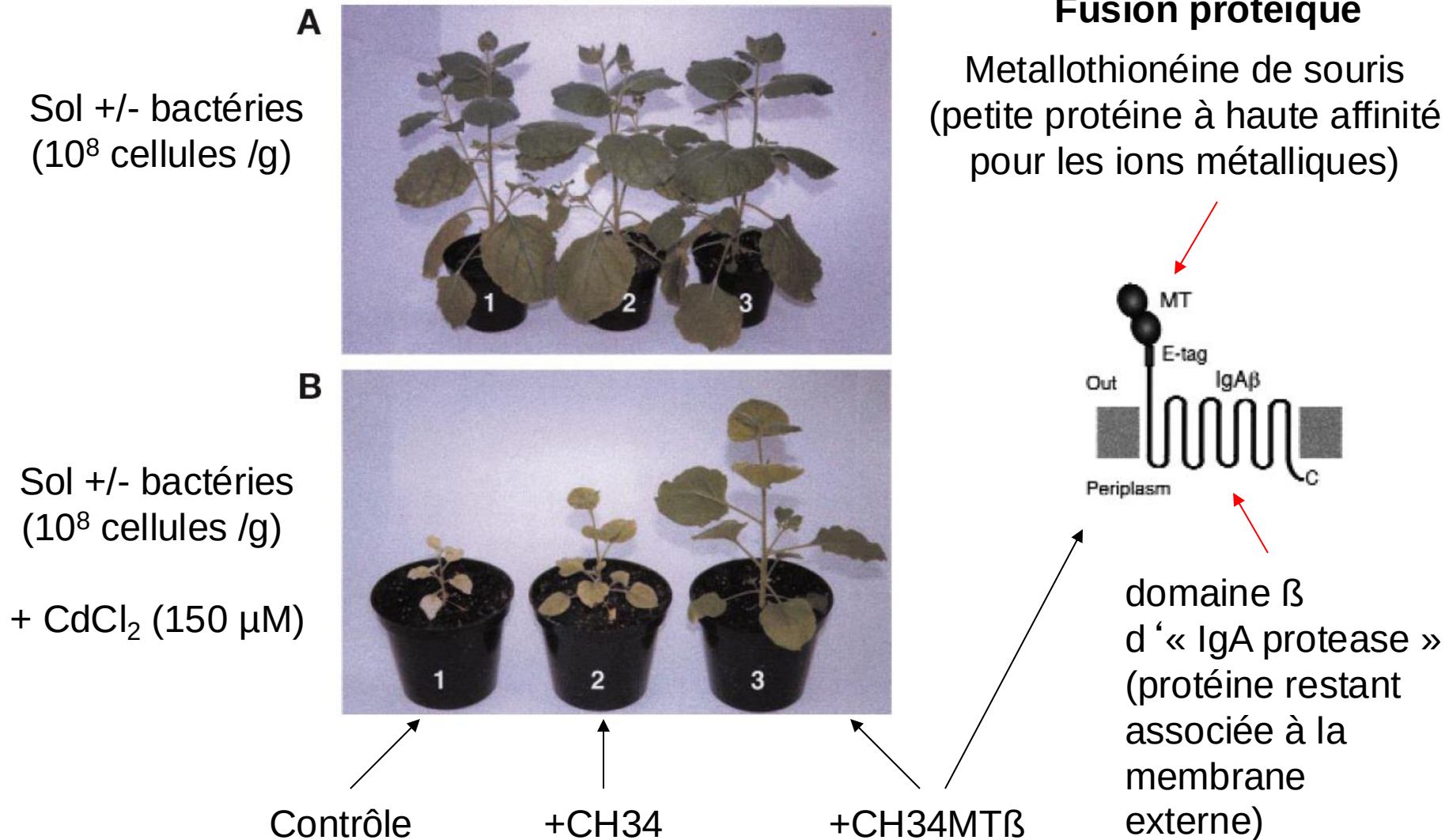


Contribution of plants and their associated bacteria to phytoremediation of organic contaminants.

