

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**MÉCANISMES PHYSIOLOGIQUES PERMETTANT À *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA D'ACCÉDER AUX COMPOSÉS ORGANIQUES
HYDROPHOBES :
RÔLE DE L'ADHÉRENCE ET DES BIOSURFACTANTS, ET IMPLICATION
DANS LA FORMATION DE BIOFILMS**

ÉRIC DÉZIEL
DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE, ET DES MINES
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE CIVIL)

JUIN 2001

© Éric Déziel, 2001.



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-65539-3

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

**MÉCANISMES PHYSIOLOGIQUES PERMETTANT À *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA D'ACCÉDER AUX COMPOSÉS ORGANIQUES
HYDROPHOBES :
RÔLE DE L'ADHÉRENCE ET DES BIOSURFACTANTS, ET IMPLICATION
DANS LA FORMATION DE BIOFILMS**

présentée par: DÉZIEL Éric

en vue de l'obtention du diplôme de: Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de:

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., président

M. COMEAU Yves, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. VILLEMUR Richard, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

Mme PRÉVOST Michèle, Ph.D., membre

M. GREER Charles, Ph.D., membre

**Savoir s'étonner à propos est le premier
pas fait sur la route de la découverte**

-Louis Pasteur

REMERCIEMENTS

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans l'appui des deux formidables directeurs de recherche qui m'ont guidé au cours de ce projet : le Dr Richard Villemur à l'INRS-Institut Armand-Frappier et le Dr Yves Comeau à l'École Polytechnique.

Je remercie sincèrement le Dr Villemur pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci beaucoup Richard pour ta grande disponibilité, ta patience, ton intérêt et tes critiques constructives les nombreuses fois que je t'arrivais avec une de mes «idées», ton soutien constant et ta confiance, et pour la grande liberté que tu m'as consentie tout au long des cinq années que j'ai passées sous ta direction.

Ma gratitude va également au Dr Comeau pour avoir accepté de diriger mon doctorat. Merci Yves pour tes précieux conseils, pour ta curiosité, ton enthousiasme, et ton souci du détail. Merci pour les longues discussions passionnantes et pour ton implication indéfectible.

Je veux également souligner l'apport spécial du Dr François Lépine à mon projet. Merci beaucoup François pour ton intérêt dans mes travaux, ta curiosité et ton dynamisme. Bien sûr, merci à Sylvain Milot pour son travail consciencieux et son importante contribution à l'analyse des données de spectrométrie de masse.

Ma gratitude à Francine Turcotte-Rivard pour la précieuse aide technique en biologie moléculaire.

Un gros merci aux Drs. Réjean Beaudet et Pierre Juteau pour leur grande disponibilité et leur appui constant.

Je n'aurais jamais eu autant de plaisir à passer toutes ces années à l'IAF sans les nombreux étudiant(e)s et stagiaires avec lesquels j'ai partagé mes journées : merci à tous et toutes pour l'agréable atmosphère de travail et les beaux souvenirs.

Une reconnaissance particulière va à mes parents Gaston et Suzanne et ma grand-maman Françoise pour leur présence et leurs encouragements.

À Maude, la femme de ma vie: merci d'être là.

RÉSUMÉ

La pollution de l'environnement est maintenant un problème d'ampleur mondiale. Plusieurs technologies de décontamination existent mais le traitement biologique possède de nombreux avantages potentiels. La biorestauration implique l'utilisation de micro-organismes pour dégrader des substances organiques polluantes en sous-produits inoffensifs. Les technologies de biorestauration ne sont cependant pas encore largement employées. La principale raison est surtout la difficulté à en prévoir les performances et résultats. Ceci s'explique en bonne partie par le manque de compréhension du comportement des populations microbiennes dans l'environnement.

L'efficacité de la biorestauration est limitée par la faible biodisponibilité de certains contaminants hydrophobes et insolubles, tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les contaminants doivent être accessibles aux micro-organismes afin de servir de substrat et ainsi être dégradés. La biodisponibilité limite la vitesse et l'étendu de la restauration du site contaminé. Néanmoins, certains micro-organismes ont développé des adaptations physiologiques leur permettant d'accéder aux substrats hydrophobes peu biodisponibles pour d'autres micro-organismes. Le contact direct par adhérence sur le substrat et la production de biosurfactants représentent les deux mécanismes microbiens les plus souvent cités.

Cette thèse constitue la poursuite du projet de recherche amorcé lors de ma maîtrise. Les premières bactéries capables de croître en utilisant des HAP comme seule source de carbone tout en produisant des biosurfactants avaient alors été isolées. Ces souches de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent la capacité de produire des biosurfactants ainsi que de modifier l'hydrophobicité de leur surface externe lorsqu'elles utilisent autant les alcanes linéaires que les HAP comme substrat. *P. aeruginosa* est une espèce bactérienne très versatile retrouvée partout dans l'environnement. Elle est entre autres reconnue pour sa capacité à s'attacher aux surfaces et y former un biofilm. De plus, les bactéries étudiées dans le cadre de ce projet de recherche demeurent les seules ayant été rapportées

capables de produire des biosurfactants autant sur les alcanes linéaires liquides et solides que sur les HAP.

P. aeruginosa produit des glycolipides extracellulaires composés de L-rhamnose et d'acides gras 3-hydroxy. Ces substances possèdent des propriétés tensioactives, et sont donc considérées comme des surfactants, mais leur rôle physiologique chez cette bactérie reste incertain. Les rhamnolipides sont synthétisés par deux rhamnosyltransférases, la première étant codée par l'opéron *rhlAB*. RhlB est l'unité catalytique de la rhamnosyltransférase. La protéine RhlA est essentielle pour la synthèse des rhamnolipides mais sa fonction est inconnue.

L'objectif de ce projet de recherche consistait à préciser le mode d'accession utilisé par *P. aeruginosa* afin d'assimiler les hydrocarbures aliphatiques et polyaromatiques. Deux mécanismes physiologiques ont été étudiés : [1] l'hydrophobicité de la surface cellulaire et adhérence aux substrats et [2] la production de biosurfactants, en particulier les rhamnolipides. Plus spécifiquement, nos objectifs étaient de confirmer que la production de rhamnolipides facilite la croissance de cette bactérie sur les alcanes liquides et vérifier s'ils favorisent aussi l'accession aux hydrocarbures à l'état solide. De plus, nous voulions investiguer l'implication potentielle des biosurfactants dans les changements d'hydrophobicité de la surface cellulaire.

L'approche employée a consisté à générer un mutant de *P. aeruginosa* 57RP spécifiquement inactivé dans la synthèse des rhamnolipides puis comparer sa capacité de biodégradation et ses caractéristiques phénotypiques à la souche d'origine lorsque cultivé avec des hydrocarbures comme seul substrat.

La souche 57RP utilise facilement les *n*-alcanes comme source de carbone et d'énergie. Cependant, une phase de latence d'une durée variable a toujours été observée avant le début de la croissance significative sur les alcanes liquides. La fin de cette dernière

coïncidait avec l'émergence de variants phénotypiques de type S très adhérents et spécialisés dans la formation de biofilms. Ces formes phénotypiques alternatives de 57RP croissent rapidement sur les alcanes liquides sans phase de latence. La création d'une population phénotypiquement hétérogène par un mécanisme nommé «variation phénotypique» est une stratégie fréquemment employée par les bactéries pour s'adapter rapidement aux changements de conditions environnementales. Il est probable que l'émergence de ces variants soit nécessaire à la croissance de la souche 57RP sur les alcanes liquides. La période de latence dans les cultures sur alcanes liquides est donc vraisemblablement attribuable au temps nécessaire pour que les variants S, en faible proportion dans l'inoculum de départ, soient en nombre suffisant pour produire un effet significatif, puisqu'ils seraient les seuls capables de croître directement à la surface du substrat hydrophobe liquide.

Nos résultats ont démontré que la capacité de produire des rhamnolipides favorise, quoique faiblement, la croissance de *P. aeruginosa* sur les alcanes linéaires à l'état liquide. La présence de rhamnolipides dans le milieu extracellulaire ne semble toutefois pas nécessaire. Dans les conditions de culture où une différence a été observée sur les alcanes liquides, la croissance sur les substrats solides tels que les *n*-alcanes en dessous du point de fusion et les HAP n'a pas été affectée par l'incapacité de produire des biosurfactants. De plus, aucune phase de latence n'a été observée. Ceci s'explique probablement par l'observation que l'émergence de variants S n'est apparemment pas nécessaire pour la croissance sur les hydrocarbures solides. Cependant, certains résultats préliminaires obtenus avec un milieu de culture favorisant la production de rhamnolipides suggèrent que la présence de rhamnolipides dans le surnageant puisse promouvoir la croissance sur l'octadécane et le phénanthrène.

Une comparaison de la croissance sur les *n*-alcanes entre plusieurs souches de *P. aeruginosa* a démontré que certaines possèdent naturellement un phénotype particulier leur permettant d'utiliser plus rapidement ces substrats hydrophobes. Les tests ont

confirmé que, à l'image des variants S de la souche 57RP, ces souches Rapides possèdent une surface externe hydrophobe et sont particulièrement efficaces dans la formation d'un biofilm. De plus, au contraire des souches Lentes, elles ne présentent pas de phase de latence et ne nécessitent pas l'émergence de variants S. Les résultats indiquent que la croissance de *P. aeruginosa* sur les alcanes linéaires liquides nécessite l'aptitude à former un biofilm. De plus, la croissance légèrement ralentie du mutant *rhlA* suggère que les rhamnolipides jouent un rôle dans ce processus.

Une nouvelle classe de biosurfactant en plus des rhamnolipides a été trouvée chez *P. aeruginosa*. Nous avons établi que, contrairement à ce qui est accepté dans la littérature, la protéine RhlA n'est pas une sous-unité de la rhamnosyltransférase I mais plutôt une enzyme directement impliquée dans la synthèse des dimères lipidiques précurseurs des rhamnolipides. Nous avons aussi découvert que cette mixture de dimère lipidique n'est pas entièrement utilisée pour la synthèse des rhamnolipides et qu'une partie est excrétée par la bactérie. Or ces lipides démontrent des propriétés tensioactives. Afin de souligner son rôle comme agent mouillant nécessaire pour le «swarming» chez *P. aeruginosa*, ce nouveau biosurfactant a été nommé «aeruwettine». En effet, nous avons découvert que l'expression du gène *rhlA*, probablement via la production d'aeruwettine, est nécessaire pour coloniser rapidement la surface d'une gélose grâce la motilité du type «swarming». L'étude de mutants *rhlA* et *rhlB* a démontré que l'aeruwettine est essentielle pour le «swarming», mais pas la production de rhamnolipides.

Puisque le mutant *rhlA* manifestait une tendance beaucoup plus prononcée à l'agrégation cellulaire que la souche d'origine, nous avons proposé que les rhamnolipides et/ou l'aeruwettine puissent jouer un rôle dans le détachement et la dispersion des cellules associées à un biofilm. Tout comme le «swarming», la formation d'un biofilm est un processus complexe nécessitant une action concertée et coordonnée d'une population microbienne. La phase de dissémination est l'étape la moins bien caractérisée dans le développement des biofilms. Le processus de développement d'un biofilm par les

mutants *rhlA* et *rhlB* était effectivement différent de la souche d'origine, ce qui appuie l'hypothèse que les biosurfactants soient impliqués dans l'interaction des cellules avec les surfaces et interfaces.

Nous concluons que *P. aeruginosa* ne produit pas les rhamnolipides et l'aeruwettine dans le but précis de faciliter l'assimilation des substrats hydrophobes. Ces biosurfactants apparaissent plutôt impliqués dans l'interaction de la bactérie avec les surfaces, probablement comme médiateurs du détachement et/ou de la dispersion des cellules associées à une surface sous forme d'un biofilm.

La présence indispensable des variants S, et l'avantage des souches naturellement adhérentes («Rapides»), ont fait ressortir la nécessité pour les bactéries de s'attacher pour croître sur les alcanes liquides quand le substrat n'a pas été préalablement émulsionné ou solubilisé. La capacité des micro-organismes à adhérer aux surfaces semble le mécanisme le plus important permettant la croissance sur les substrats hydrophobes. De plus, il est très probable que les molécules amphiphiles (surfactants) produites par les micro-organismes interviennent dans ce processus.

ABSTRACT

Pollution of the environment is now a world-wide concern. Several decontamination technologies exist but biological processes offer many potential benefits. Bioremediation involves the use of microorganisms to degrade polluting organic substances into innocuous by-products. Unfortunately, bioremediation processes are not regularly utilised yet. The principal reason appears to be the difficulty of predicting their performances and end-results. This is largely explained by the lack of understanding of the behavior of microbial populations in the environment.

The effectiveness of bioremediation is often limited by the weak bioavailability of some hydrophobic and insoluble contaminants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The contaminants must be accessible to the microorganisms in order to be used as substrates and hence be degraded. Bioavailability limits the rate and extent of remediation of contaminated sites. Nevertheless, some microorganisms have developed specific physiological adaptations allowing them to access hydrophobic substrates that are poorly bioavailable to other microorganisms. Direct contact by adherence to the hydrophobic compound and production of biosurfactants represent the two most often quoted microbial mechanisms.

This thesis represents the continuation of the research project I started during my Master's degree. The first bacteria able to grow by using PAHs as the only source of carbon while producing biosurfactants was then isolated. These *Pseudomonas aeruginosa* strains have the capacity to produce biosurfactants and to modify the hydrophobicity of their external surface when they use linear alkanes or PAHs as substrate. *P. aeruginosa* is a very versatile bacterial species found everywhere in the environment. Among other features, it is recognized for its ability to attach to most surfaces and form a biofilm. Moreover, the bacteria studied in this research project remain the only ones having been reported being able to produce biosurfactants both on solid or liquid linear alkanes and on PAHs.