Bactérie endophytique & phytoremédiation

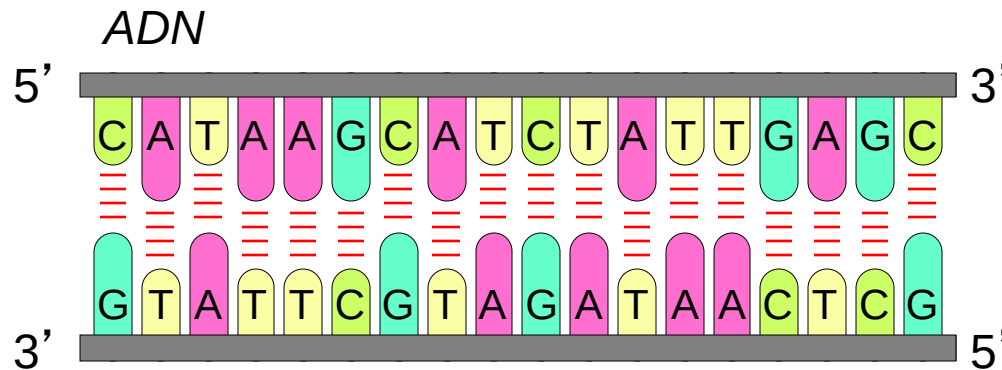


Réduction de la toxicité du Cd^{2+} par CH34

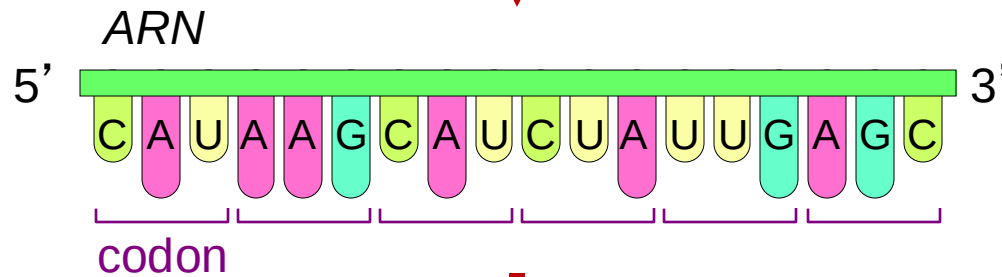


Biosenseurs bactériens

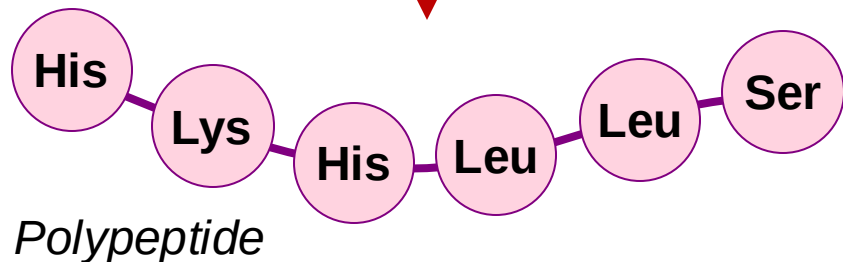
Du gène à la protéine



Transcription



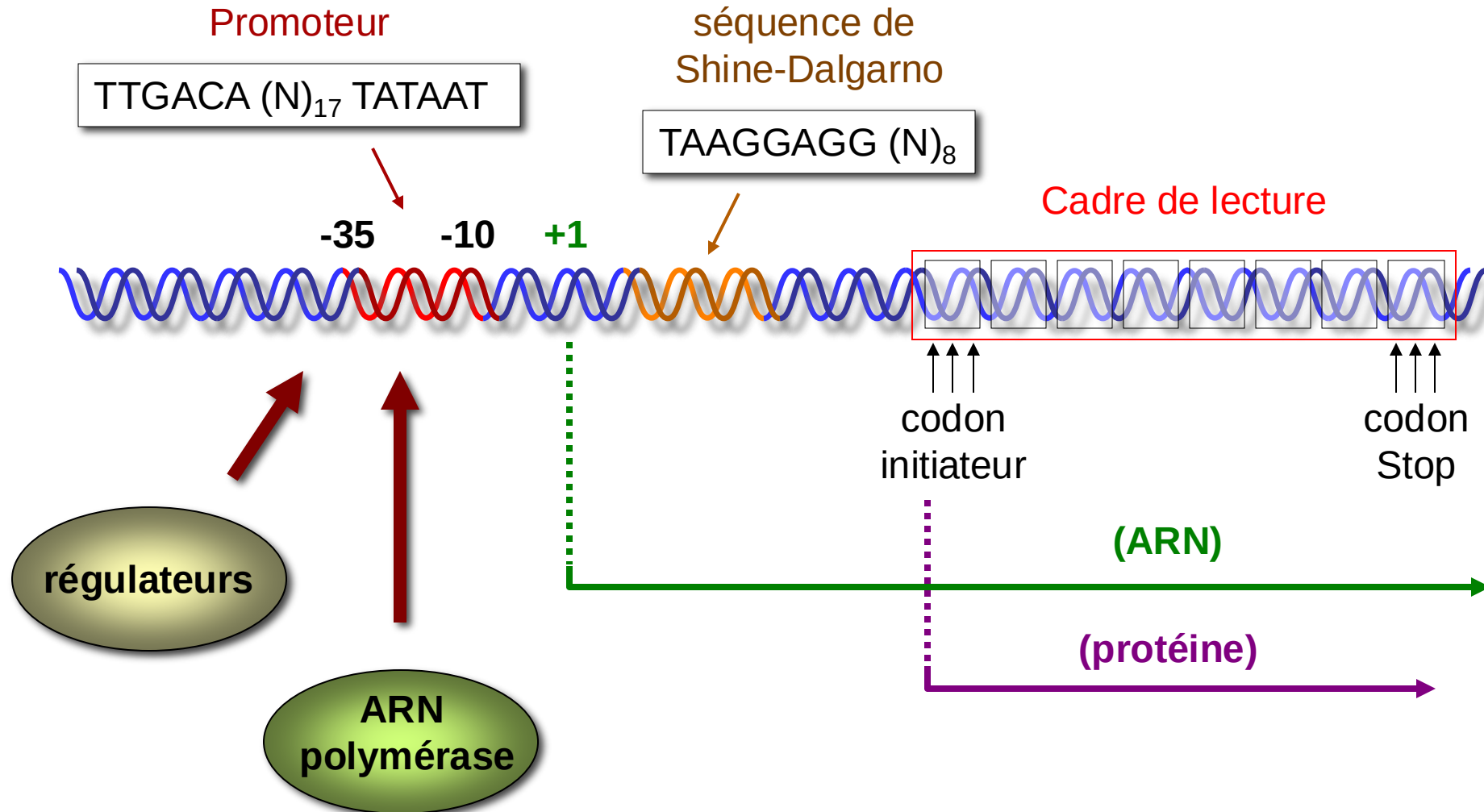
Traduction



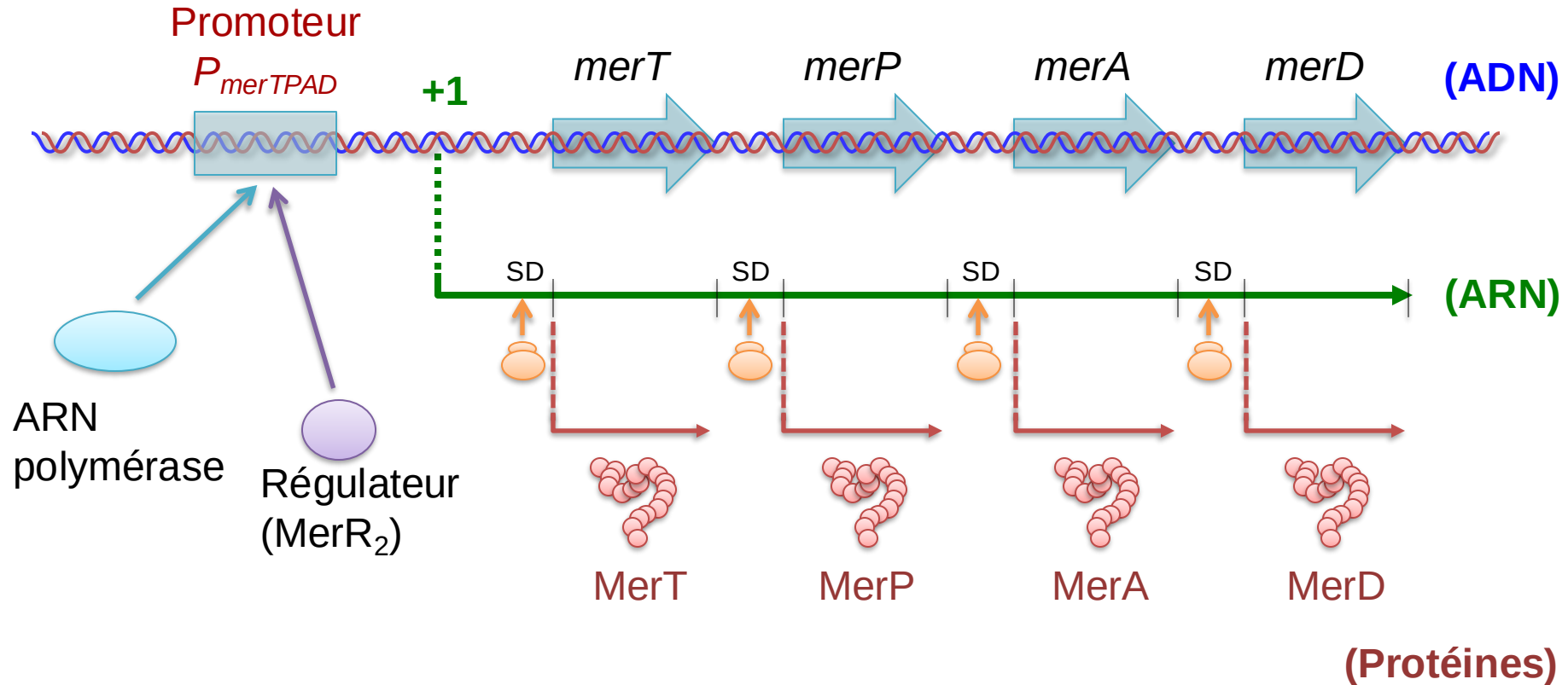
le code génétique

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	Third letter
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG Met	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	

Structure du gène bactérien

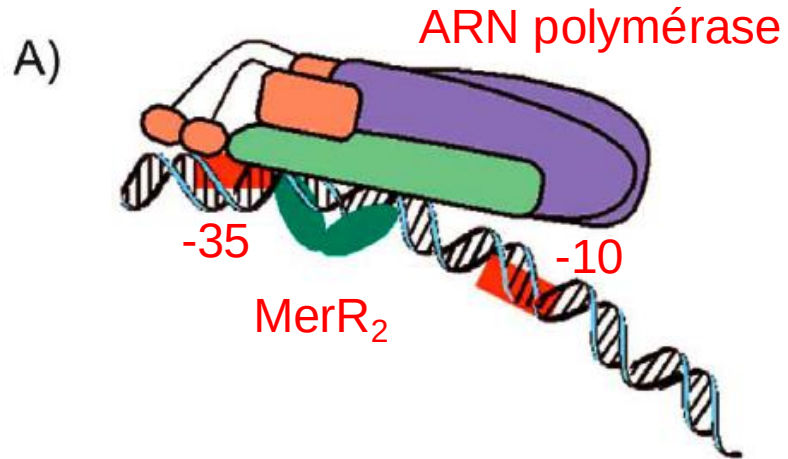


Structure d'un opéron bactérien

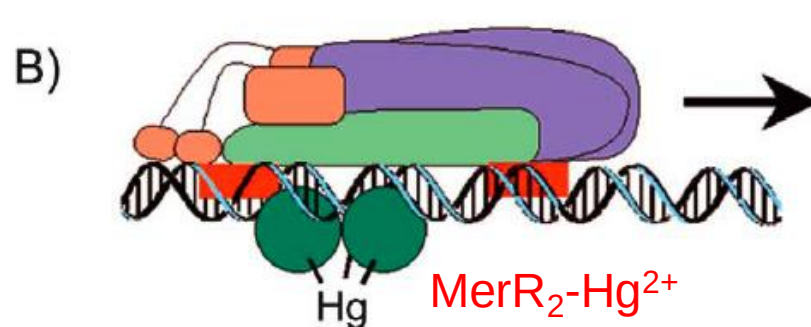


- 1 promoteur / 4 gènes / 1 seul ARN / 4 protéines
- 1 seul système de régulation / 1 expression concertée de 4 protéines

Expression des gènes *mer*



Liaison MerR / ADN / ARN polymérase
mais complexe formé inactif.
Répression des promoteurs P_{merR} et
 $P_{merTPAD}$.

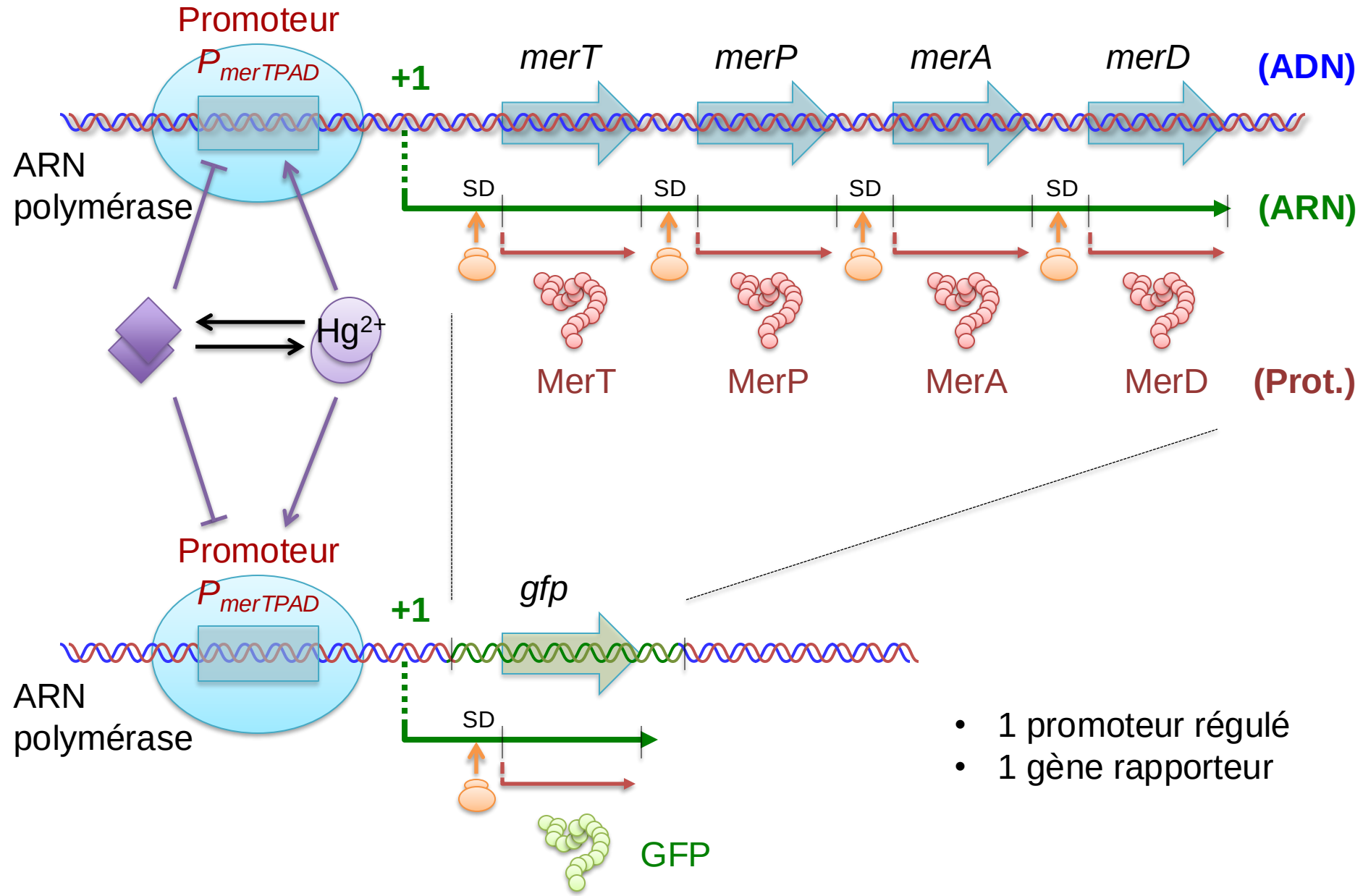


Liaison de Hg²⁺ à MerR , changement
de conformation du complexe et
induction de la transcription