P. aeruginosa produces extracellular glycolipides made up of L-rhamnose and 3-hydroxyfatty acids. These substances have surface-active properties, and are thus regarded as surfactants, but their physiological role remains in fact ambiguous. The synthesis of rhamnolipids is catalysed by two rhamnosyltransferases, the first one being coded by the *rhlAB* operon. RhlB is the catalytic unit of the rhamnosyltransferase. The RhlA protein is essential for the synthesis of rhamnolipids but its function is unknown.

The aim of this research project consisted in specifying the accession mode used by *P. aeruginosa* to assimilate aliphatic and polyaromatic hydrocarbons. Two physiological mechanisms were studied: [1] the hydrophobicity of the cellular surface and the adherence to substrates and [2] the production of biosurfactants, especially rhamnolipids. Particularly, our objectives were to confirm that production of rhamnolipids promotes growth of this bacterium on liquid alkanes and examine if it supports also the uptake of solid-state hydrocarbons. Moreover, we wanted to investigate the potential involvement of biosurfactants in the variations of hydrophobicity of the cellular surface.

The strategy used consisted in generating a mutant of *P. aeruginosa* 57RP specifically inactivated in its ability to synthesise rhamnolipids and then compare its phenotypic characteristics (i.e. rates of growth and biodegradation) to the wild-type strain when cultivated with hydrocarbons as only substrate.

Strain 57RP easily uses N-alkanes as sole source of carbon and energy. However, a lag phase of variable length was always observed before the onset of significant growth on liquid alkanes. The end of the lag corresponded with the appearance of very adherent phenotypic variants of the bacteria specialized in the formation of biofilms (S form). These alternative phenotypic forms of 57RP grew rapidly on liquid alkanes without lag phase. Creation of a phenotypically heterogeneous population by a mechanism named «phase variation» is a strategy frequently used by bacteria to quickly adapt and survive to

changes in environmental conditions. It is likely that the emergence of these variants is necessary to the growth of strain 57RP on liquid alkanes. The lag phase observed in cultures on liquid alkanes is thus probably ascribable to the time required so that the proportion of S variants, presumably small in the starting inoculum, becomes high enough to generate a notable effect, since they are the only ones able to grow directly on the surface of liquid hydrophobic substrates.

Our results showed that the capacity to produce rhamnolipids indeed supports, though slightly, growth of *P. aeruginosa* on liquid linear alkanes. However, the presence of rhamnolipids in the extracellular milieu does not seem a requirement. Under the growth conditions where a difference was observed on liquid alkanes, growth on solid substrates such as N-alkanes below the melting point and PAHs was not affected by the inability to produce biosurfactants. Moreover, no lag phase was observed. This is probably explained by the observation that emergence of S variants is not necessary for the growth on solid hydrocarbons. However, some preliminary results obtained with a culture medium supporting the production of rhamnolipids suggest that the presence of rhamnolipids in the supernatant can promote growth on octadecane and phenanthrene.

A comparison of the growth on N-alkanes between several strains of *P. aeruginosa* showed that some display a particular phenotype allowing them to utilise these hydrophobic substrates more quickly. The tests confirmed that, similar to the S variants of strain 57RP, these «Rapid» strains have an hydrophobic external surface and are especially effective in the formation of biofilms. Moreover, in contrast with the «Slow» strains, they do not show a lag phase and require the appearance of S variants. Our results indicate that growth of *P. aeruginosa* on liquid linear alkanes requires the ability to form a biofilm. Moreover, the slightly slowed down growth of the *rhlA* mutant suggests that rhamnolipids play a role in this process.

A new class of biosurfactant different from rhamnolipids was found in *P. aeruginosa*. We established that, in contrast to what is accepted in the literature, the RhlA protein is not a subunit of the rhamnosyltransferase I but rather an enzyme directly involved in synthesis of the lipidic dimers precursors of rhamnolipids. We have also discovered that this lipidic dimer mixture is not entirely used in the synthesis of rhamnolipids but a that portion is excreted by the bacterium. Interestingly, these extracellular lipids display surface-active properties. In order to emphasise its role as wetting agent required for swarming motility of *P. aeruginosa*, this new biosurfactant was named «aeruwettine». Indeed, we have found that the expression of the *rhlA* gene, probably via the production of aeruwettine, is necessary to quickly colonize the surface of an agar plate by the type of motility designed «swarming». Study of *rhlA* and *rhlB* mutants showed that aeruwettine is essential for «swarming», but not production of rhamnolipids.

Since the *rhlA* mutant showed a remarkable tendency to cellular aggregation, we proposed that the rhamnolipids and/or aeruwettine can play a role in the detachment and the dispersion of cells associated with a biofilm. Just like «swarming», formation of a biofilm is a complex process requiring a cooperative and coordinate action from a microbial population. The dissemination step is the less well characterized in the development of biofilms. The process of biofilm development by the *rhlA* and *rhlB* mutants was indeed different from the wild-type strain, supporting the hypothesis that biosurfactants are involved in the interaction of cells with surfaces and interfaces.

We conclude that *P. aeruginosa* does not produce the rhamnolipids and aeruwettine strictly to facilitate the assimilation of hydrophobic substrates. Rather, these biosurfactants appear implicated in the interaction of the bacterium with surfaces, probably as mediators of the detachment and/or the dispersion of the cells associated with a surface as a biofilm.

The indispensable presence of S variants, and the superiority of the naturally adherent strains («Rapids»), highlight the need of attachment for the bacteria to grow on liquid alkanes when the substrate is not already emulsified or solubilized. The capacity of the microorganisms to adhere to surfaces seems the most significant mechanism allowing growth on hydrophobic substrates. Moreover, it is very likely that the amphiphilic molecules (surfactants) produced by the bacteria intervene in this process.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	V
RÉSUMÉ	VII
ABSTRACT.....	XII
TABLE DES MATIÈRES.....	XVII
LISTE DES TABLEAUX.....	XXIV
LISTE DES FIGURES	XXV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XXVIII
LISTE DES ANNEXES.....	XXIX
CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1. Mise en contexte et problématique.....	1
1.2. Objectifs	2
1.2.1. Objectif général	3
1.2.2. Objectifs spécifiques	3
1.3. Organisation de la thèse.....	4
CHAPITRE 2. REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
2.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	5
2.1.1. Sources	5
2.1.2. Structures.....	5
2.1.3. Caractéristiques	5
2.2. Hydrocarbures aliphatiques linéaires.....	6
2.2.1. Sources, structures et caractéristiques.....	6
2.3. Restauration des sites contaminés	8
2.3.1. Technologies physico-chimiques et thermiques	8
2.3.2. Technologies biologiques.....	8
2.3.2.1. Méthodes de bio-traitement	9
<u>2.3.2.1.1. In situ</u>	9
<u>2.3.2.1.2. Ex situ</u>	9
<u>2.3.2.1.3. En bioréacteurs</u>	10

2.4. Paramètres importants dans la biorestauration des sites contaminés aux hydrocarbures	10
2.4.1. Premier facteur: Présence de micro-organismes adaptés	11
2.4.1.1. Mécanismes enzymatiques et voies métaboliques.....	12
2.4.1.2. Génétique	14
2.4.2. Deuxième facteur: Conditions environnementales favorables.....	15
2.4.3. Troisième facteur: Biodisponibilité du substrat	15
2.5. Biodisponibilité	16
2.5.1. Hydro-solubilité et vitesse de dissolution	17
2.5.2. Sorption et vitesse de désorption.....	19
2.5.3. Moyens physico-chimiques pour augmenter la biodisponibilité	20
2.5.3.1. Surfactants	20
2.5.3.2. Systèmes à deux phases liquides	22
2.6. Mécanismes physiologiques microbiens d'accès aux substrats hydrophobes	23
2.6.1. Assimilation par contact direct.....	26
2.6.1.1. Hydrophobicité et adhérence	26
2.6.1.2. Développement des biofilms	27
2.6.1.2.1. Communication intercellulaire et «quorum-sensing».....	31
2.6.1.2.2. Les systèmes de signalisation intercellulaires de <i>P. aeruginosa</i>	32
2.6.2. Biosurfactants.....	35
2.6.2.1. Rhamnolipides	35
2.6.2.2. Biosurfactants et biodégradation	36
2.6.2.3. Les biosurfactants sont-ils impliqués dans la biodégradation des molécules organiques hydrophobes ?	38
2.6.3. Lien potentiel entre adhérence et biosurfactants.....	40
2.6.4. Autres mécanismes proposés	42
2.6.4.1. Transport actif.....	42
2.6.4.2. Chimiotactisme	43

2.7. Conclusion	43
CHAPITRE 3. BIOFILMS BACTÉRIENS	45
3.1. Mise en contexte de l'article #1	45
3.2. Article #1 : Initiation of biofilm formation by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities	46
3.2.1. Abstract	47
3.2.2. Introduction	48
3.2.3. Materials and methods	50
3.2.3.1. Bacterial strains and culture media.	50
3.2.3.2. Evaluation of cell-surface hydrophobicity and cell adherence.	50
3.2.3.3. Motility and chemotaxis assays.	51
3.2.3.4. Biofilm formation assay with polystyrene culture tubes.	52
3.2.3.5. Sensitivity to oxidative stress.	52
3.2.3.6. Production of exoproducts.	52
3.2.3.7. Electron microscopy.	54
3.2.4. Results	54
3.2.4.1. Emergence of phenotypic variants of <i>P. aeruginosa</i> 57RP correlates with biofilm formation.	54
3.2.4.2. S variants can revert to the parent L variant phenotype.	57
3.2.4.3. S variants demonstrate increased cell-surface hydrophobicity and adhesivity.	58
3.2.4.4. S variants are deficient in swimming, swarming and twitching motilities.	59
3.2.4.5. Flagellar chemotactic response is impaired in the S variants.	62
3.2.4.6. Electron microscopy.	63
3.2.4.7. Expression of various virulence/survival factors is altered in the S variants.	64

3.2.5. Discussion	67
3.2.5.1. Colonial phenotypes and type IV pili.	67
3.2.5.2. Motility and chemotaxis.	67
3.2.5.3. Phase variation.	71
3.2.5.4. S1 is different from S2.	72
3.2.5.5. Biofilm phenotype.	74
3.2.6. Acknowledgements	75
3.3. Résultats supplémentaires	76
3.3.1. Est-ce que les variants phénotypiques S sont des mutants rugueux («rough») ?	76
3.3.2. Est-ce que les variants phénotypiques sont des mutants «mucoïdes» ?	78
3.3.3. Effets de la température d'incubation sur le phénotype	80
CHAPITRE 4. MÉCANISMES MICROBIENS IMPLIQUÉS DANS LA	
 BIODÉGRADATION.....	82
4.1. Introduction	82
4.2. Matériel et méthodes	82
4.2.1. Souches microbiennes.....	83
4.2.2. Cultures	83
4.2.3. Construction d'un mutant non-producteur de rhamnolipides.	84
4.2.4. Évaluation de la biomasse bactérienne par mesure des protéines totales.	85
4.2.5. Procédure de séparation des cellules attachées aux hydrocarbures	85
4.2.6. Suivi de la dégradation par minéralisation d'un substrat radioactif.....	86
4.2.7. Détection et dosage des rhamnolipides	86
4.3. Résultats et Discussion	87
4.3.1. Contribution des biosurfactants à la biodégradation des hydrocarbures aliphatiques et polyaromatiques.....	87
4.3.1.1. Alcanes linéaires liquides ou solides	87
4.3.1.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	97

4.3.2. Différences entre les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente	102
4.3.2.1. Aptitude des souches Rapides et Lentes à former un biofilm.....	104
4.4. Conclusion.....	105
CHAPITRE 5. BIOSURFACTANTS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	108
5.1. Mise en contexte.....	108
5.2. Article #2 : The <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>rhlA</i> gene is involved in synthesis of the 3-hydroxyacyl-3-hydroxyacid moiety of rhamnolipids	110
5.2.1. Abstract	111
5.2.2. Introduction	111
5.2.3. Materials and methods	115
5.2.3.1. Bacteria and culture media	115
5.2.3.2. Chemical analysis	115
5.2.3.3. PHA determination	116
5.2.4. Results and discussion.....	116
5.2.4.1. <i>rhlA</i> mutants do not produce rhamnolipids or HAHAs	116
5.2.4.2. The <i>rhlB</i> mutant produces HAHAs	118
5.2.4.3. Extracellular accumulation of HAHAs is delayed compared to rhamnolipids	119
5.2.4.4. The <i>rhlB</i> mutant accumulates more PHAs	121
5.2.4.5. Putative function of <i>rhlA</i> in rhamnolipid synthesis	121
5.2.5. Acknowledgments.....	123
5.3. Article #3 : The <i>rhlA</i> gene is required for the production of a novel biosurfactant involved in swarming motility and biofilm development of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	124
5.3.1. Summary	125
5.3.2. Introduction	126
5.3.3. Methods.....	129
5.3.3.1. Bacterial strains, plasmids and culture media.....	129