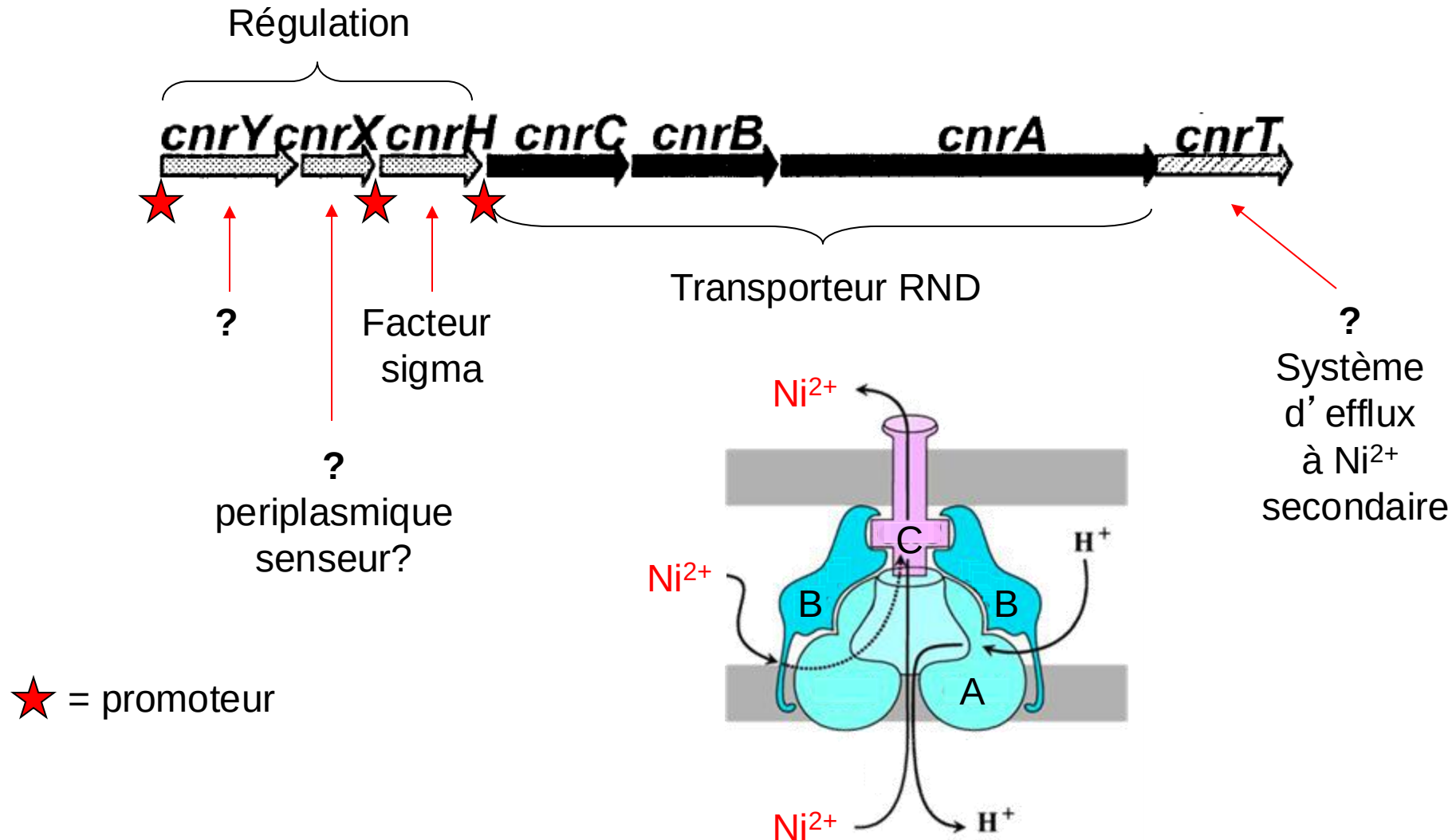
Libération du promoteur via
déplacement de MerR-Hg²⁺ par MerD

Principe d'un biosenseur bactérien



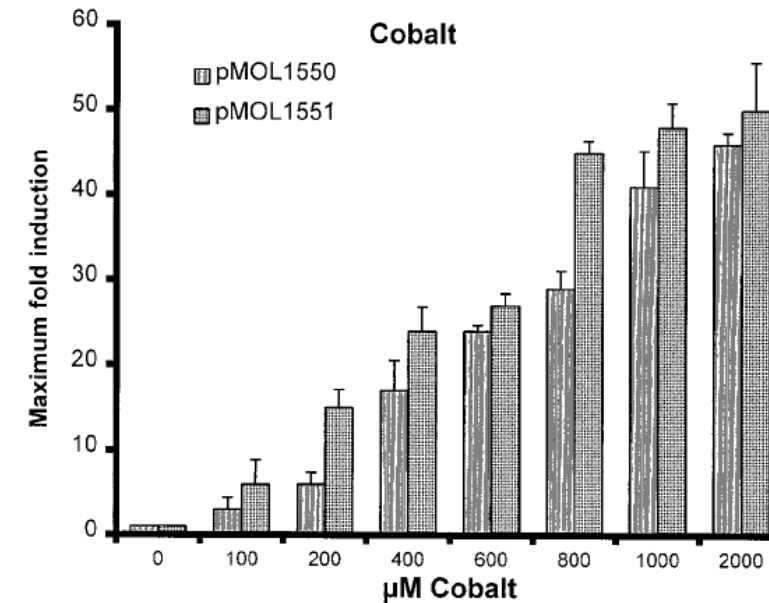
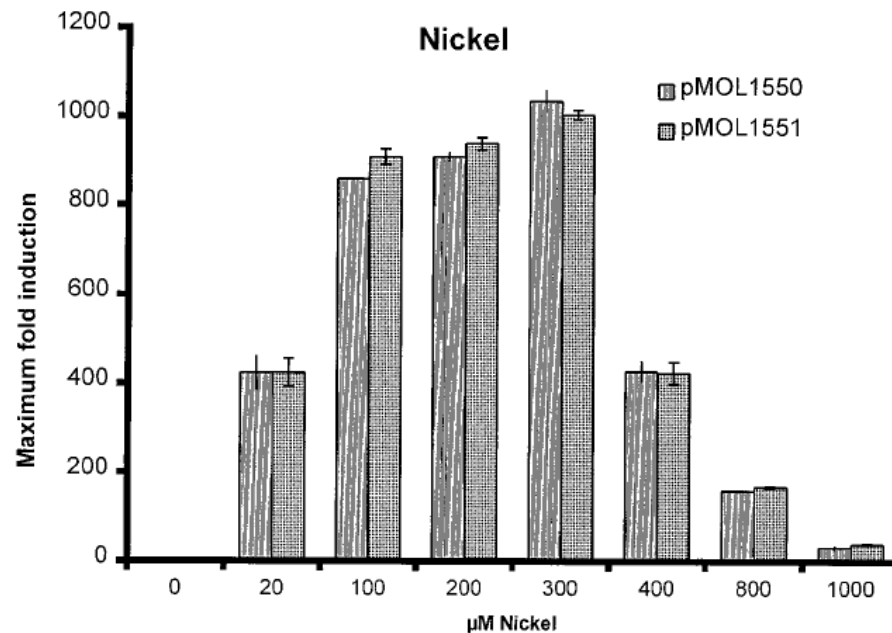
Exemple de régulation : le système *cnr*

Cobalt Nickel Resistance



Transcription à partir de la région *cnrYXH*

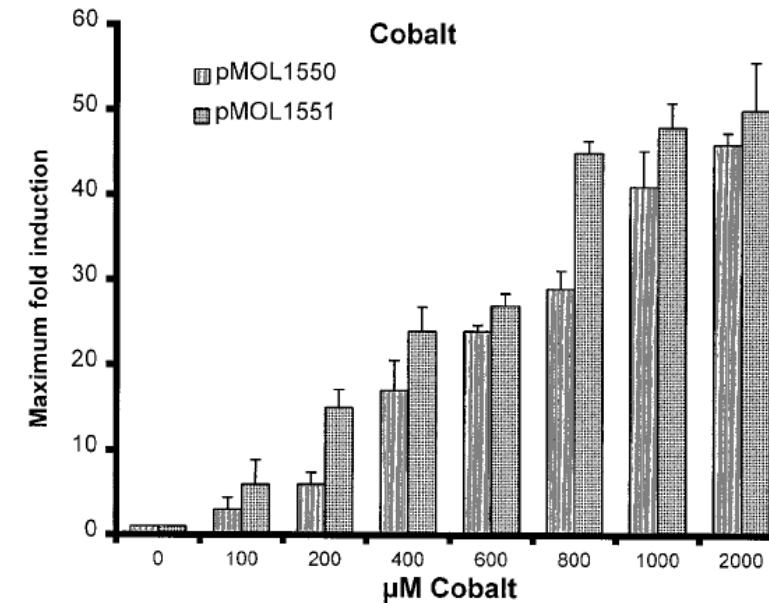
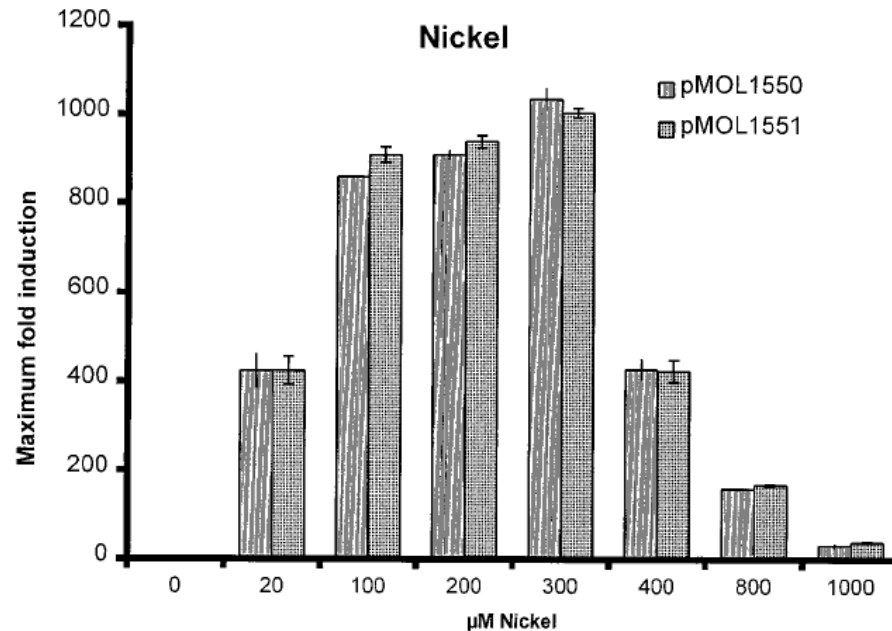
régulation par Ni^{2+} et Co^{2+}