5.3.3.2. Biosurfactant production and analysis.....	131
5.3.3.3. Electron microscopy.....	131
5.3.3.4. Biofilm formation assay in polystyrene culture tubes.....	131
5.3.3.5. Biofilm formation in flow cell chamber.....	132
5.3.4. Results.....	133
5.3.4.1. Swarming requires <i>rhlA</i> expression.....	133
5.3.4.2. Involvement of <i>rhlA</i> in the production of a novel biosurfactant.....	135
5.3.4.3. Requirements for swarming.....	137
5.3.4.4. <i>rhlAB</i> plays a role in biofilm maturation.....	138
5.3.5. Discussion.....	141
5.3.5.1. Biosurfactant production, swarming motility and biofilm maturation may be related phenomena.....	142
5.3.5.2. Biosurfactant production and differentiation into swarming cells are not separate events.....	143
5.3.5.3. The nutritional status regulates swarming.....	144
5.3.6. Conclusion.....	145
5.3.7. Acknowledgements.....	146
CHAPITRE 6. BIORÉACTEURS À DEUX PHASES LIQUIDES.....	147
6.1. Mise en contexte.....	147
6.2. Article #4 : Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds	148
6.2.1. Abstract.....	149
6.2.2. Introduction.....	150
6.2.3. Microbial mechanisms involved in TLPBs.....	152
6.2.4. Use of TLPBs to enhance biodegradation of toxic/poorly bioavailable compounds.....	157
6.2.4.1. Rationale.....	157
6.2.4.2. TLPBs for the enhancement of mass-transfer of compounds with limited bioavailability.....	160

6.2.4.3. TLPBs for the controlled delivery of apolar toxic compounds	161
6.2.4.4. TLPBs for the enrichment of xenobiotic-degrading microorganisms	162
6.2.5. Design of TLPBs for biodegradation purposes	163
6.2.5.1. Selection of an appropriate NAPL	163
6.2.5.2. Determination of optimal operation parameters	167
6.2.6. Application of TLPBs as a biotreatment process	171
6.2.7. Conclusion.....	173
CHAPITRE 7. SYNTHÈSE	175
7.1. Discussion générale	175
7.2. Modèle conceptuel de la fonction des rhamnolipides dans l'assimilation des hydrocarbures	177
7.2.1. Hydrocarbures liquides	177
7.2.1.1. Est-ce que la production des rhamnolipides entraîne la libération de LPS ?	186
7.2.2. Hydrocarbures solides	187
7.3. Implications pratiques.....	188
CHAPITRE 8. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	190
8.1. Conclusion	190
8.2. Recommandations et perspective	191
RÉFÉRENCES.....	193
ANNEXES	246

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1. Comparison of production of extracellular products and sensitivity to oxidative stress between the L and S variants.	66
Tableau 3.2. Comparison of phenotypic characteristics between the L and S variants ^d	73
Tableau 5.1. Concentration of HAHA, mono- and di-rhamnolipids in PG201 and UO287 culture supernatants after 169 h of incubation	117
Tableau 5.2. Bacterial strains and plasmids.....	130
Tableau 5.3 Properties of studied <i>P. aeruginosa</i> strains and biosurfactant mutants.	136
Tableau 5.4. Quantification of biosurfactant (rhamnolipids and aeruwettin) production by liquid chromatography/mass spectrometry.....	137
Tableau 5.5. Ratios between the number of 57RP-gfp (GFP-tagged wild-type 57RP) and 57RP-98 (<i>rhlA</i> ⁻) cells in a 8 days-old biofilm formed in a continuous flow chamber.....	141
Tableau 6.1. TLPBs in which the biodegradation of environmentally relevant compounds has been observed.....	158

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Point de fusion et solubilité des alcanes linéaires.	7
Figure 2.2 Logarithme du coefficient de partition octanol/eau indiquant l'hydrophobicité des alcanes linéaires.	7
Figure 2.3 Étapes du développement d'un biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	30
Figure 2.4 Communication intercellulaire chez les bactéries Gram négatif.	32
Figure 2.5 Le circuit de signalisation inter-cellulaire de <i>P. aeruginosa</i>	34
Figure 3.1 Visual differences between growth phenotypes.	56
Figure 3.2 Kinetics of biofilm formation.	57
Figure 3.3 Evaluation of the cell surface hydrophobicity and adhesion potential of L and S1 variants.	58
Figure 3.4 Differences in motility phenotype of the L and S variants.	62
Figure 3.5 Comparison of the chemotactic responses of the L and S variants.	63
Figure 3.6 Transmission electron micrographs of the L (A) and S2 (B) variants.	64
Figure 3.7 Comparaison de la sensibilité des variants L et S de la souche 57RP à différents antibiotiques hydrophobes.	78
Figure 4.1 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane.	88
Figure 4.2 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane	89
Figure 4.3 Minéralisation de l'hexadécane par les souches 57RP et 57RP-98 en cultures liquides.	90
Figure 4.4 Minéralisation de l'hexadécane par les variants S1 des souches 57RP et 57RP-98 en cultures liquides.	91
Figure 4.5 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'écicosane liquide.	92
Figure 4.6 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'écicosane solide.	93

Figure 4.7 Minéralisation de l'octadécane solide par les souches 57RP et 57RP-98 en cultures liquides.	94
Figure 4.8 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane.	95
Figure 4.9 Comparaison de la croissance et de la production de rhamnolipides entre 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'octadécane solide.	96
Figure 4.10 Minéralisation de l'octadécane solide par les souches 57RP et 57RP-98 en cultures liquides.	97
Figure 4.11 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec le naphthalène.	98
Figure 4.12 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec le naphthalène.	99
Figure 4.13 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec le phénanthrène.	100
Figure 4.14 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec le phénanthrène.	102
Figure 4.15 Comparaison de la croissance de quelques souches de <i>P. aeruginosa</i> en cultures liquides avec l'écicosane solide.	103
Figure 4.16 Évaluation de l'hydrophobicité de la surface externe de quelques souches de <i>P. aeruginosa</i> par le test MATH.	104
Figure 4.17 Cinétique de formation d'un biofilm sur le polystyrène par quelques souches de <i>P. aeruginosa</i>	105
Figure 5.1 Modifications to the rhamnolipids biosynthetic pathway proposed by Campos-Garcia <i>et al.</i> (1998).	114
Figure 5.2 Production of rhamnolipids and HAHAs by <i>P. aeruginosa</i> 57RP(pECP60) following <i>rhlA</i> expression.	120
Figure 5.3 Wild-type <i>P. aeruginosa</i> strain 57RP containing a <i>rhlA'</i> - <i>lacZ</i> translational fusion was grown on MSM swarm agar supplemented with X-gal...	134
Figure 5.4 Swarm plate incubated for 24h at 30°C.	135

Figure 5.5 Representations of typical (a) rhamnolipid (L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate) and (b) aeruwettin (3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoic acid) isomers.	137
Figure 5.6 Comparison of biofilm formation.....	139
Figure 5.7 Horizontal section obtained by confocal microscopy of a biofilm showing 57RP-gfp cells (wild-type 57RP expressing GFP) and 57RP-98 cells (<i>rhlA</i> ⁻).	140
Figure 6.1 Physico-chemical and biological mechanisms implicated in TLPBs.....	153
Figure 7.1 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane.	179
Figure 7.2 Comparaison de la croissance de PG201, UO299 et UO287 en cultures liquides avec l'huile d'olive.....	180
Figure 7.3 Comparaison des taux maximaux de minéralisation de l'hexadécane par 57RP et 57RP-98 en système à deux phases liquides.	181
Figure 7.4 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane.	182
Figure 7.5 Croissance (DO), production de rhamnolipides (RL) et suivi de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (MATH) de 57RP et 57RP-98.....	184
Figure 7.6 Modèle proposé décrivant la croissance de <i>P. aeruginosa</i> sur un alcane linéaire liquide.	185
Figure 7.7 Minéralisation de l'hexadécane par les souches 57RP et 57RP-98 dans un «slurry».	186

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BH : milieu de sels minéraux Bushnell-Haas.

CMC : Concentration micellaire critique, propriété des surfactants

DCT : «Drop-collapsing test», utilisé pour détecter la présence de biosurfactants

DO : Densité optique, unité du suivi de la croissance cellulaire par spectrophotométrie

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

LPS : Lipopolysaccharides

MATH : "Microbial Adhesion To Hydrocarbons", test utilisé pour évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire d'une population microbienne

SW1/10F: milieu de sels minéraux Siegmund-Wagner supplémenté avec 1,0 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

57RP : *Pseudomonas aeruginosa* 57RP, la principale souche bactérienne étudiée

57RP-98 : le mutant 98 de la souche 57RP; le gène *rhlA* de cette souche est inactivé, ce qui rend ce mutant incapable de produire des biosurfactants de la classe des rhamnolipides.

LISTE DES ANNEXES

Annexe I.	Autres articles publiés ou soumis pour publication.....	246
Annexe II.	Sommaire du mémoire de maîtrise.....	252

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. MISE EN CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE

La production et l'utilisation de composés chimiques organiques n'ont cessée de croître depuis le début de l'ère industrielle. La contamination de l'environnement est maintenant un problème d'ampleur mondiale. De nombreuses molécules d'origine humaine s'accumulent dans la nature parce que leurs taux de rejets sont plus élevés que leurs taux d'atténuation naturelle, en particulier par la dégradation microbienne. Deux principaux facteurs limitent les taux de biodégradation : [1] le potentiel catabolique, c.-à-d. qu'un polluant ressemblant à une molécule naturellement trouvée dans l'environnement sera plus facilement attaqué par les micro-organismes, et [2] la biodisponibilité du polluant, ou d'autres facteurs de croissance essentiels, aux micro-organismes dégradeurs.

Plusieurs technologies de décontamination existent mais le traitement biologique possède de nombreux avantages potentiels, tels un coût d'application moindre et le respect de l'environnement. Les technologies de biorestauration ne sont cependant pas encore largement employées. La principale raison est surtout la difficulté à prévoir les performances et résultats des biotraitements. Ceci s'explique par le manque de compréhension du comportement des populations microbiennes dans l'environnement et des interactions contaminants $\leftrightarrow$ matrices (sol) $\leftrightarrow$ micro-organismes. Ainsi, depuis quelques années, la recherche vise de plus en plus l'étude des facteurs limitant la biodégradation des polluants en conditions naturels, en plus de la simple présence de micro-organismes possédant le potentiel catabolique requis (Head, 1998).

L'efficacité de la biorestauration est limitée par la faible biodisponibilité de certains contaminants hydrophobes et insolubles, tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). En effet, ces polluants ont tendance à s'adsorber fortement à la matière organique des sols et sédiments et sont par conséquent moins accessibles à l'attaque microbienne. Puisque seules les molécules dissoutes dans la phase aqueuse sont

considérées biodisponibles, l'essentiel des recherches visant l'augmentation de la biodégradation des HAP ont porté sur les méthodes d'extraction et de solubilisation.

Le cas des alcanes linéaires est radicalement différent. En effet, il a été maintes fois démontré que les taux de biodégradation de ces hydrocarbures, beaucoup plus insolubles et hydrophobes que les HAP, sont plus élevés que leurs taux de dissolution dans la phase aqueuse. Les micro-organismes utilisant les alcanes linéaires ont développé des adaptations physiologiques leur permettant d'accéder à cette source de carbone trop peu soluble pour être disponible sous forme dissoute. Deux mécanismes microbiens sont considérés: [1] solubiliser le substrat insoluble par la production de biosurfactants et [2] adhérer et assimiler directement le substrat insoluble au point de contact en rendant la surface cellulaire hydrophobe. La possibilité que ces mécanismes puissent aussi favoriser la croissance sur les HAP constitue l'hypothèse initiale de ce projet de doctorat.

Cette thèse constitue la poursuite du projet de recherche amorcé lors de ma maîtrise (voir résumé à l'annexe II). Les premières bactéries capables de croître en utilisant des HAP comme seule source de carbone tout en produisant des biosurfactants avaient alors été isolées (Déziel *et al.*, 1996). Ces souches de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent la capacité de produire des biosurfactants ainsi que de modifier l'hydrophobicité de leur surface externe lorsqu'elles utilisent autant les alcanes linéaires que les HAP comme substrat. L'approche employée au cours de ce projet de recherche a consisté à générer un mutant non-producteur de biosurfactants puis comparer sa capacité de biodégradation et ses caractéristiques phénotypiques lorsque cultivé avec des hydrocarbures comme seul substrat.

1.2. OBJECTIFS

La littérature scientifique récente, en conjonction avec certains de mes résultats, suggère que des caractéristiques physiologiques, en plus du potentiel enzymatique de dégradation, gouvernent l'utilisation des hydrocarbures par les bactéries. En plus de la production de

biosurfactants, la recherche proposée consistera à étudier la présence et l'importance de mécanismes complémentaires permettant aux micro-organismes d'accéder aux contaminants dans l'environnement.

1.2.1. Objectif général

Mieux connaître les mécanismes physiologiques microbiens jouant un rôle dans l'accessibilité aux substrats hydrophobes tels les hydrocarbures aliphatiques et polyaromatiques. Ceci dans le but de mieux comprendre les interactions entre micro-organismes et contaminants peu biodisponibles, et ainsi d'améliorer les technologies de biorestauration.

1.2.2. Objectifs spécifiques

- Établir l'importance de la production (synthèse et excrétion) de surfactants microbiens pour l'accessibilité aux hydrocarbures, et leur biodégradation.
- Déterminer l'effet des variations de l'hydrophobicité de la surface cellulaire et de la capacité d'adhérence sur l'accessibilité et la biodégradation des hydrocarbures. Explorer le lien éventuel entre la production de biosurfactants et la capacité d'adhérence.

L'aspect original du projet consiste à mieux comprendre le rôle et l'impact des micro-organismes impliqués dans les biotraitements sur la biodisponibilité des contaminants résistants à la dégradation. Les résultats escomptés permettront de mieux comprendre les éléments de la physiologie microbienne pouvant influencer l'efficacité des procédés de biorestauration existant, pour éventuellement faciliter le développement de nouvelles avenues.

1.3. ORGANISATION DE LA THÈSE

La présente thèse est constituée d'une revue de la littérature, de quatre articles soumis ou publiés (incluant un article de synthèse bibliographique), d'un chapitre contenant les travaux non inclus dans les articles et d'un chapitre-synthèse. Les résumés d'autres articles ayant été co-écrits durant ce doctorat sont insérés à l'Annexe I.

CHAPITRE 2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

2.1.1. Sources

Les HAP proviennent de la combustion incomplète de combustibles d'origine fossile (pétrole, houille, goudron). La transformation de la houille, l'entreposage de déchets de raffineries, déversements de pétroliers, effluents d'industries pétrochimiques, gaz d'échappement de véhicules motorisés, aliments fumés, frits ou grillés, fumée de tabac, feux de forêts et de prairies, incinération de déchets, etc. illustrent la diversité des sources naturelles et anthropogènes (Bouchez *et al.*, 1996; Cerniglia, 1992). Le traitement du bois à la créosote, lequel est constitué d'environ 85% de HAP (Mueller *et al.*, 1989), représente une source particulièrement importante puisque la consommation annuelle s'établit à plusieurs centaines de milliers de tonnes métriques aux États-Unis seulement. Conséquemment, dans les pays, tel le Canada, où cette activité industrielle a lieu, se retrouvent des concentrations très élevées de HAP.

2.1.2. Structures

Les HAP sont des molécules formés de deux cycles benzéniques et plus. Les hydrocarbures naphténoaromatiques (polyaromatiques possédant un cycle à cinq carbones) leur sont habituellement associés. Parfois, les composés polyaromatiques portant des groupements nitro ou alkyl, ou bien substitués par des atomes de soufre, d'azote ou d'oxygène (hétérocycliques) sont souvent classés dans le même groupe.

2.1.3. Caractéristiques

L'exposition quotidienne aux HAP que subissent les gens vivant dans des régions fortement industrialisées représente un risque important pour la santé (Dipple *et al.*, 1989). Les HAP se retrouvent sur la liste des polluants d'importance prioritaire de l'Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis (Keith et Telliard, 1979)

puisque le potentiel cancérigène de plusieurs est reconnu : le benz[*a*]anthracène, le benzo[*b*]fluoranthène, le benzo[*a*]pyrène, le chrysène et le dibenzo[*a,f*]fluoranthène (Madsen *et al.*, 1991).

Les HAP sont des composés hydrophobes très peu solubles dans l'eau. Leur lipophilicité, toxicité et persistance dans l'environnement augmentent parallèlement à leur poids moléculaire (Cerniglia, 1992). Une propriété importante des HAP est leur caractère génotoxique et cancérigène. Ils ne sont pas mutagènes en eux-mêmes mais le deviennent chez l'organisme qui les a absorbés, par la suite d'une oxydation enzymatique par une monooxygénase, le cytochrome P-450, présent surtout dans le foie. Le rôle physiologique du cytochrome P-450 est la détoxification des produits xénobiotiques ingérés qui sont convertis en dérivés éliminables. Dans le cas des HAP, le P-450 effectue des réactions d'époxydation. Les époxydes sont des molécules réactives entraînant des modifications du matériel génétique, à l'abse du processus de cancérogenèse (Cerniglia, 1984; White, 1986).

2.2. HYDROCARBURES ALIPHATIQUES LINÉAIRES

2.2.1. Sources, structures et caractéristiques

Les paraffines, ou *n*-alcane, sont des hydrocarbures saturés linéaires essentiellement retrouvés dans le pétrole et les sous-produits pétroliers. Leur solubilité dans l'eau, qui diminue avec l'accroissement du poids moléculaire (Fig. 2.1) comme les HAP, est cependant considérablement plus faible que celle des HAP. Par exemple le pyrène, un HAP contenant 16 carbones formant quatre cycles aromatiques à une solubilité d'environ 0,135 mg/L, alors que l'hexadécane ($C_{16}H_{34}$) à une solubilité de 20 ng/L (soit près de 7000 fois moins). De plus, comme indiqué par leurs coefficients de partition octanol-eau ou ($\log K_{ow}$), les *n*-alcane sont beaucoup plus hydrophobes que les HAP (ex. $\log K_{ow}$ du pyrène = 4,88) (Fig. 2.2). À la température de la pièce, l'hexadécane est liquide mais l'octadécane est solide (Fig. 2.1).

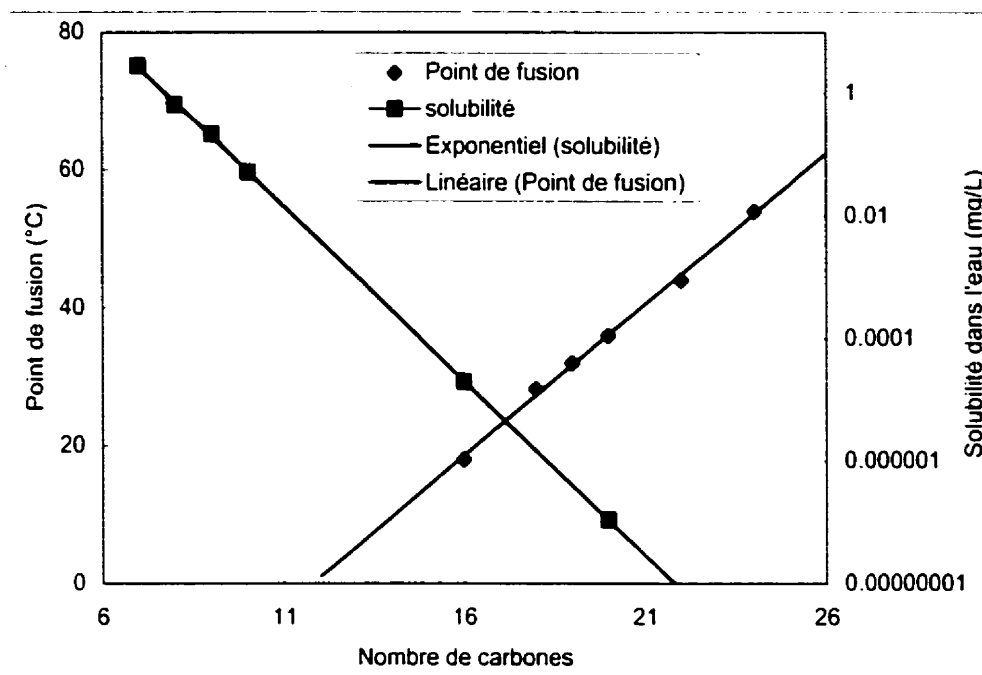


Figure 2.1 Point de fusion et solubilité des alcanes linéaires.

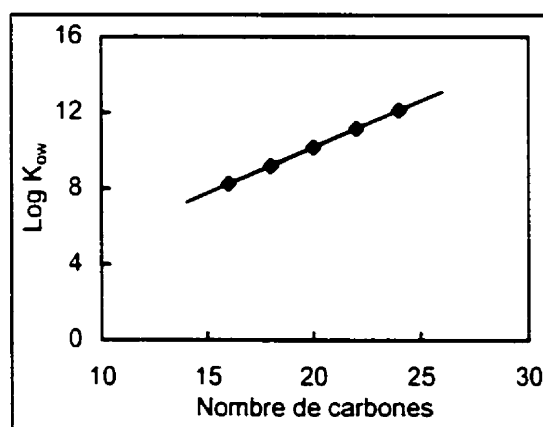


Figure 2.2 Logarithme du coefficient de partition octanol/eau indiquant l'hydrophobicité des alcanes linéaires.

2.3. RESTAURATION DES SITES CONTAMINÉS

Plusieurs sorts possibles attendent les polluants dans l'environnement : volatilisation, adsorption et adhérence à la matière organique du sol, oxydation chimique, photo-décomposition (photo-oxydation), bioaccumulation, et biodégradation (Morgan et Watkinson, 1989; Park *et al.*, 1990). La dégradation microbienne est le processus de détoxification naturel le plus important (Bossert *et al.*, 1984; Leahy et Colwell, 1990). Puisqu'ils sont dérivés du pétrole, les *n*-alcane et HAP sont des molécules naturelles auxquels les micro-organismes ont été suffisamment exposés au cours de l'évolution pour favoriser le développement de mécanismes cataboliques (Rosenberg, 1993).

On peut regrouper les méthodes de dépollution en deux catégories : les technologies physico-chimiques et thermiques (Hamby, 1996), et les technologies biologiques (Allard et Neilson, 1997).

2.3.1. Technologies physico-chimiques et thermiques

Ces méthodes sont relativement bien établies, en particulier l'incinération à haute température. Cette dernière constitue actuellement la meilleure solution pour décontaminer les sols ou sédiments contenant de fortes concentrations de polluants, comme des boues industrielles. Elle implique toutefois la destruction du sol (disparition de la matière organique) et des coûts importants. La combustion nécessite beaucoup d'énergie, et il y a possibilité d'émanations de CO_x , NO_x et SO_x .

2.3.2. Technologies biologiques

La biorestauration implique l'utilisation de micro-organismes pour dégrader des substances organiques polluantes en sous-produits inoffensifs, tels de l'eau, du dioxyde de carbone et de la biomasse (Singleton, 1994). Pour beaucoup de polluants, il s'agit d'une approche préférable à l'incinération car elle peut s'avérer beaucoup plus

économique et versatile, et tout aussi efficace, tout en étant mieux acceptée par la population (Alexander, 1991; Larose, 1993; Singleton, 1994; Wilson et Jones, 1993).

2.3.2.1. Méthodes de bio-traitement

Cette approche comprend différents systèmes qui peuvent être séparés en trois catégories (Goyer *et al.*, 1995; Wilson et Jones, 1993).

2.3.2.1.1. In situ

Le sol contaminé n'est pas déplacé. Les amendements et les nutriments sont fournis directement au site à traiter via la phase aqueuse. De l'oxygène peut être ajouté soit dans la zone saturée (nappe phréatique) sous la forme de peroxyde d'hydrogène, soit dans la zone vadose par injection d'air («bio-ventilation»). Dans ce cas, la phase vapeur peut être extraite et traitée à la surface. La stimulation de l'activité de biodégradation par injection directe de nutriments et accepteurs d'électrons dans la zone saturée se nomme «bio-sparging». On peut aussi ensemercer avec des micro-organismes spécialement adaptés ou sélectionnés (bio-augmentation). Le facteur déterminant pour le succès de cette approche est la biodisponibilité de l'accepteur d'électrons (en général l'oxygène).

2.3.2.1.2. Ex situ

Des méthodes comme le «landfarming» (Huesemann, 1994) ou la formation de biopiles permettent un meilleur contrôle des paramètres importants comparativement au traitement *in situ*. Le traitement complet consiste en l'excavation de la terre contaminée et à la mise en piles que l'on recouvre d'une membrane géotextile. Ces piles peuvent être aérées, mélangées, ensemençées avec des micro-organismes adaptés, enrichies de nutriments etc. Ce qui se traduit par une meilleure efficacité, surtout pour la dégradation des HAP de faible et moyen poids moléculaire. Toutefois, l'excavation peut provoquer la volatilisation dans l'atmosphère des polluants les plus légers.

2.3.2.1.3. En bioréacteurs

Le biotraitement des sols et sédiments contaminés par des HAP et autres polluants peu biodisponibles peut aussi s'effectuer sous forme d'une suspension sol-eau («slurry»; boue contenant habituellement 10-30% de sol) en bioréacteurs (Mueller *et al.*, 1993; Pinelli *et al.*, 1997). D'une efficacité et rapidité supérieure aux technologies biologiques précédentes, cette méthode de traitement permet un meilleur contrôle des conditions de procédé. L'accroissement de la surface de contact et d'échange entre les micro-organismes et le substrat hydrophobe résultant de l'agitation (homogénéisation) améliore l'efficacité de biodégradation en comparaison d'un traitement en phase solide (Berg *et al.*, 1994). Évidemment plus coûteux, on choisira le biotraitement en réacteurs pour de faibles quantités de sol à décontaminer ou lorsque qu'il s'agit de polluants plus récalcitrants.

Habituellement, le procédé de traitement d'une suspension sol-eau en bioréacteur («bioslurry») consiste en une séquence semi-continue de réacteurs parfaitement mélangés (CSTRs). Dans le premier bioréacteur, le sol contaminé préalablement tamisé est mélangé avec de l'eau et des nutriments et la microflore indigène adaptée dégrade les contaminants les plus biodisponibles. Le mélange sol-eau est ensuite transféré dans un second réacteur dans lequel on peut ajouter différents oxydants chimiques et/ou surfactants afin de rendre les polluants persistants plus facilement attaquables. Finalement, le mélange est transféré dans un troisième (ou plusieurs) bioréacteur dans lequel des micro-organismes spécialement sélectionnés sont inoculés afin de dégrader les molécules les plus récalcitrantes. Ce procédé de traitement efficace est cependant relativement peu utilisé à cause des coûts de traitement plutôt élevés.

2.4. PARAMÈTRES IMPORTANTS DANS LA BIORESTAURATION DES SITES CONTAMINÉS AUX HYDROCARBURES

Les principaux facteurs limitant la biodégradation des composés récalcitrants ont fait l'objet de plusieurs articles de synthèse (Hughes *et al.*, 1997; Providenti *et al.*, 1993).

Trois catégories de paramètres doivent être optimisés afin de favoriser le biotraitement de sites contaminés (Blackburn et Hafker, 1993).

2.4.1. Premier facteur: Présence de micro-organismes adaptés

Des micro-organismes déjà adaptés à la biodégradation se rencontrent partout dans l'environnement puisque les hydrocarbures sont des substances naturelles. Habituellement, plus un site renferme une concentration élevée d'hydrocarbures et plus la proportion de micro-organismes adaptés augmente (Cerniglia, 1993). Plusieurs micro-organismes ont développé des mécanismes leur permettant d'utiliser des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques comme source de carbone et d'énergie. De nombreuses revues bibliographiques très complètes ont été publiées, en particulier sur la biodégradation des HAP (Cerniglia, 1984, 1992, 1993; Cerniglia et Heitkamp, 1989; Cutright et Lee, 1994; Shuttleworth et Cerniglia, 1995) et de nouvelles souches sont régulièrement rapportées dans la littérature.