gènes rapporteurs

Transcription à partir de la région *cnrYXH*

régulation par Ni^{2+} et Co^{2+}



Induction *cnrCp* par Ni^{2+} et Co^{2+}

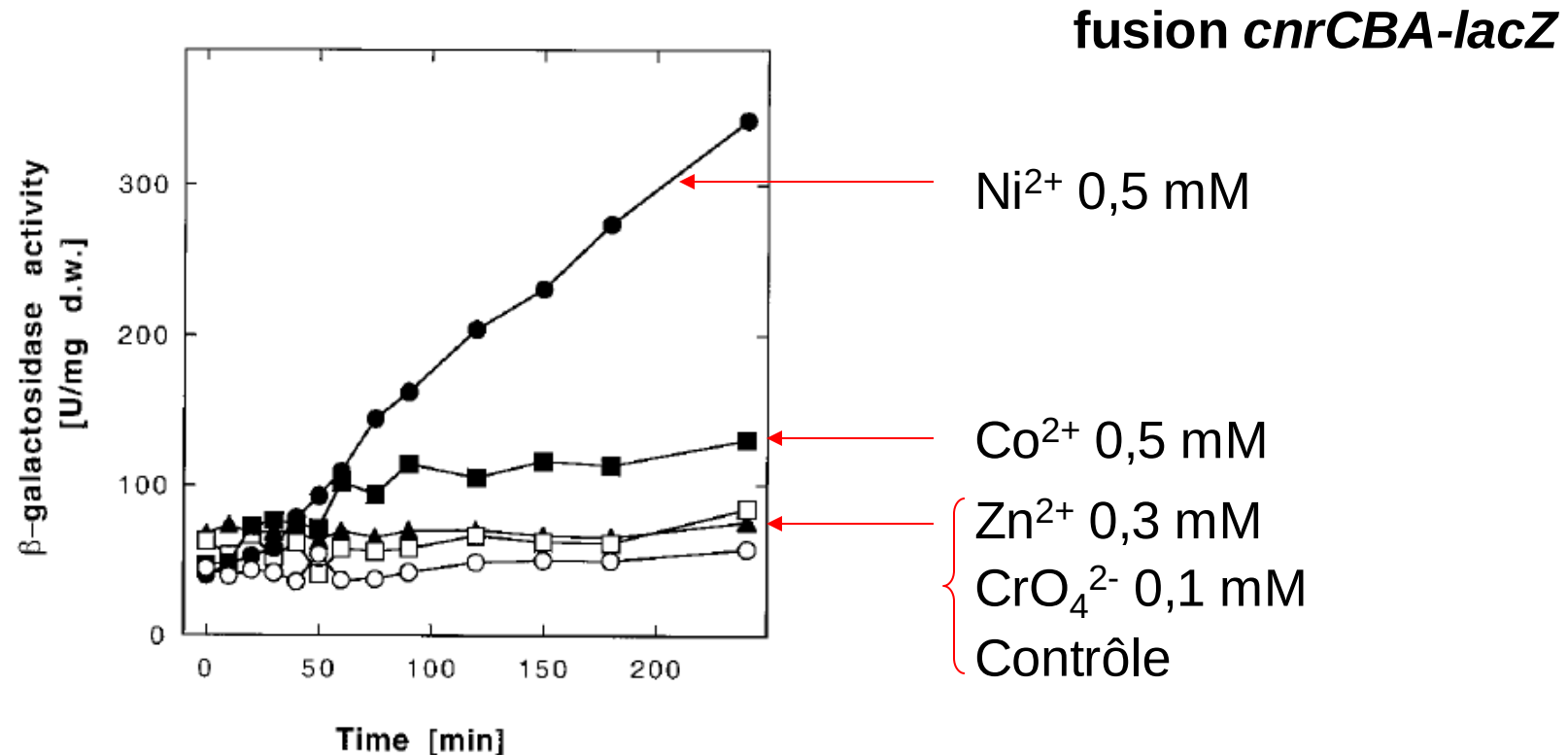
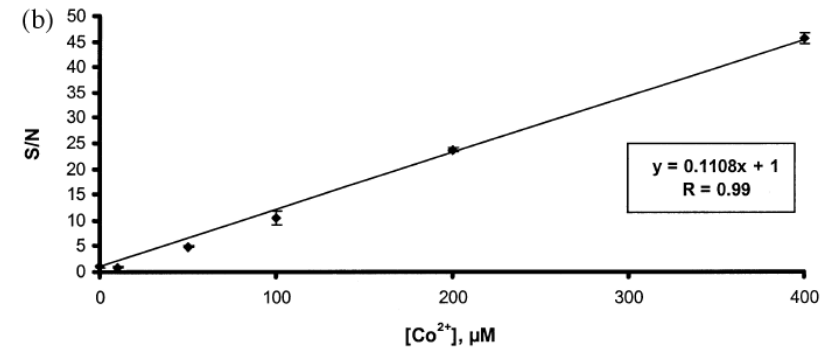
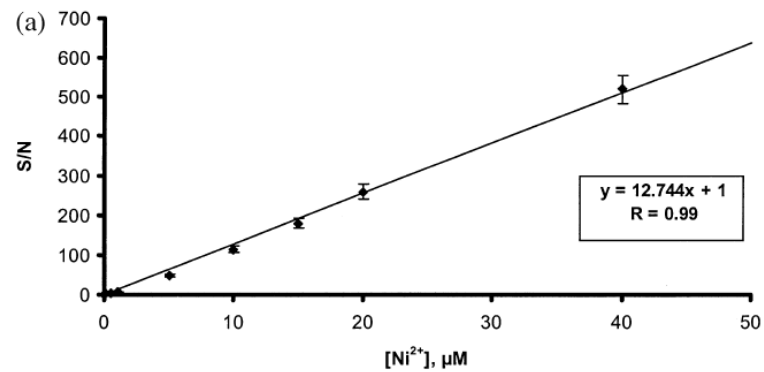
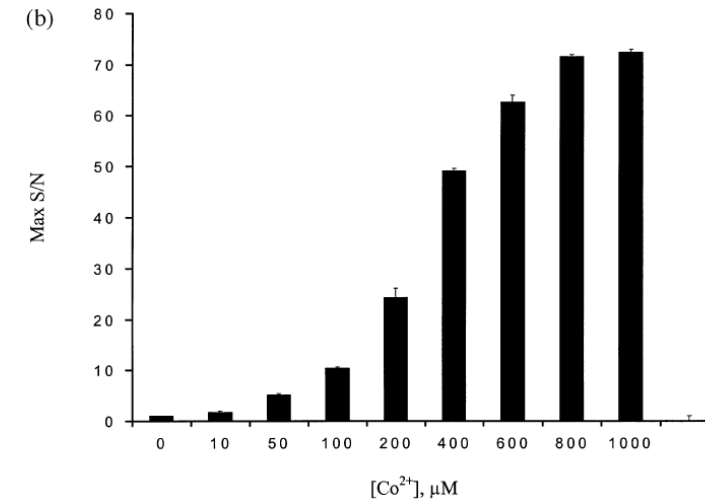
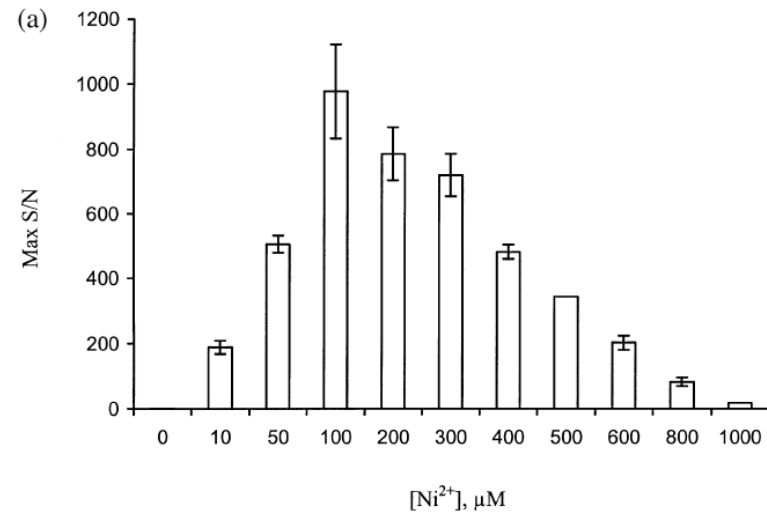
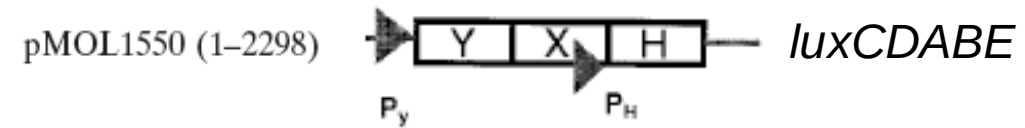


FIG. 6. Induction of β -galactosidase activity in a *cnrCBA-lacZ* strain. Cells of *Ralstonia* sp. strain DN177(pMOL28-2) containing a $\Phi(\text{cnrCBA-lacZ})$ operon fusion on plasmid pMOL28-2 were diluted 15-fold to a cell density of 30 Klett units into fresh medium containing no added heavy metal ($\circ$) or were induced after 4 h with 0.5 mM Ni^{2+} ($\bullet$), 0.5 mM Co^{2+} ($\blacksquare$), 0.3 mM Zn^{2+} ($\square$), or 0.1 mM potassium chromate ($\blacktriangle$). Incubation was continued with shaking at 30°C, and the β -galactosidase activity was determined. d.w., dry weight.

Résistance aux métaux et biodétection



Résistance aux métaux et biodétection

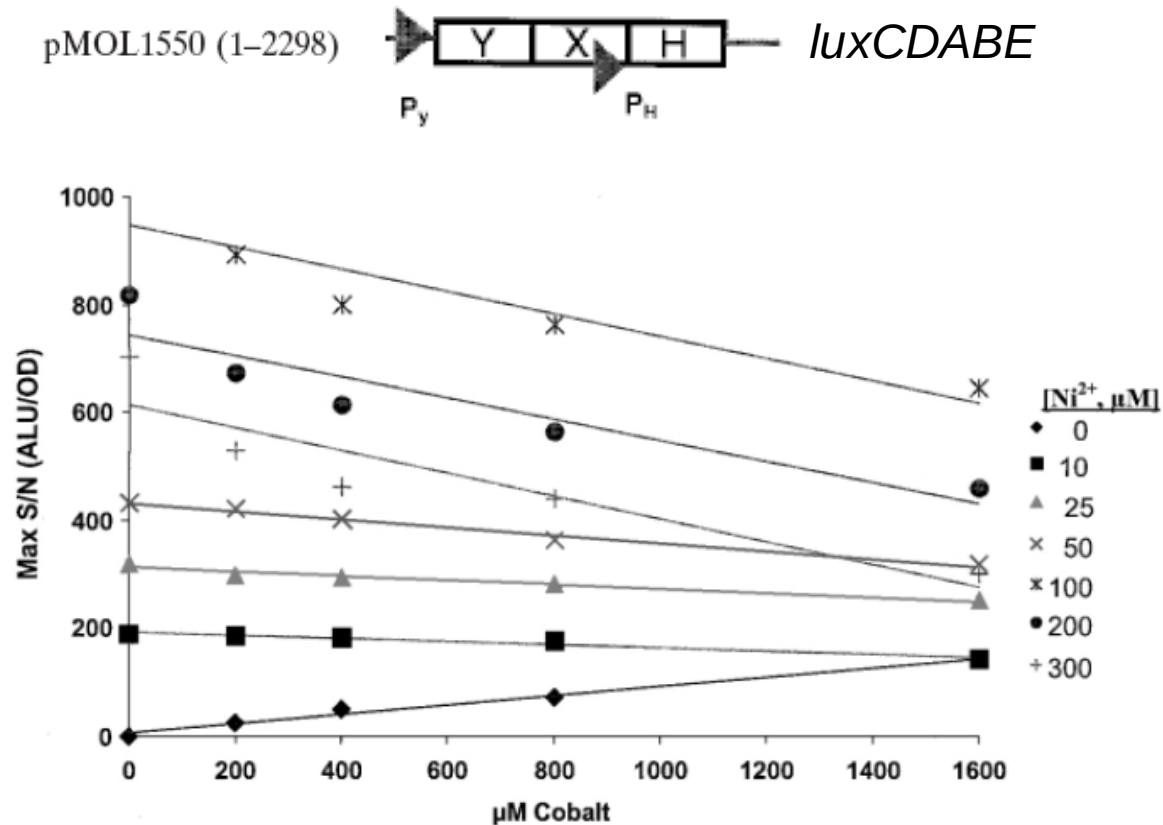


Fig. 4. Performance of the AE2515 biosensor strain in mixed metal solutions. The signal/noise values were compared for the biosensor in the presence of various fixed Ni^{2+} concentrations and increasing Co^{2+} concentrations. Data is an average of two independent experiments, carried out in duplicate.