Plusieurs genres microbiens possèdent l'habileté de dégrader et métaboliser des HAP, mais un micro-organisme seul peut rarement en dégrader une grande variété. Tenter de différencier les différents modes de «dégradabilité» rapportés dans la littérature est très difficile car les définitions de minéralisation, co-métabolisme, dégradation plus ou moins complètes ne sont généralement pas équivalentes ni comparables d'un auteur à l'autre. La grande majorité des bactéries capables de dégrader des HAP de deux ou trois cycles aromatiques sont des pseudomonades du groupe des fluorescentes; mes travaux de maîtrise en sont un bon exemple (Déziel, 1996). Néanmoins, peu de micro-organismes capables de dégrader complètement, ou même de seulement co-métaboliser, des HAP possédant plus de trois cycles aromatiques ont été observés en cultures pures (Cerniglia, 1993). Les HAP de haut poids moléculaire ont longtemps été considérés récalcitrants (Cerniglia et Heitkamp, 1989). Cependant, certains travaux plus récents suggèrent que des micro-organismes capables de dégrader des HAP de haut poids moléculaire se retrouvent plus couramment qu'anticipé (Kästner *et al.*, 1994). Au cours des dernières années, la littérature rapporte plusieurs bactéries démontrant le potentiel de transformer,

dégrader ou minéraliser certains HAP de plus de trois cycles (incluant le pyrène, le benz[*a*]anthracène, le chrysène et le benzo[*a*]pyrène) : *Beijerinckia* sp. (*Sphingomonas yanoikuyae*) B1 [B8/36] (Gibson *et al.*, 1975; Khan *et al.*, 1996; Mahaffey *et al.*, 1988), *Mycobacterium* sp. Pyr-1 (Heitkamp *et al.*, 1988; Kelley *et al.*, 1991), *Pseudomonas* (*Sphingomonas*) *paucimobilis* EPA 505 (Mueller *et al.*, 1990; Ye *et al.*, 1996), *Alcaligenes denitrificans* WW1 (Weissenfels *et al.*, 1990); *Rhodococcus* sp. UW1 (Walter *et al.*, 1991), *Mycobacterium* sp. BB 1 (Boldrin *et al.*, 1993), *Mycobacterium* sp. RJGII-135 (Grosser *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1996), *Mycobacterium flavescens* (Dean-Ross et Cerniglia, 1996), *Sphingomonas* sp. 107 (Dagher *et al.*, 1997), *Burkholderia cepacia* (Juhász *et al.*, 1996, 1997a; Juhász *et al.*, 1997b) et *Mycobacterium* sp. CH1 (Churchill *et al.*, 1999). Il est remarquable que toutes les souches isolées proviennent de genres microbiens reconnus pour leur pouvoir d'adhérence et leur parois externe très hydrophobe (Bastiaens *et al.*, 2000).

2.4.1.1. Mécanismes enzymatiques et voies métaboliques

La voie métabolique de dégradation microbienne du naphthalène, le plus simple des HAP, est bien connue (Cerniglia et Heitkamp, 1989). Le modèle le mieux étudié est le métabolisme du naphthalène par *Pseudomonas putida* PpG7 (Yen et Serdar, 1988). La première étape de la voie catabolique consiste en la formation de *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalène par l'action d'un système enzymatique appelé naphthalène dioxygénase. Ce *cis*-dihydrodiol est ensuite dégradé jusqu'au salicylate (Eaton et Chapman, 1992). La minéralisation se poursuit par l'action d'une deuxième série d'enzymes pour finalement produire des intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique.

Il semble que le système enzymatique de dégradation du naphthalène soit aussi impliqué dans les premières étapes de la dégradation des HAP de plus haut poids moléculaire. Ainsi, les systèmes *nah* (Sanseverino *et al.*, 1993), *dox* (Denome *et al.*, 1993), *pah*

(Kiyohara *et al.*, 1994) et *ndo* (Yang *et al.*, 1994) sont impliqués dans la dégradation de HAP comme le phénanthrène ou l'anthracène en leurs acides naphthoïques respectifs.

La biodégradation et assimilation des hydrocarbures aliphatiques par les bactéries est bien comprise. La stratégie typiquement employée pour dégrader les alcanes est de commencer par les convertir en acides gras : une monooxygénase introduit un atome d'oxygène pour former un alcool, lequel est ensuite oxydé en aldéhyde puis finalement en acide carboxylique. Cet acide gras est alors dirigé vers la voie de l'oxydation β . Une imposante littérature existe sur ce sujet (e.g. Singer et Finnerty, 1984). L'oxydation initiale peut aussi être effectuée par une dioxygénase, tel que récemment démontré chez *Acinetobacter* sp. M-1 (Maeng *et al.*, 1996).

La grande majorité des recherches sur la biodégradation des hydrocarbures polyaromatiques et aliphatiques a démontré que l'oxygène sert non seulement d'accepteur d'électrons mais est aussi incorporé lors de l'oxydation des molécules-cibles. Or, les contaminants se retrouvent souvent dans un environnement où la concentration en oxygène est limitée. On sait maintenant que les HAP peuvent être dégradés en conditions dénitrifiantes (Leduc *et al.*, 1992; MacRae et Hall, 1998; McNally *et al.*, 1998; McNally *et al.*, 1999; Mihelcic et Luthy, 1988), et les alcanes linéaires également (Coates *et al.*, 1997; Ehrenreich *et al.*, 2000; Rabus *et al.*, 1999). Des publications récentes rapportent également la biodégradation de plusieurs HAP en conditions sulfato-réductrices (Coates *et al.*, 1996; Coates *et al.*, 1997; Rockne et Strand, 1998). Il semble qu'une carboxylation constitue la première étape de l'attaque microbienne (Zhang et Young, 1997). Longtemps considérés complètement récalcitrants en conditions anaérobies, on commence maintenant à rapporter la biodégradation d'alcanes linéaires en conditions sulfato-réductrices (Caldwell *et al.*, 1998).

2.4.1.2. Génétique

Énormément de connaissances ont été acquises sur les gènes impliqués dans la dégradation du naphthalène par *Pseudomonas* (Yen et Serdar, 1988). *P. putida* PpG7 utilise une voie catabolique portée par le plasmide NAH7. Ce dernier contient l'opéron *nah* qui possède les gènes (*nahA-F*) codant pour les enzymes responsables de la dégradation du naphthalène en salicylate, et l'opéron *sal* sur lequel se trouvent les gènes (*nahG-M*) pour les enzymes servant à la transformation du salicylate en catéchol, puis finalement en pyruvate. La régulation des deux opérons est contrôlée par le gène *nahR*, dont l'inducteur est le salicylate (Barnsley, 1975). D'autres gènes codant pour la dégradation du naphthalène au salicylate ont été décrits : *P. putida* NCIB 9816 possède les gènes *ndo* (Ensley *et al.*, 1983), *Pseudomonas* sp. C18 les gènes *dox* (Denome *et al.*, 1993) et *P. putida* OUS82 les gènes *pah* (Kiyohara *et al.*, 1994). Les séquences de ces différents opérons sont très similaires (Denome *et al.*, 1993; Takizawa *et al.*, 1994). Récemment, les gènes et enzymes d'une nouvelle voie de dégradation du phénanthrène passant par le *o*-phthalate comme intermédiaire ont commencés à être décrit chez *Nocardioïdes* sp. KP7 (Adachi *et al.*, 1999; Iwabuchi et Harayama, 1997; Iwabuchi et Harayama, 1998; Saito *et al.*, 1999, 2000).

L'essentiel des connaissances sur les enzymes impliqués dans la biodégradation des alcanes provient de l'étude des gènes *alk* retrouvé sur le plasmide OCT de *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 (van Beilen *et al.*, 1994). Cependant, le système *alk* de *P. oleovorans* ne permet la croissance que sur les alcanes C₆ à C₁₂, alors que plusieurs bactéries peuvent également ou exclusivement utiliser des alcanes plus longs (C₁₃ à C₂₀₊), tels plusieurs *Rhodococcus* et *Acinetobacter*, lesquels portent leurs gènes de dégradation sur leur chromosome (Tani *et al.*, 2001; Whyte *et al.*, 1998). Il y a de plus en plus d'évidences indiquant l'existence de plusieurs systèmes enzymatiques similaires à *alk* mais avec des spécificités pour des chaînes aliphatiques plus longues (van Beilen *et al.*, 1994; Vomberg et Klinner, 2000; Whyte *et al.*, 1996).

2.4.2. Deuxième facteur: Conditions environnementales favorables

Les paramètres environnementaux doivent favoriser la croissance des micro-organismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures (Leahy et Colwell, 1990). Puisque l'importance de ces facteurs varie d'un site à un autre, chaque site à décontaminer doit être évalué individuellement. Voici une brève liste de quelques facteurs importants (Morgan et Watkinson, 1989; Wilson et Jones, 1993) :

- Emplacement et nature géologique du sol (granulométrie : sable, argile, silt...) ;
- Humidité (teneur en eau) : un sol trop sec ne permet pas la croissance microbienne, alors qu'un sol saturé réduit la disponibilité de l'oxygène ;
- Accepteur d'électrons approprié, habituellement l'oxygène : nécessaire car les hydrocarbures sont généralement dégradés en aérobiose. L'oxygène devient souvent le facteur limitant en profondeur dans les sols. La disponibilité est influencée par le type de sol et la présence d'eau ;
- Nutriments inorganiques (disponibilité des sels minéraux) : l'azote et le phosphore manquent souvent aux micro-organismes ;
- Température : peut affecter l'état physico-chimique des contaminants et leur association avec les composantes du sol, ainsi que l'activité et la composition de la communauté microbienne ;
- pH : souvent très variable, la valeur idéale se situe près de la neutralité ;
- Présence d'autres substrats plus facilement assimilables : les micro-organismes pourraient les utiliser préférentiellement et risquer d'épuiser l'oxygène disponible ;
- Présence de substances toxiques, tel certains métaux lourds, peut gêner l'activité des micro-organismes.

2.4.3. Troisième facteur: Biodisponibilité du substrat

Les contaminants doivent être accessibles aux micro-organismes afin de servir de substrat. La biodisponibilité limite la vitesse et l'étendu de la restauration du site contaminé. Les propriétés structurales et chimiques de la matrice contaminée et celles

des substances polluantes elles-mêmes vont affecter leur disponibilité. Entre autres, les contaminants se retrouvent habituellement dans l'environnement sous forme de mixtures hétérogènes. Les HAP pourraient donc être dissous dans des hydrocarbures liquides hydrophobes comme des huiles, ce qui peut influencer leur accessibilité aux bactéries vivant dans la phase aqueuse (Efroymson et Alexander, 1995). Le phénomène de biodisponibilité des contaminants persistants est discuté plus en détail dans la prochaine section.

2.5. BIODISPONIBILITÉ

Le problème de la biodisponibilité est une question extrêmement complexe ayant générée un nombre considérable d'études, particulièrement depuis le début des années 1990. La définition même de ce concept est très controversée (Baveye et Bladon, 1999). Dans le domaine de la biorestauration, elle indique le degré d'accessibilité d'un polluant pour qu'il soit transformé ou dégradé par un micro-organisme (Alexander, 2000). Le taux auquel des cellules peuvent assimiler un contaminant dépend de deux facteurs : [1] le taux de transfert du contaminant vers les cellules, ou en d'autres termes le taux de transfert de masse, et [2] le taux d'incorporation («uptake») et dégradation, c.-à-d. l'activité intrinsèque des cellules. La biodisponibilité dépendra donc du ratio de ces deux taux. Ainsi le taux d'assimilation d'un contaminant sera limitée par la biodisponibilité si le taux de transfert de masse est moindre que la capacité intrinsèque de biodégradation des cellules (Bosma *et al.*, 1997; Harms et Bosma, 1997).

Il est maintenant généralement accepté que la faible biodisponibilité des HAP et plusieurs autres composés organiques hydrophobes se retrouvant dans les sites contaminés constitue le principal facteur limitant la biorestauration (Harms et Bosma, 1997; Mihelcic *et al.*, 1993; Weissenfels *et al.*, 1992). La biodisponibilité et la persistance des HAP dans l'environnement dépendent de leurs caractéristiques physiques et chimiques ainsi que de la composition et structure du sol ou des sédiments. Il est généralement considéré que les bactéries n'utilisent les substrats que sous leur forme dissoute, et non par contact direct

avec les particules solides (Ogram *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1986; Wodzinski et Coyle, 1974). Ainsi, leur taux de biodégradation ne dépend pas *a priori* des capacités cataboliques (enzymatiques) des micro-organismes mais plutôt de la vitesse de transfert de masse de la phase solide (libre ou sorbée) vers la phase aqueuse (dissoute) (Aronstein et Alexander, 1992; Volkerling *et al.*, 1992). Deux groupes de facteurs reconnus pour influencer directement l'accessibilité des HAP aux micro-organismes sont discutés dans les prochaines sections : [1] leur hydro-solubilité et vitesse de dissolution, ainsi que [2] leur sorption aux sols et sédiments, et vitesse de désorption.

2.5.1. Hydro-solubilité et vitesse de dissolution

La solubilité des HAP et alcanes linéaires dans l'eau est généralement inversement proportionnelle à leur poids moléculaire. Cependant, le taux de croissance spécifique d'un micro-organisme dégradant un HAP dépend directement de sa solubilité (Bossert et Bartha, 1986), et non de son nombre de cycles aromatiques. Ainsi, des micro-organismes dégradent le phénanthrène (et même le pyrène) beaucoup plus rapidement que l'anthracène (e.g. Bossert et Bartha, 1986; Tiehm, 1994) lequel possède le même nombre de noyaux benzéniques mais est environ 20 fois moins soluble.