Résistance aux métaux et biodétection

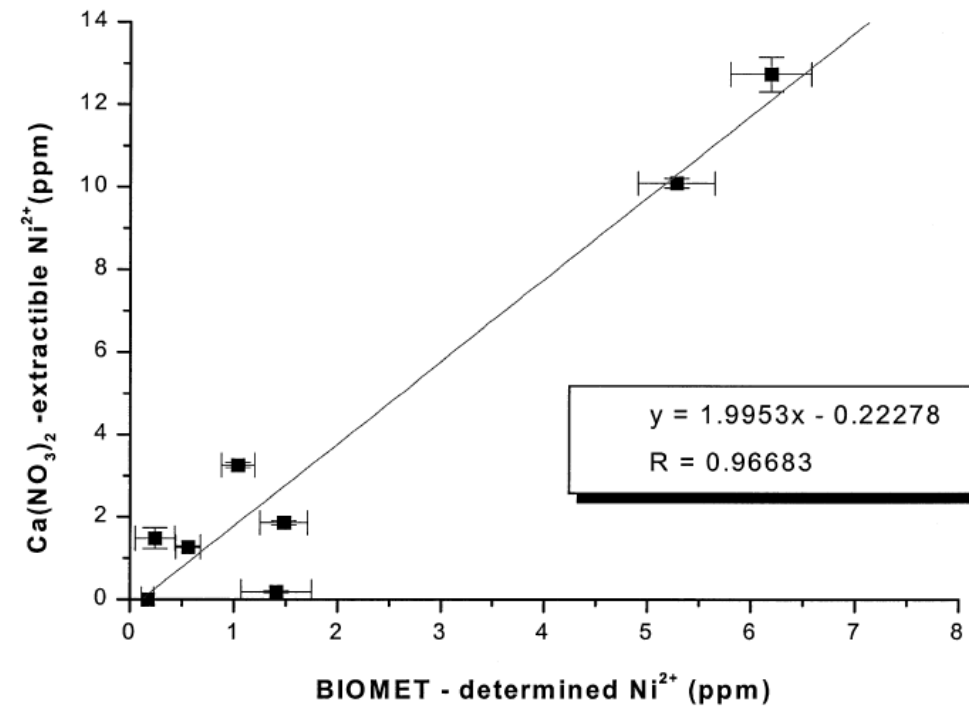
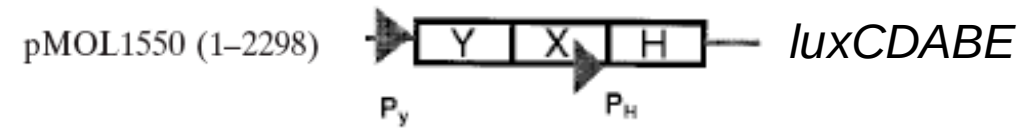


Fig. 5. Correlation of concentration of bioavailable nickel, as determined with the biosensor strain AE2515 and the calcium nitrate exchangeable nickel fraction in different Louis Fargues soils. The AE2515-determined data on nickel bioavailability different samples of Louis Fargues soils are plotted against the calcium nitrate data obtained by Boisson et al., 1998.

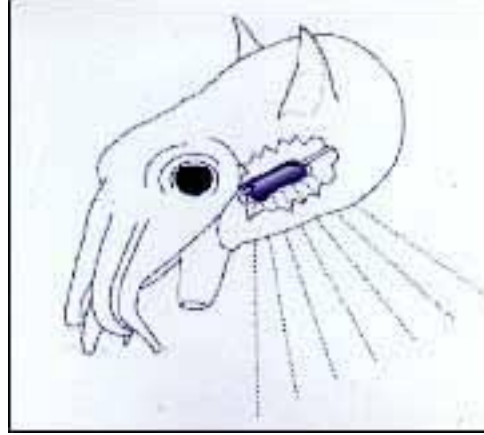
« De la résistance aux métaux lourds aux biosenseurs »

Cas du test BIOMET

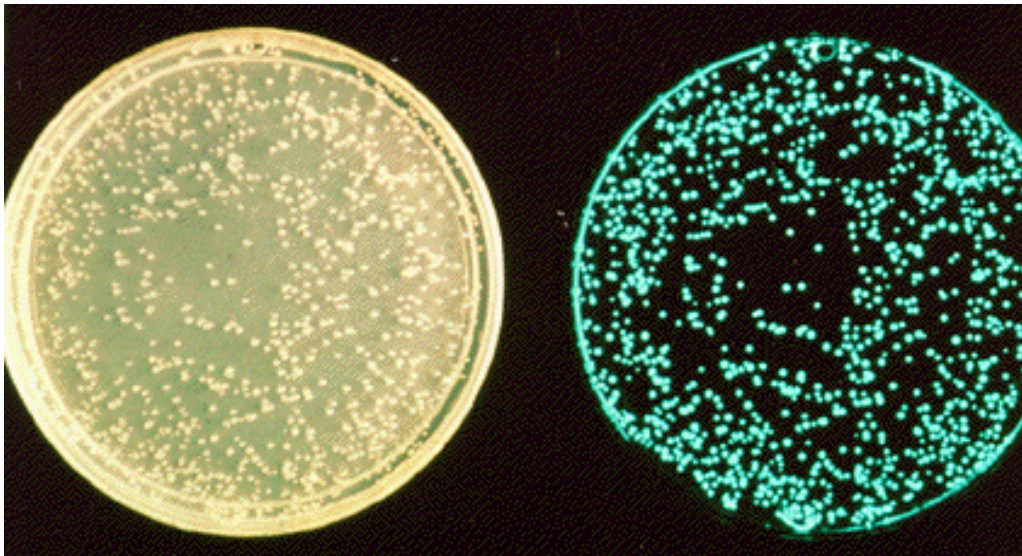
Name	Bacterial host	Metal ions	Detection limit (μM)	Detection range (μM)	Reference
AE1239	<i>C. campinensis</i> DS185	Cu ²⁺	2	2–40	Collard et al. (1994)
AE1433	<i>C. metallidurans</i>	Zn ²⁺	5	5–250	Collard et al. (1994)
	CH34	Cd ²⁺	5	1–25	
AE2440	<i>C. metallidurans</i>	Cr ⁶⁺	1	1–40	Corbisier et al. (1999)
	CH34				
AE1110	<i>C. metallidurans</i>	Tl ⁺	1	1–50	Collard et al. (1994)
	CH34				
AE2515	<i>C. metallidurans</i>	Ni ²⁺	0.08	0.08–100	Tibazarwa et al. (2001)
	CH34				
AE2450	<i>C. metallidurans</i>	Pb ²⁺	0.5	0.5–18	Corbisier et al. (1999)
	CH34				
AE2613	<i>C. eutrophus</i> N9A	Hg ²⁺	0.01	0.01–1	–

Bioluminescence et luciférase

(gènes *luxCDABE*)



Bioluminescence
émise par une bactérie
symbiotique (*Vibrio
fischeri*) ici chez un
Calmar



Colonies bactérienne
(*vibrio fischeri*) sur
boite de pétri en
lumière du jour
(gauche) et à
l'obscurité (droite)

Bioluminescence et luciférase

(biosenseur à phénol : $P_{mopR}::luxCDABE$)

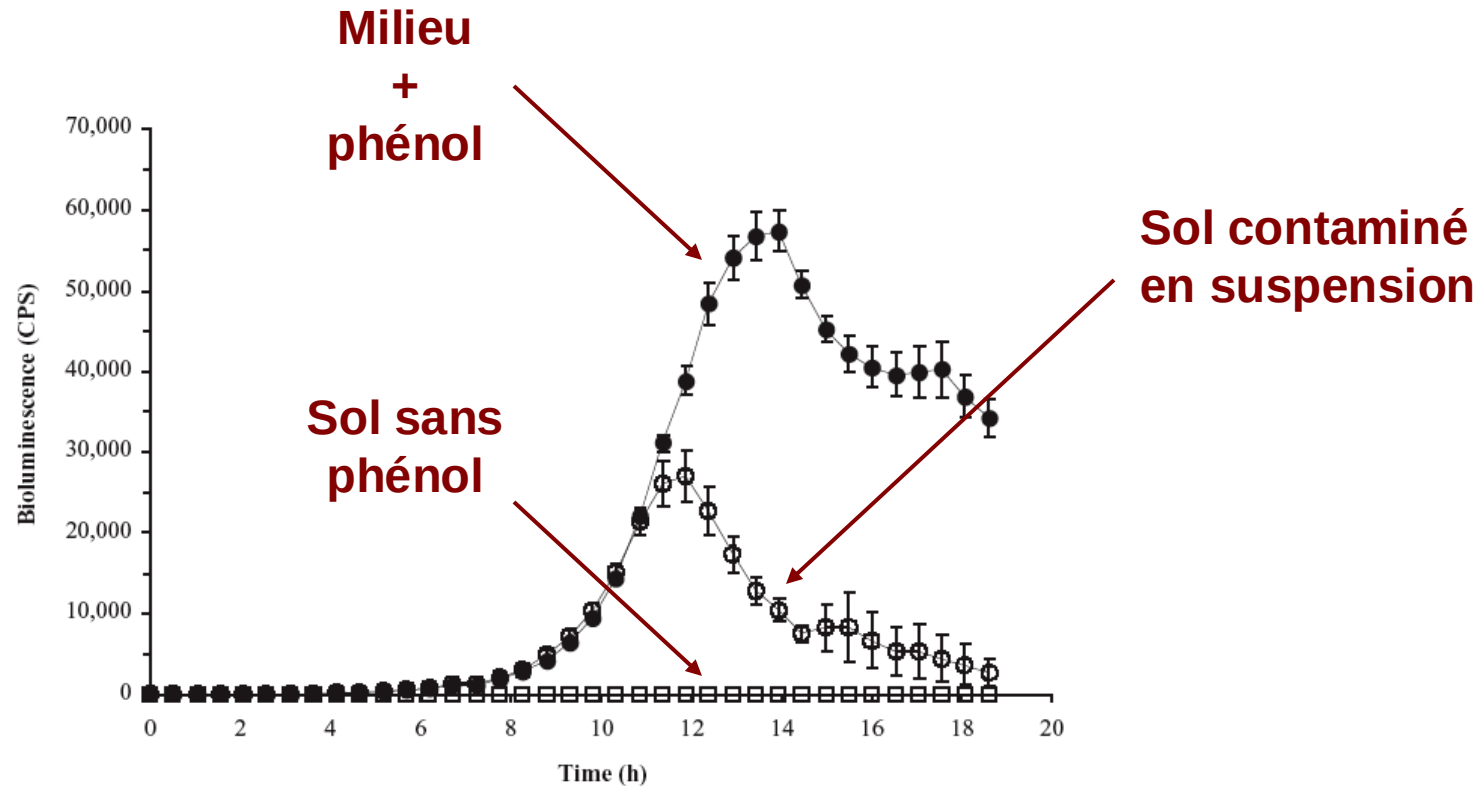


Figure 5 Bioluminescent response of strain DF4-8 to an aged, phenol-contaminated soil slurry (○), MSM containing 45 ppm phenol (●), and soil void of phenol contaminants (□). Error bars calculated as for Figure 2.