La vitesse de dissolution ou solubilisation d'un hydrocarbure solide limite sa vitesse de dégradation (Stucki et Alexander, 1987). D'après les travaux de Wodzinski et Coyle (1974), la vitesse de dégradation des HAP est directement proportionnelle à leur solubilité dans l'eau. La vitesse de dissolution d'un composé dépend de sa surface de contact totale avec le milieu liquide. Ainsi, Keuth et Rehm (1991) ont constaté un accroissement du taux de minéralisation du phénanthrène par une bactérie quand ils augmentaient la quantité totale dans le milieu de culture. Il est probable que la plus grande surface d'échange obtenue permettait un remplacement plus rapide de la portion dissoute. Dans le même ordre d'idée, le transfert de masse peut être augmenté par l'utilisation de fines particules de substrat, ce qui permet d'augmenter la surface

d'échange et ainsi la vitesse de dissolution (Köhler *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1986; Volkering *et al.*, 1992).

Volkering et ses collègues (1992) ont confirmé que la solubilité et la vitesse de dissolution du naphthalène limitent la croissance d'une bactérie. En effet, ils ont observé que la faible densité cellulaire de la culture initiale permet une croissance exponentielle des cellules puisque la concentration de naphthalène dissous suffit aux besoins métaboliques. Par contre, lorsque la densité cellulaire augmente jusqu'à ce que les exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution, la biodisponibilité devient limitante et la croissance linéaire. Cette dernière dépend alors de la vitesse de dissolution du naphthalène même s'il reste un excès de naphthalène solide à la surface du milieu de culture.

La vitesse de croissance bactérienne se limite donc à la vitesse de dégradation (Boldrin *et al.*, 1993), laquelle dépend de la vitesse de solubilisation. Ainsi, la croissance sur les HAP est généralement linéaire plutôt qu'exponentielle. Par conséquent, l'utilisation d'une plus grande concentration de cellules ne permettrait pas une plus grande dégradation (Volkering *et al.*, 1993). Les micro-organismes ont besoin d'une concentration minimale de substrat pour survivre (Alexander, 1994); ce niveau seuil correspond aux besoins de maintenance de l'intégrité cellulaire sans croissance ou reproduction. Or, si les bactéries n'ont accès qu'aux substrats dissous, il est probable que la solubilité de certains des HAP de plus haut poids moléculaire ne soit pas suffisante pour soutenir l'activité microbienne (Harms et Bosma, 1997). Pour connaître le véritable potentiel de croissance d'un micro-organisme sur un substrat insoluble, on doit pouvoir contourner les contraintes physico-chimiques liées au substrat en le rendant pleinement biodisponible.

2.5.2. Sorption et vitesse de désorption

L'immobilisation, par adsorption et absorption, des HAP aux sols et sédiments peut limiter leur biodisponibilité en diminuant leur concentration dans la phase aqueuse et en ralentissant leur dissolution (Carmichael *et al.*, 1997; Herbes et Schwall, 1978; Luthy *et al.*, 1997). Il est bien établi que le phénomène de séquestration des contaminants organiques dans les sols est le résultat de leur association à la matière organique ou à leur partition dans les nanopores du sol (Hatzinger et Alexander, 1997; Pignatello et Xing, 1996).

La concentration en carbone organique d'un sol (humins, acides humiques et fulviques) représente le facteur le plus important affectant la sorption des HAP (Karickhoff *et al.*, 1979; Means *et al.*, 1980). Plusieurs études ont démontré que l'affinité d'un contaminant pour la matière organique d'un sol dépend de l'hydrophobicité du composé (exprimée par le coefficient de partition octanol-eau ou K_{ow}) (Dzombak et Luthy, 1984). Puisque les HAP possèdent des valeurs de K_{ow} élevées, ils sont naturellement fortement sorbés aux sols riches en matière organique. Plus la concentration en carbone organique d'un sol est élevée, moins la proportion des HAP disponibles pour la dégradation est grande (Manilal et Alexander, 1991; Weissenfels *et al.*, 1992).

La localisation des micro-organismes et des contaminants dans le sol est l'autre facteur important. La taille des bactéries du sol a rarement moins de 0,2 μm et ils vivent principalement dans les micropores où ils sont protégés contre la prédation (protozoaires). Jusqu'à 30% du volume total de certains sols est formé de pores plus petits que les bactéries (nanopores), et de ce fait certains polluants peuvent être physiquement inaccessibles aux micro-organismes (Harms et Bosma, 1997; Hatzinger et Alexander, 1997; Pignatello et Xing, 1996).

La cinétique de la sorption peut se séparer en deux processus dynamiquement distincts. Immédiatement après la réception du contaminant dans un sol, une première phase

d'adsorption rapide et relativement réversible entre en compétition avec la biodégradation. Elle est suivie par un processus d'absorption plus lent et plus stable, qui dure jusqu'à ce que l'équilibre de sorption soit atteint (Pignatello et Xing, 1996). On parle alors de «séquestration» du contaminant (Luthy *et al.*, 1997). Plus le contact entre les contaminants et le sol sera long, plus la sorption sera tenace et durable (Hatzinger et Alexander, 1995). Ainsi, des HAP nouvellement ajoutés à un sol seront plus facilement dégradés que ceux ajoutés depuis plus longtemps (e.g. Erickson *et al.*, 1993), lesquels seront non-disponibles mais également non-toxiques (Weissenfels *et al.*, 1992). On appelle ce phénomène «aging» ou «weathering». La reconnaissance de ce phénomène est maintenant si généralisée qu'il est proposé d'en tenir compte dans l'évaluation du risque environnemental que représente un site où les contaminants ne sont plus biodisponibles (Alexander, 1995; Alexander, 2000; Kelsey et Alexander, 1997; Renner, 1998).

2.5.3. Moyens physico-chimiques pour augmenter la biodisponibilité

Malgré la présence de micro-organismes adaptés et l'optimisation des paramètres de dégradation, la biorestauration d'un sol contaminé par des polluants organiques hydrophobes restera toujours incomplète et difficile tant que leur biodisponibilité ne sera pas améliorée. Les stratégies ayant été employées pour augmenter le taux de transfert de masse des HAP et autres contaminants hydrophobes sont essentiellement basées sur l'hypothèse que ces derniers doivent se trouver dans la phase aqueuse afin d'être accessibles aux micro-organismes.

2.5.3.1. Surfactants

Les surfactants (détergents, agents tensioactifs, solubilisants, dispersants) sont des molécules amphiphiles possédant une affinité particulière pour les interphases, i.e. la capacité de s'accumuler aux interfaces entre fluides de polarités différentes et d'en modifier les caractéristiques. Ils diminuent la tension de surface d'un liquide en altérant la formation de liens hydrogènes et les interactions hydrophiles-hydrophobes (l'eau

possède la tension superficielle la plus élevée). Ces substances peuvent réduire la tension superficielle de solutions aqueuses (air-eau), la tension interfacielle entre liquides non-miscibles (e.g. eau-huile) et liquides-solides (mouillage) (Haferburg *et al.*, 1986). Une des principales caractéristiques des surfactants est leur aptitude à former des agrégats moléculaires appelés «micelles»: un arrangement thermodynamiquement stable de molécules amphiphiles sous la forme d'une sphère possédant un extérieur hydrophile et un intérieur hydrophobe.

L'effet des surfactants sur la biodégradation dépend de plusieurs paramètres du système à l'étude, incluant les aspects physico-chimiques ainsi que les concentrations de surfactant et de substrat insoluble. Les surfactants stimulent la biodégradation des composés organiques hydrophobes en améliorant leur biodisponibilité aux micro-organismes par l'augmentation de leur surface de contact et d'échange, et de leur concentration dans la phase aqueuse. Néanmoins, même en présence de surfactant, la vitesse de dégradation d'un HAP dépend toujours de sa solubilité (Tiehm, 1994). On peut regrouper les mécanismes d'action des surfactants en trois catégories (Rouse *et al.*, 1994):

- Émulsion : formation d'une suspension de fines gouttelettes d'un liquide non-miscible dans un autre (West et Harwell, 1992; Zajic et Seffens, 1984). Parfois une diminution importante de la tension superficielle peut provoquer une émulsion spontanée (Rouse *et al.*, 1994).
- Solubilisation : accumulation de composés hydrophobes à l'intérieur de micelles. On parle aussi de «pseudosolubilisation» puisque les micelles dans une phase aqueuse forment une pseudophase (Edwards *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991). La concentration de surfactant à laquelle les micelles commencent à se former se nomme concentration micellaire critique (CMC), et elle correspond en fait à la solubilité du surfactant.

- Désorption : effet favorisant l'extraction des contaminants immobilisés sur les particules de sols et de sédiments (Vigon et Rubin, 1989), en outre en diminuant les forces capillaires à l'œuvre dans les pores (Bury et Miller, 1993).

Une multitude de résultats contradictoires sont rapportés dans la littérature au sujet du rôle et de l'efficacité des surfactants à augmenter la biodégradation des substrats peu solubles (Liu *et al.*, 1995; Rouse *et al.*, 1994). Le lecteur peut consulter une revue récente et exhaustive de la littérature sur le sujet (Jordan et Cunningham, 1999). La principale question à considérer n'est pas de savoir si des surfactants peuvent effectivement accroître la solubilité de substrats insolubles, mais de déterminer si les micro-organismes peuvent utiliser les substrats ainsi solubilisés. Ainsi, les molécules hydrophobes dispersées à l'intérieur de micelles sont-elles biodisponibles ? De plus, les surfactants ont-ils un effet toxique ou inhibiteur sur les micro-organismes ? Certains chercheurs ont trouvé une diminution ou une inhibition de la biodégradation (Allen *et al.*, 1999; Deschênes *et al.*, 1995; Deschênes *et al.*, 1996; Laha et Luthy, 1991; Stelmack *et al.*, 1999; Tiehm, 1994; Tsomides *et al.*, 1995), tandis que d'autres constataient une stimulation (Aronstein et Alexander, 1992, 1993; Boonchan *et al.*, 1998; Bury et Miller, 1993; Liu *et al.*, 1995; Tiehm, 1994; Tiehm *et al.*, 1997; Volkerling *et al.*, 1995).

Liu et Luthy ont observé que la présence de surfactants permettait la désorption des HAP retenus au sol grâce à la solubilisation (Edwards *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1991). Ils ont également démontré que du naphtalène solubilisé dans des micelles de Brij-30 ou Triton X-100 était disponible et dégradable par une culture bactérienne mixte (Liu *et al.*, 1995). Cependant, des surfactants peuvent être toxiques ou inhiber la biodégradation, surtout si leur concentration dépasse la CMC (Colores *et al.*, 2000; Harms, 1999).

2.5.3.2. Systèmes à deux phases liquides

Une nouvelle technique prometteuse pour le traitement des polluants hydrophobes et/ou toxiques a commencé à être employée par quelques chercheurs : elle consiste en

l'addition d'un solvant non-miscible et non-biodégradable afin de former un système à deux phases liquides (une phase aqueuse et une phase liquide organique) (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993; Jimenez et Bartha, 1996; Köhler *et al.*, 1994; Marcoux *et al.*, 2000; Villemur *et al.*, 2000). Le solvant immiscible solubilise les composés organiques hydrophobes ce qui permet d'accroître la biodisponibilité. Une revue bibliographique décrivant le principe et l'application de cette technique a été publiée (Déziel *et al.*, 1999a) (voir le Chapitre 6).

La bonne performance de ce système dépendrait surtout de l'augmentation de la surface de contact et d'échange, ce qui augmente les taux de transfert des composés hydrophobes dissous vers les micro-organismes. Il a également été observé que les bactéries se trouvant dans un système biphasique deviennent hydrophobes et s'accumulent à l'interface (formation d'un biofilm ?). Certains émettent l'hypothèse que les bactéries adhérentes puissent acquérir leur substrat directement dans la phase organique, ce qui irait à l'encontre de l'hypothèse largement acceptée que seule la portion dissoute (aqueuse) des HAP serait accessible aux bactéries (Bouchez *et al.*, 1997b; Ortega-Calvo et Alexander, 1994). On a également observé que la phase organique était parfois émulsionnée dans les cultures très performantes : la production d'émulsifiants ou de surfactants biologiques est donc suggérée (Osswald *et al.*, 1996). Jusqu'à présent, les quelques applications de cette technique ont été effectuées en laboratoire. Les résultats publiés permettent cependant de considérer que son utilisation à plus grande échelle pourrait se révéler intéressante.

2.6. MÉCANISMES PHYSIOLOGIQUES MICROBIENS D'ACCESSION AUX SUBSTRATS HYDROPHOBES

Les deux catégories de facteurs influençant la biodisponibilité des HAP mentionnés plus haut ne tiennent pas compte de l'impact que les micro-organismes eux-mêmes puissent avoir sur la biodisponibilité des substrats qu'ils utilisent. En effet, des taux de biodégradation de composés sorbés plus rapides que les taux de désorption abiotique sont

de plus en plus souvent rapportés (Calvillo et Alexander, 1996; Grosser *et al.*, 2000; Harms et Zehnder, 1995; Tang *et al.*, 1998). Deux mécanismes sont habituellement proposés pour expliquer comment certaines bactéries peuvent faciliter la dégradation de composés sorbés : la production de biosurfactants et l'utilisation directe par l'adhérence à la matrice contaminée (Tang *et al.*, 1998; White et Alexander, 1996). Il apparaît de plus en plus probable que les cinétiques de biodégradation des hydrocarbures dépendent non seulement de la capacité catabolique intrinsèque de la microflore présente mais également d'éventuels mécanismes d'accession aux composés hydrophobes.

Par exemple, Guerin et Boyd (1992, 1997) ont observé que dans certaines conditions, du naphthalène absorbé à un sol ou à un sorbant synthétique pouvait être disponible pour la dégradation par une souche bactérienne donnée tout en étant non disponible à une autre, les deux possédant pourtant le potentiel catabolique adéquat. Ils suggèrent que la souche capable d'utiliser le HAP possède des propriétés ou mécanismes particuliers lui permettant d'avoir accès à un substrat sorbé, c.-à-d. que les micro-organismes eux-mêmes puissent augmenter la biodisponibilité (Crocker *et al.*, 1995). Cette observation a été récemment confirmée avec des souches bactériennes spécialement sélectionnées pour leur capacité à utiliser des substrats hydrophobes sorbés (Bastiaens *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 1998). Le taux de minéralisation du phénanthrène par une culture mixte (constituée principalement de *Pseudomonas*) n'a pas été affecté dans une culture à laquelle on avait ajouté différentes concentrations d'acides humiques (Laor *et al.*, 1996). Les auteurs concluent que les micro-organismes étaient capables d'utiliser directement le HAP sorbé. Chandra et ses collègues (1996) ont rapporté que la biodégradation de fluorène dans un système sédiments-eau (slurry) n'était pas limitée par la désorption tout en observant que la croissance bactérienne était essentiellement associée aux sédiments. Une autre étude a démontré qu'une population bactérienne sélectionnée par enrichissement sur du phénanthrène sorbé à un sol limoneux pouvait dégrader plus rapidement et complètement du phénanthrène sorbé qu'une souche non-adaptée. Les auteurs estiment que les bactéries spécialisées dans l'assimilation de composés

hydrophobes sorbés doivent produire des surfactants et/ou utiliser directement la phase sorbée (White et Alexander, 1996).

Dans un système à deux phases liquides, la biodégradation des contaminants est parfois plus rapide que la prédiction par le calcul du transfert de masse théorique (Efroymson et Alexander, 1991; Efroymson et Alexander, 1994). L'émulsionnement du solvant est souvent observée. Une telle émulsion peut être attribuable à deux phénomènes pas nécessairement exclusifs : l'adhérence des micro-organismes à la surface empêchant la coalescence des gouttelettes et/ou la production de biosurfactants ou bioémulsifiants (Osswald *et al.*, 1996).

Trois modes de bioassimilation des substrats peu solubles sont généralement considérés (Goswami et Singh, 1991). Ces mécanismes schématisés ont été conçus dans les années 1970 pour l'étude de la biodégradation des alcanes linéaires liquides, mais on tente généralement de les appliquer aux HAP. Notons cependant que la biodégradation des alcanes linéaires n'est généralement pas limitée par des problèmes de biodisponibilité, alors qu'ils sont beaucoup plus hydrophobes que les HAP.

- Utilisation de la phase dissoute. Ce modèle est celui généralement accepté pour les substrats liquides et solides suffisamment hydrosolubles comme les alcanes courts ($<C_{12}$) et les HAP de faible poids moléculaire. On considère que les micro-organismes utilisent ces molécules dans la phase dissoute uniquement (Wodzinski et Coyle, 1974).
- Contact direct avec le substrat (accession interfaciale). Dans ce mécanisme, le micro-organisme, dont l'enveloppe externe est alors hydrophobe et/ou adhérente, s'accroche au substrat solide ou à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe. Le substrat pénètre alors directement l'enveloppe cellulaire sans se dissoudre au préalable dans la phase aqueuse. L'attachement direct des micro-organismes au substrat est bien connu pour

les hydrocarbures liquides (Nakahara *et al.*, 1977; Rosenberg et Rosenberg, 1981). Malgré le fait que les HAP ne soient généralement considérés accessibles aux bactéries que sous leur forme dissoute, certains considèrent tout de même que des organismes attachés puissent assimiler directement ces substrats hydrophobes (Shuttleworth et Cerniglia, 1995).

- Contact avec micelles (pseudosolubilisation). Il a été proposé que les micro-organismes puissent produire des biosurfactants qui solubiliseraient le substrat par la formation de micelles et que ces derniers seraient directement assimilés. De plus, comme les biosurfactants possédant une structure amphiphilique très similaire aux surfactants synthétiques, il est raisonnable de prévoir qu'ils pourraient favoriser la biodégradation des hydrocarbures par le même mécanisme, c.-à-d. une pseudophase agissant comme réservoir.

2.6.1. Assimilation par contact direct

2.6.1.1. Hydrophobicité et adhérence

L'adhérence des micro-organismes, dont l'hydrophobicité de la surface cellulaire est un indicateur important (Van Loosdrecht *et al.*, 1987b), a été proposée comme un prérequis pour la croissance sur des hydrocarbures liquides dans deux circonstances : une faible densité cellulaire et une émulsion préalable limitée. Une souche bactérienne mutante rendue non-adhérente était incapable de croître en culture liquide avec de l'hexadécane, à moins qu'un bioémulsifiant ne soit ajouté (Rosenberg et Rosenberg, 1981). Plus récemment, on a observé qu'une souche d'*Acinetobacter calcoaceticus* formait un biofilm à la surface des gouttelettes d'huiles qu'elle utilisait comme substrat (Marin *et al.*, 1996). Cette bactérie produit un bioémulsifiant capable de disperser une variété d'hydrocarbures aliphatiques et aromatiques liquides. Le mode d'assimilation par contact direct (adhérence) est répandu chez les micro-organismes utilisant les substrats liquides hydrophobes (e.g. Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b; Chakravarty *et al.*, 1975;

Efroymsen et Alexander, 1991; Neufeld *et al.*, 1980; Ng et Hu, 1989). Cependant, peu d'articles décrivant la croissance directement sur la surface d'alcanes à l'état solides ont été publiés (Kirshner Zilber *et al.*, 1980; Whyte *et al.*, 1999). Et un nombre tout aussi limité d'exemples de bactéries formant un biofilm à la surface de cristaux de HAP a été rapporté (Mulder *et al.*, 1998; Stringfellow et Aitken, 1994). *Mycobacterium* sp. S1 est capable de croître sur l'anthracène (Tongpim et Pickard, 1996) et l'inhibition de l'adhérence par un surfactant élimine la dégradation de cet HAP (Stelmack *et al.*, 1999).

Il a été suggéré que les substrats hydrophobes sorbés, généralement considérés non-disponibles à l'attaque microbienne, puissent être accessibles aux bactéries attachées (Mihelcic *et al.*, 1993). Plusieurs types de bactéries s'associent aux surfaces et peuvent former un biofilm (Costerton *et al.*, 1995). L'attachement des bactéries aux surfaces solides est étudié depuis longtemps, mais l'importance et l'impact sur le comportement et le métabolisme des micro-organismes est complexe et encore mal compris. Très peu d'information est disponible dans le domaine de la biodégradation des polluants hydrophobes sorbés. Cependant, plusieurs publications récentes proposent que des composés sorbés soient biodisponibles à des bactéries elles-mêmes attachées aux supports (Chandra *et al.*, 1996; Crocker *et al.*, 1995). Certains ont observé que l'adhésion des bactéries au matériel sorbant leur permet d'avoir accès aux molécules sorbées et donc non-biodisponibles dans la phase aqueuse (Calvillo et Alexander, 1996; Harms et Zehnder, 1995). Du naphthalène sorbé à différents sols est plus facilement accessible et dégradé par une bactérie dont la paroi externe est hydrophobe et qui a une tendance plus grande à s'attacher que par une autre qui vit plutôt en suspension dans la phase aqueuse (Guerin et Boyd, 1997).

2.6.1.2. Développement des biofilms

Les micro-organismes sont généralement considérés comme des êtres simples et solitaires en compétition les uns avec les autres. Néanmoins, grâce en particulier à deux découvertes récentes, cette vision traditionnelle est en voie d'être remplacée par une

nouvelle conception de la vie microscopique (Shapiro, 1998). Premièrement, on a constaté que beaucoup de bactéries vivent naturellement sous forme de communautés attachées aux surfaces dans un écosystème très bien structuré et organisé appelé «biofilm» (Costerton *et al.*, 1995; Costerton *et al.*, 1994; Davey et O'Toole, 2000; O'Toole *et al.*, 2000b; Watnick et Kolter, 2000). Deuxièmement, comme le laisse prévoir la structure différenciée et le développement complexe de la structure d'un biofilm, on sait maintenant que les bactéries communiquent entre elles et peuvent ainsi coordonner leurs activités (Davies *et al.*, 1998; De Kievit *et al.*, 2001; De Kievit et Iglewski, 1999; Fuqua *et al.*, 1994; Parsek et Greeberg, 1999). L'importance naturelle de l'adhérence et croissance aux surfaces amène même certains chercheurs à soutenir que le mode de vie sous forme de biofilms prédomine dans l'environnement et que les bactéries «planctoniques», c.-à-d. flottant librement en suspension, ne représenteraient en définitive qu'une étape intermédiaire permettant la dissémination des micro-organismes d'un biofilm vers une nouvelle surface à coloniser (Watnick et Kolter, 2000).

Au cours des dernières années, *P. aeruginosa* a servi de modèle privilégié pour élucider les étapes menant à la formation d'un biofilm (e.g. De Kievit *et al.*, 2001; O'Toole *et al.*, 2000a; O'Toole et Kolter, 1998a). Tel qu'illustré à la Figure 2.3., on peut résumer ces étapes comme suit : [1] attachement initial et formation de microcolonies, [2] maturation des microcolonies en un biofilm différencié, et [3] détachement et dispersion des cellules planctoniques (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000b). Les deux premières étapes du processus de développement d'un biofilm par *P. aeruginosa* sont relativement bien caractérisées. Cependant, le mécanisme déterminant le détachement et la dispersion des cellules n'est pas connu. Dans l'article #3, nous proposons que les biosurfactants produits par *P. aeruginosa* puissent jouer un rôle dans ce processus (voir section 5.3).

De nombreux aspects distinguent les bactéries retrouvées dans un biofilm de leur contrepartie en suspension et elles bénéficient de plusieurs avantages. Entre autres, les bactéries en biofilms sont particulièrement résistantes aux agressions causées par la

dessiccation, les rayons ultraviolets, les biocides, les prédateurs, le manque de nutriments, etc. (Costerton *et al.*, 1995). Les nombreuses différences entre le phénotype des bactéries en suspension vs. les bactéries en biofilms ne peuvent pas être expliquées de façon pleinement satisfaisante simplement par l'attachement et la présence d'une matrice d'exopolysaccharides. L'hypothèse habituellement suggérée est que les bactéries d'un biofilm soient physiologiquement et métaboliquement distinctes des cellules planctoniques (Costerton *et al.*, 1995) et que le phénotype-biofilm soit génétiquement programmé (Kuchma et O'Toole, 2000). Chez *P. aeruginosa*, la biosynthèse de l'alginate est activée par l'attachement des cellules à une surface (Davies *et al.*, 1993) et la synthèse d'au moins 11 protéines est modifiée par l'attachement à une surface (Brözel *et al.*, 1995). Chez *Escherichia coli*, l'expression d'environ 38% des gènes est modifiée par le passage du mode de croissance planctonique au mode de croissance en biofilm (Prigent-Combaret *et al.*, 1999). On considère généralement que l'expression génique associée au phénotype-biofilm est contrôlée par un système de régulation majeur déclenché par le contact prolongé ou l'adhérence avec une surface (Cochran *et al.*, 2000). Ce mécanisme de conversion planctonique ↔ biofilm n'a cependant pas encore été identifié. À l'article #1 (section 3.2), nous proposons un nouveau modèle permettant d'expliquer la transition vers le phénotype-biofilm chez *P. aeruginosa* impliquant l'émergence de variants phénotypiques très adhérents (Déziel *et al.*, 2001).

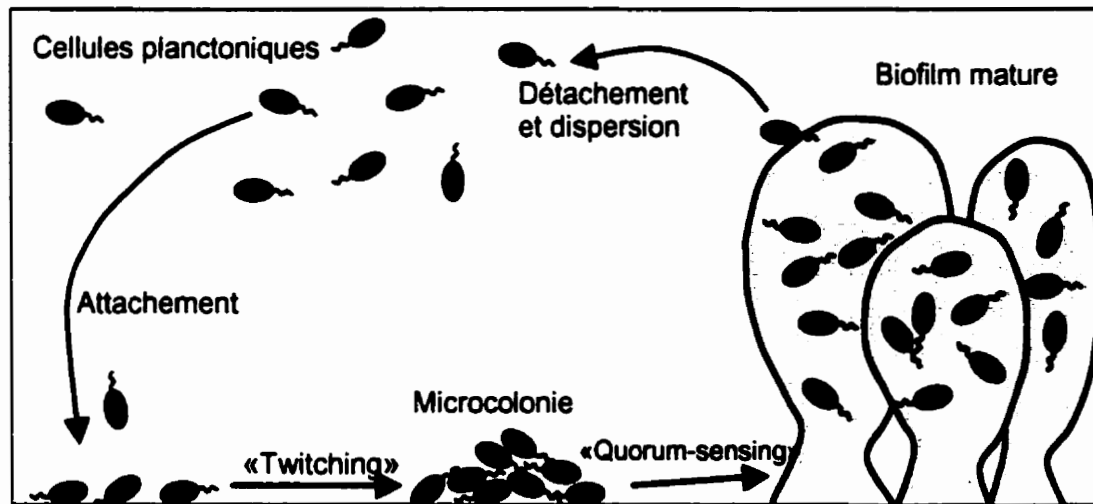


Figure 2.3 Étapes du développement d'un biofilm par *P. aeruginosa*.

L'attachement initial à la surface nécessite le flagelle. Puis les pili de type IV permettent aux bactéries de se regrouper grâce à la motilité appelée «twitching» afin de former des microcolonies. La production d'alginate s'amorce alors afin de former la matrice d'exopolysaccharides. Le système de communication intercellulaire détecte enfin la forte densité cellulaire, ce qui active la transcription des gènes impliqués dans la différenciation et maturation du biofilm.