Bioluminescence et luciférase

(gènes *luxCDABE*)

LuxCDE :
conversion
d'acide gras
en aldéhydes
à longues
chaînes

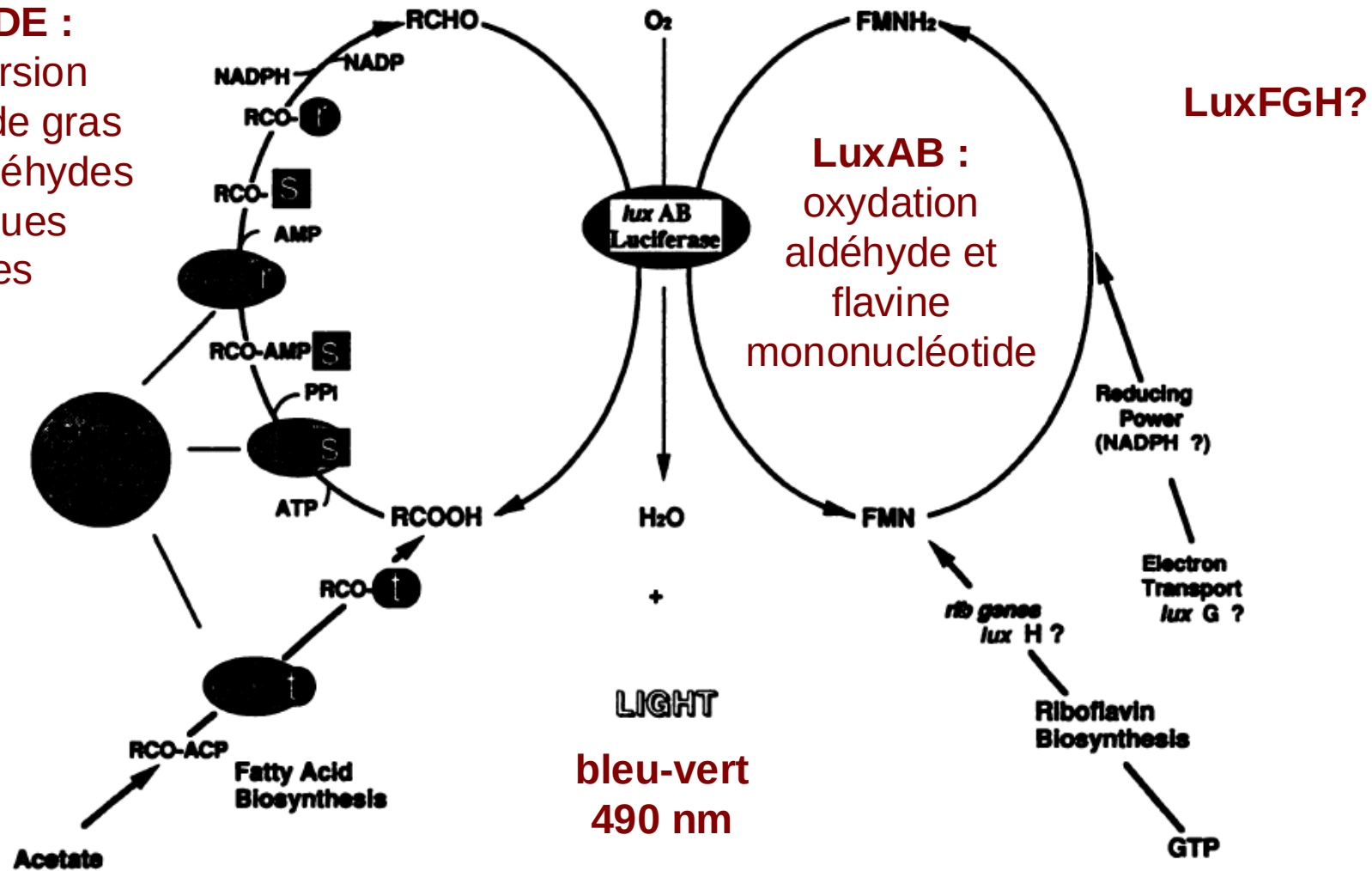
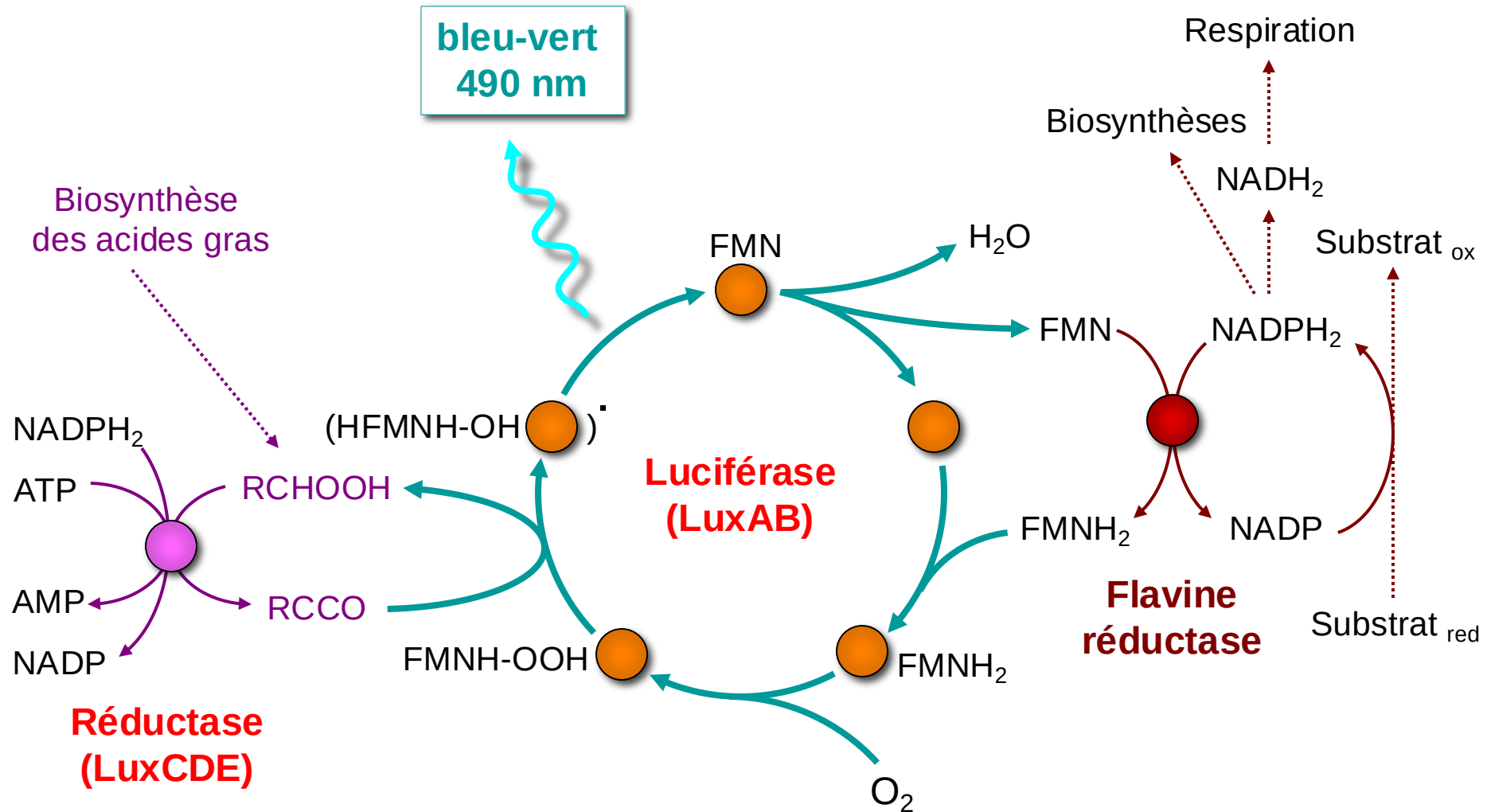
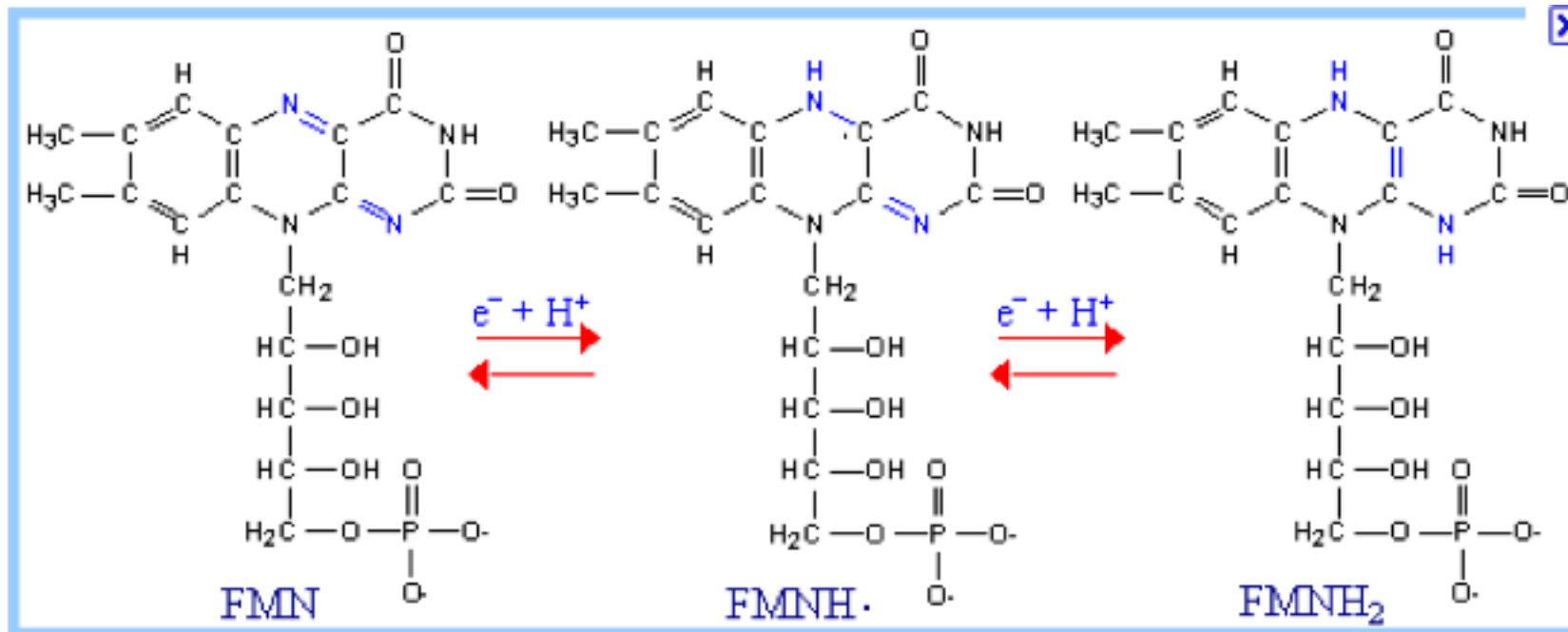


Figure 2. Relationship between the bacterial bioluminescence reaction and the genes and enzymes linked to the *lux* operon.

Bioluminescence et luciférase



FMN : flavine mononucléotide



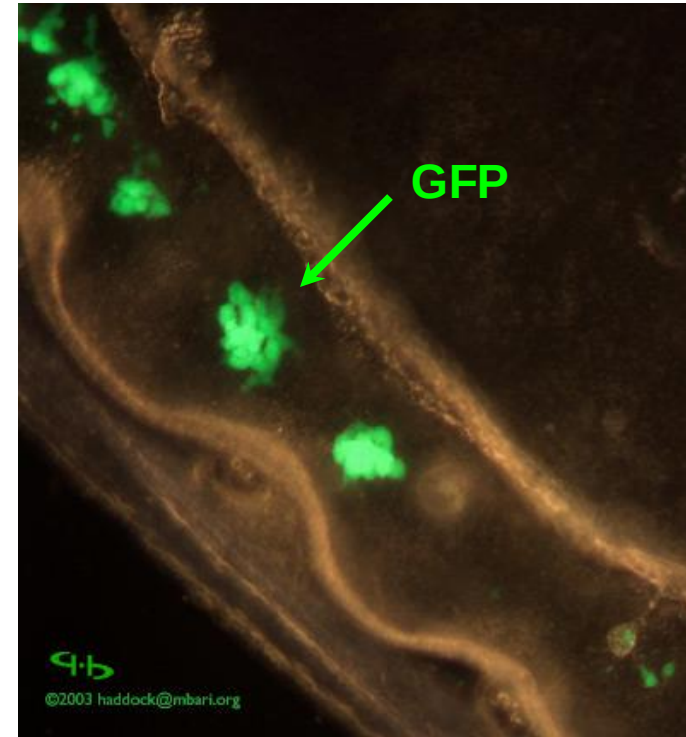
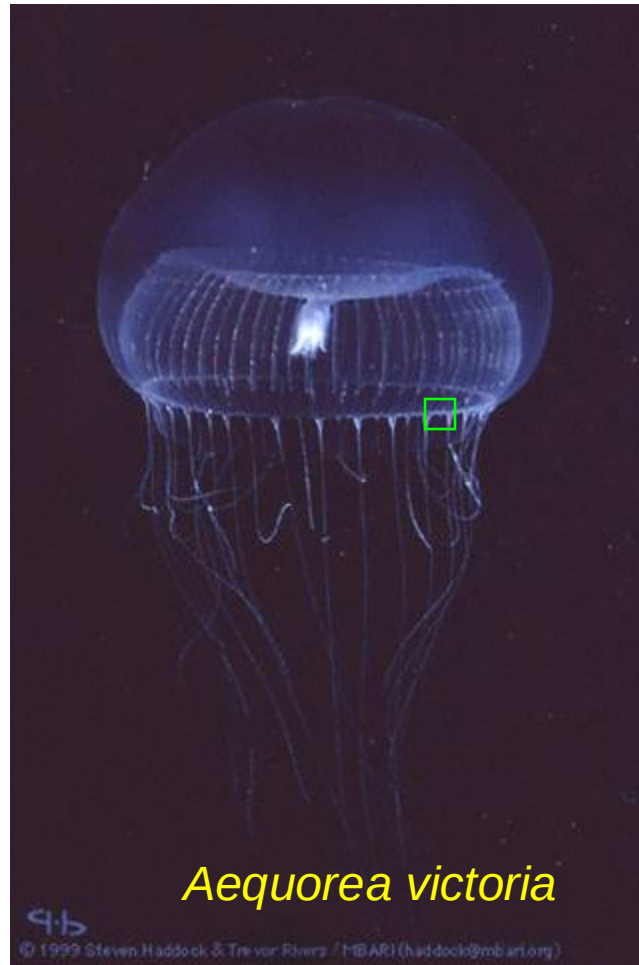
forme oxydée

semiquinone

forme réduite

Autre gène rapporteur : *gfp*

(« green fluorescent protein »)



Claudia Mills :
<http://faculty.washington.edu/cemills/Aequorea.html>

Bioluminescence Web Page :
<http://www.lifesci.ucsb.edu/~biolum/>

Autre gène rapporteur : *gfp*

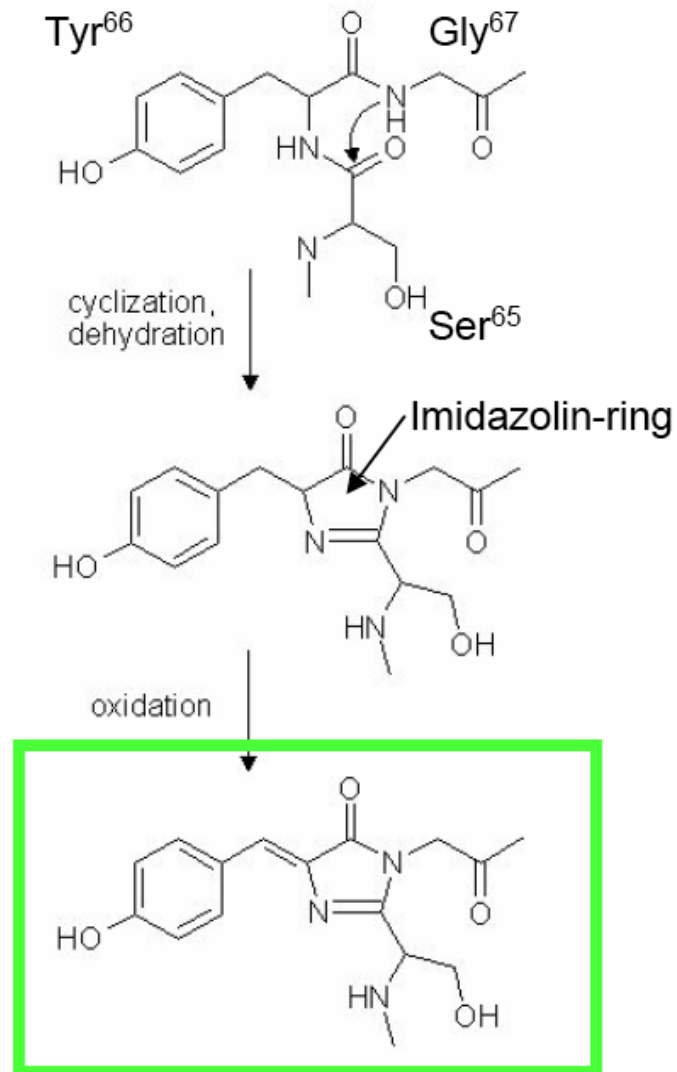
(« green fluorescent protein »)



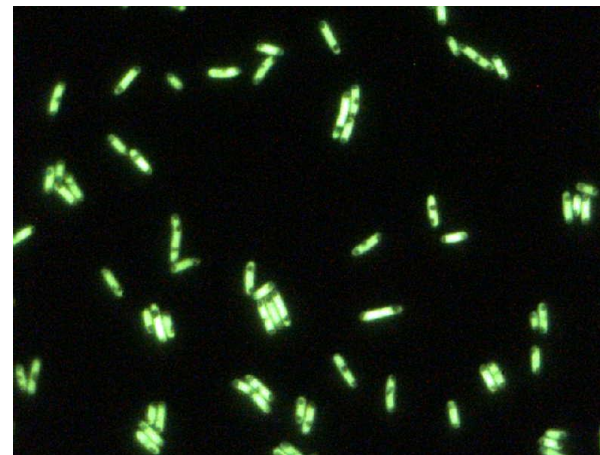
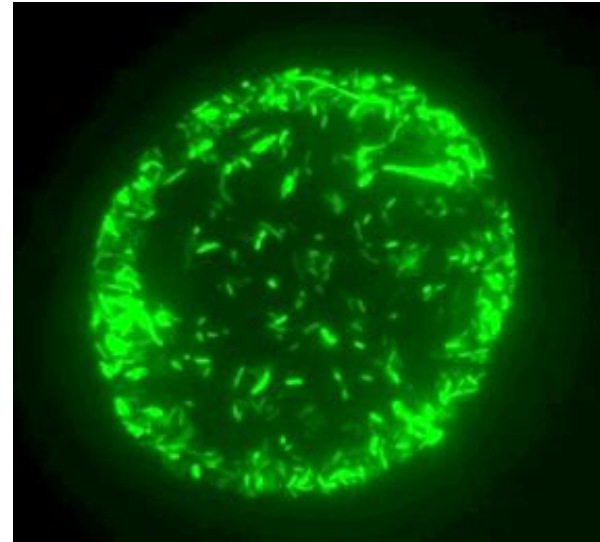
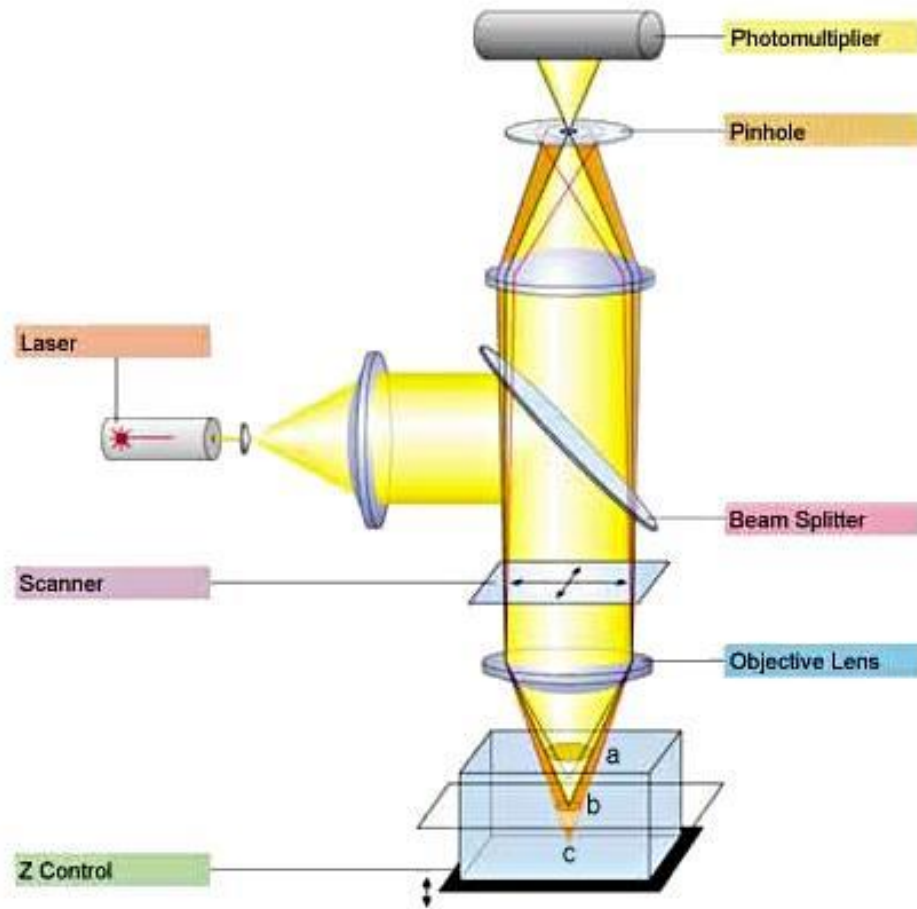
Protéine: 238 aa, structure "beta-can"
Absorbance/excitation: 395 & 475 nm

Site actif Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷

Modification post-traductionnelle :
cyclisation entre Ser⁶⁵ et Gly⁶⁷

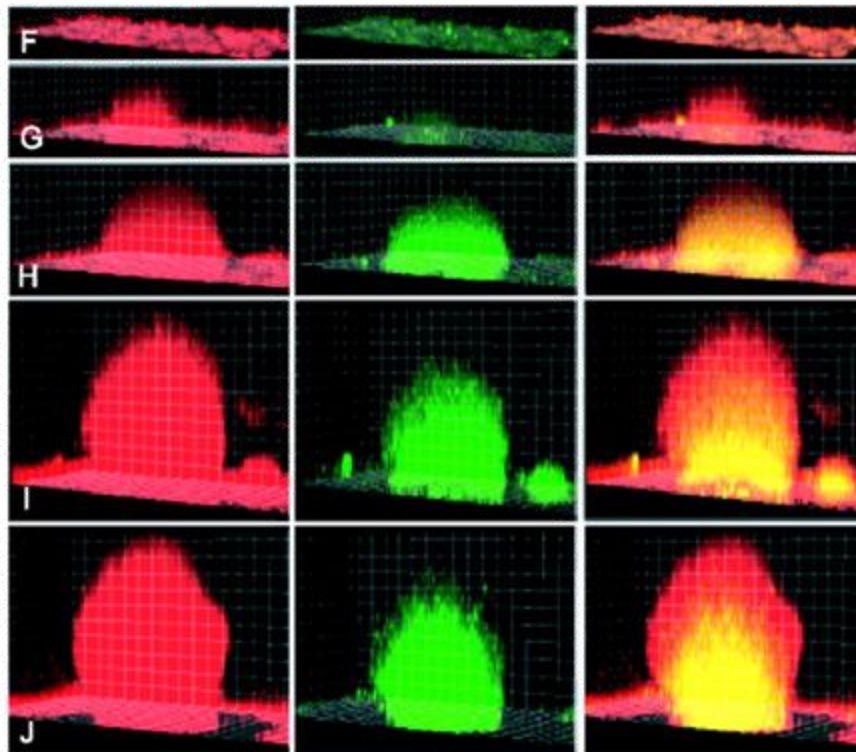


bactéries « marquées » à la GFP



Autres protéines fluorescentes

(Stratification dans un biofilm de *S. oneidensis*)



↑
ecfp
constitutif

↑
fusion *mtrB::*
eyfp[VVA]

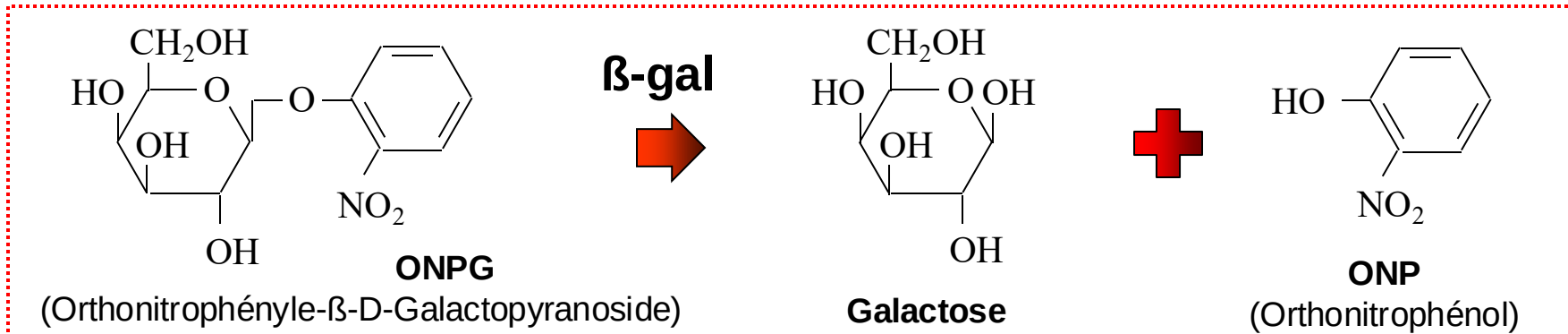
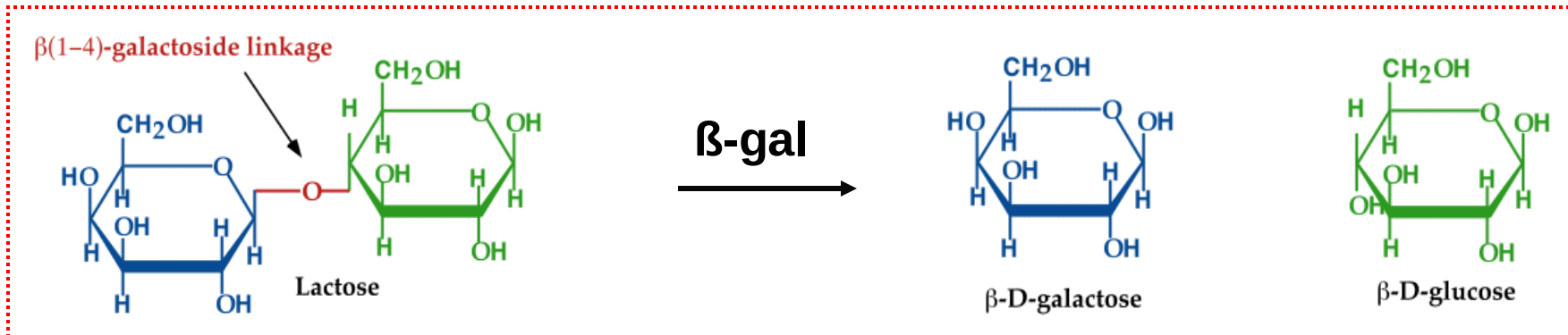
↑
combinaison

(grille : 10 μm $\times$ 10 μm)

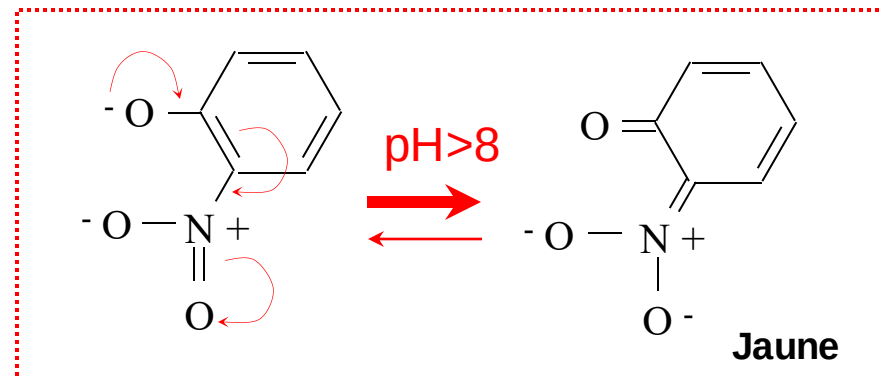
Biodisponibilité O₂

- Fluorescent constitutive dans le cyan (rouge = fausse couleur).
- Evolution du biofilm au cours du temps [F: 17h (8 μm); G: 29h (18 μm); H: 47h (58 μm); I: 71h (104 μm) ; J: 85h (118 μm)].
- Fusion *mtrB::eyfp[VVA]*:
 - pas d'expression avant que le biofilm n'est atteint 60 μm .
 - expression prédominante dans les zones supposées sans O₂.

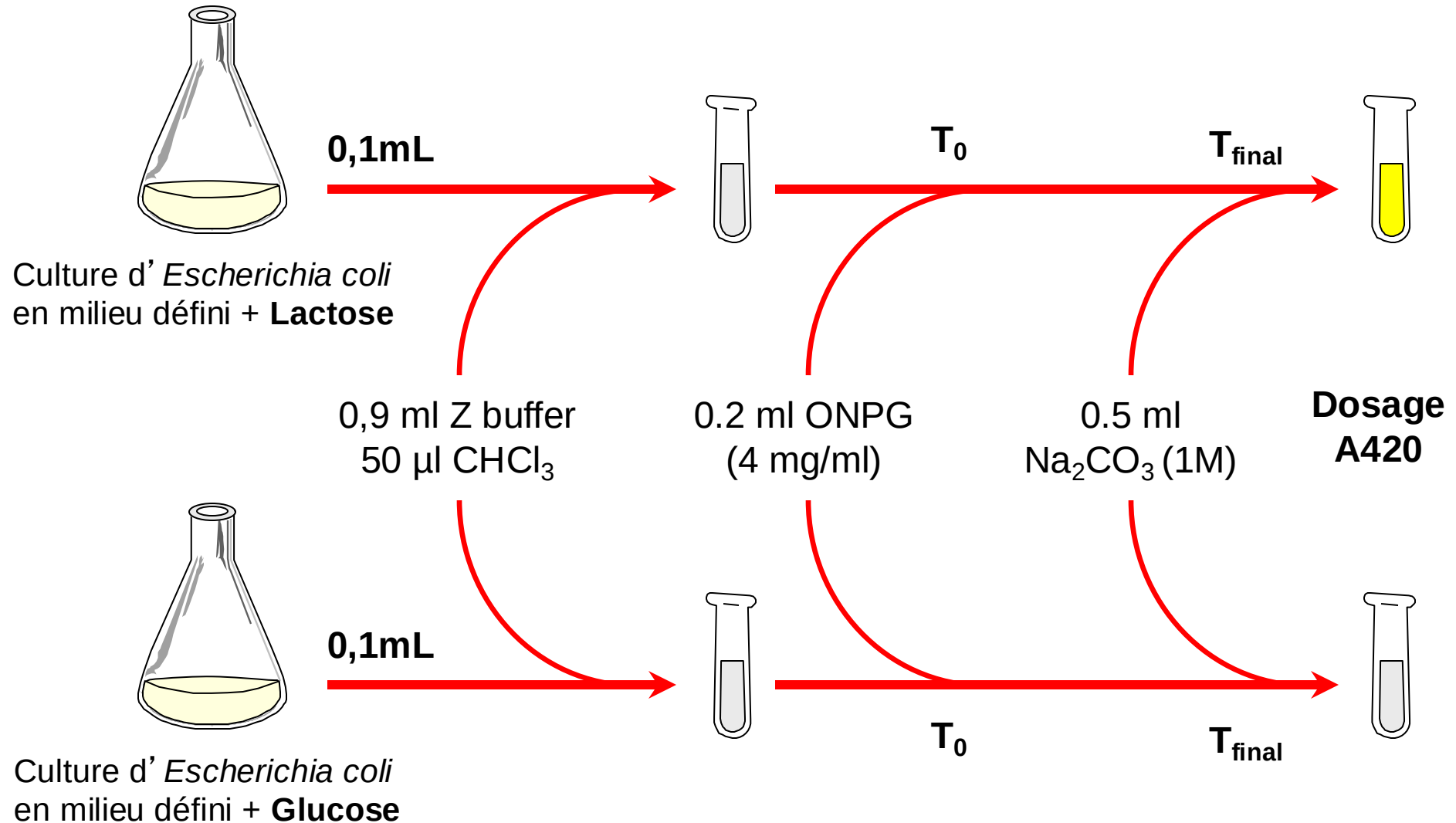
β -galactosidase et substrats artificiels



*effet mésomère sur
l'orthonitrophénolate*



dosage de l'activité β -galactosidase



Activité β -gal & activité transcriptionnelle

- En dosant l'activité β -galactosidase on peut connaître le niveau de transcription du gène *lacZ*.

$$\text{A.S.} = \frac{\text{[ONP] produit} - \text{Bruit de fond débris}}{\underbrace{\text{OD}_{600} \times V_{\text{echantillon}}}_{\text{Quantité de biomasse}}} \times \underbrace{\frac{1}{T}}_{\text{Durée du test}} \times 1000$$

$\text{A.S.} = \frac{A_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})}{\text{OD}_{600} \times V_{\text{echantillon}}} \times \frac{1}{T} \times 1000$

- L'activité β -galactosidase « rapporte » l'état induit (ou réprimé) du promoteur *P_{lac}* (en amont du gène *lacZ*)