2.6.1.2.1. Communication intercellulaire et «quorum-sensing»

La capacité que les bactéries ont de mesurer leur propre densité et de communiquer entre elles n'est connu que depuis peu de temps. Ce phénomène est appelé «quorum-sensing» ou «signalisation intercellulaire» (Bassler, 1999; Eberl, 1999; Fuqua et Greenberg, 1998; Gray, 1997; Hastings et Greenberg, 1999). Il permet aux bactéries de se comporter comme une population au lieu de cellules individuelles. Initialement décrite chez *Vibrio fischeri*, la communication intercellulaire a maintenant été décrite dans une multitude de bactéries Gram négatif, dont *P. aeruginosa*.

Le système est basé sur la production par la bactérie d'une molécule messagère, appelée auto-inducteur, synthétisée par l'enzyme auto-inducteur synthase. Habituellement, chez les Gram négatifs, les signaux intercellulaires sont des molécules basées sur un noyau d'homosérine lactone (HSL) avec une chaîne latérale acyle définissant la spécificité. Cet auto-inducteur est capable de traverser la membrane bactérienne dans les deux sens. Lorsque la densité bactérienne dans le milieu est faible, le message produit par toutes les bactéries se dilue et sa concentration intracellulaire reste basse, puisqu'elle est en équilibre avec la concentration dans le milieu environnant. Avec l'augmentation de la densité de la population bactérienne, cette concentration croît et atteint un niveau-seuil auquel le messager est alors capable de se lier à un activateur transcriptionnel spécifique (Figure 2.4). Cet activateur est inactif sans son auto-inducteur correspondant. Le complexe activateur/auto-inducteur se lie alors à des séquences d'ADN spécifiques et augmente la transcription de gènes-cibles. Ainsi, l'auto-inducteur permet aux bactéries non seulement de communiquer entre elles (signalisation intercellulaire), mais également de déterminer leur densité («quorum-sensing»). L'expression des gènes contrôlés par ce système est activée de manière coordonnée dans toutes les bactéries d'une population en même temps. Ce système leur permet par conséquent de se comporter comme une population, et non comme des bactéries isolées.

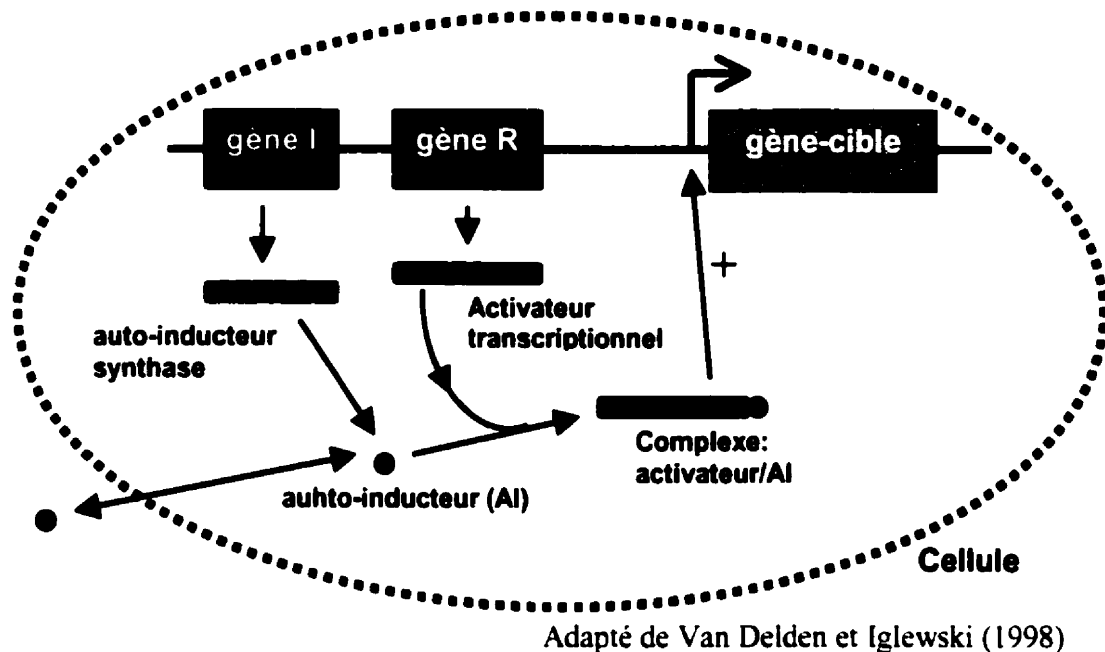


Figure 2.4 Communication intercellulaire chez les bactéries Gram négatif.

2.6.1.2.2. *Les systèmes de signalisation intercellulaires de P. aeruginosa*

P. aeruginosa possède au moins deux systèmes de signalisation intercellulaire, appelés *las* et *rhl*. Le système *las* a été décrit en premier et nommé d'après le gène-cible initialement décrit, *lasB*, lequel code pour l'élastase LasB (Passador *et al.*, 1993; Seed *et al.*, 1995). Il est composé de l'activateur transcriptionnel LasR et de l'auto-inducteur synthase LasI responsable de la synthèse de l'auto-inducteur N-3-oxododécanyol-L-HSL (3-oxo-C12-HSL). Le second système, *rhl*, a été nommé d'après le gène-cible *rhlAB* encodant la rhamnopolysyltransférase I, l'enzyme catalysant la dernière étape de synthèse des rhamnolipides (Ochsner *et al.*, 1994b; Ochsner et Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1995) (pour plus de détails, voir la section 2.6.2.1 et aussi l'article #2 et la Figure 5.1 à la section 5.2). Comme le système *las*, le système *rhl* est formé d'un activateur transcriptionnel (RhlR) et d'une enzyme (RhlI) responsable de la synthèse d'un auto-inducteur (N-butyryl-L-HSL). Chaque couple activateur/auto-inducteur est spécifique : l'auto-inducteur produit par LasI est incapable d'activer RhlR et inversement le produit de RhlI est incapable d'activer lasR. Les deux systèmes forment un circuit de régulation complexe où le système *las* domine le système *rhl* dans une cascade hiérarchique (Latifi *et*

al., 1996; Pesci *et al.*, 1997) (Fig. 2.5). En effet, l'auto-inducteur 3-oxo-C12-HSL inhibe le lien entre RhlR et son auto-inducteur C4-HSL tant que la concentration de ce dernier n'est pas suffisamment élevée. De plus, LasR activé favorise la transcription de *rhII* et *rhlR* (Pesci *et al.*, 1997). Une multitude de gènes codant pour des facteurs de compétition, de survie et de virulence sont contrôlés par ces deux systèmes (Van Delden et Iglewski, 1998; Whiteley *et al.*, 1999). Ainsi, de nombreuses fonctions essentielles à la survie bactérienne sont exprimées de manière synchrone par toute la population bactérienne lorsque sa densité atteint un niveau-seuil. Par exemple, la signalisation intercellulaire contrôle les activités multicellulaires nécessitant l'action concertée de la population, tels que la différenciation d'un biofilm (Davies *et al.*, 1998; De Kievit *et al.*, 2001), ou les motilités¹ de type «twitching» (Glessner *et al.*, 1999) ou «swarming» (Köhler *et al.*, 2000). Chaque système active certains gènes préférentiellement mais plusieurs gènes-cibles peuvent être activés par les deux systèmes à la fois. Récemment, des activateurs du circuit de signalisation, tels que GacA et Vfr (Albus *et al.*, 1997; Reimann *et al.*, 1997) et des inhibiteurs, tels que RsaL, QscR (un analogue de RhlR et LasR) et DksA (Branny *et al.*, 2001; Chugani *et al.*, 2001; de Kievit *et al.*, 1999) ont été décrits, complexifiant davantage le système. De plus, une nouvelle molécule messagère, basée sur une structure de quinolone, a été rapportée (Pesci *et al.*, 1999). Cette dernière est impliquée dans la coordination des deux systèmes mais pas dans la détermination de la densité cellulaire (McKnight *et al.*, 2000).

¹ Par souci d'unité de style, et afin d'éviter les ambiguïtés, les différents types de motilité microbienne seront désignées par leur nom anglais.

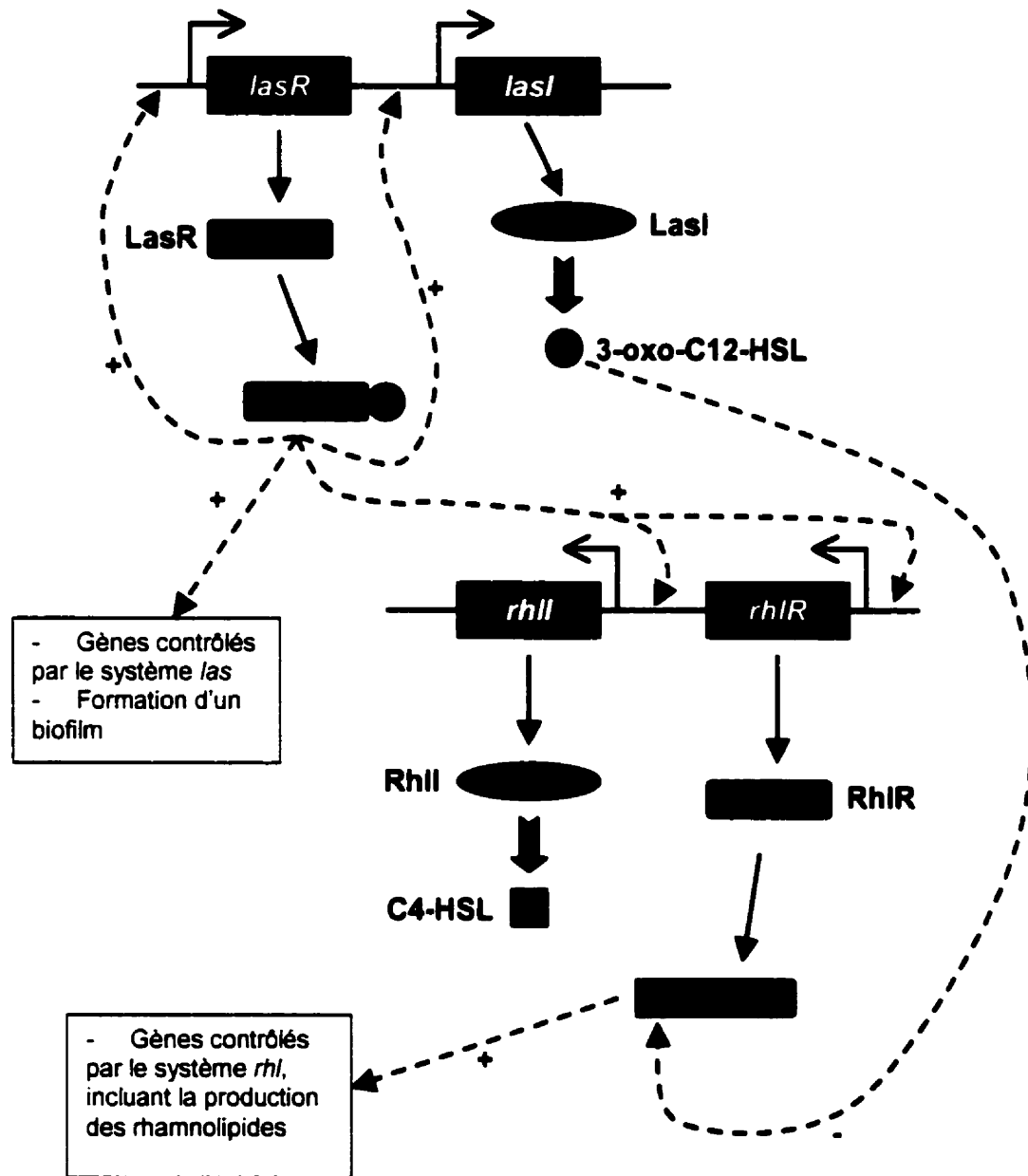


Figure 2.5 Le circuit de signalisation inter-cellulaire de *P. aeruginosa*.

3-oxo-C12-HSL : N-3-oxododécanoyl-L-homoserine lactone, C4-HSL : N-butyryl-L-homoserine lactone. (Adapté de De Kievit et Iglewski, 2000).

2.6.2. Biosurfactants

Les biosurfactants constituent un groupe varié de molécules amphiphiles synthétisées par des micro-organismes. Plusieurs revues de la littérature existent sur ce sujet très vaste, en voici quelques-unes : Banat (1995), Desai et Banat (1997), Fiechter (1992), Finnerty (1994), Haferburg *et al.* (1986), Hommel (1990), Lin (1996), Rosenberg et Ron (1999), Zajic et Seffens (1984).

2.6.2.1. Rhamnolipides

La production par *P. aeruginosa* de glycolipides extracellulaires contenant un ou deux rhamnose(s) rattaché(s) à un dimère d'acide 3-hydroxydécanoïque est connue depuis longtemps (Edwards et Hayashi, 1965; Hauser et Karnovsky, 1954, 1957; Jarvis et Johnson, 1949; Kurioka et Liu, 1967). Ces molécules amphiphiles sont les surfactants d'origine microbienne les mieux caractérisés (Lang et Wullbrandt, 1999; Maier et Soberón-Chávez, 2000; Ochsner *et al.*, 1995). Les rhamnolipides sont excrétés sous la forme d'une mixture de nombreux congénères possédant une chaîne lipidique d'une longueur variable (Déziel *et al.*, 1999b; Déziel *et al.*, 2000). Ces molécules sont produites aussi bien par les souches d'origine environnementale que médicale (Berg *et al.*, 1990; Johnson et Boese-Marrazzo, 1980), et autant sur des substrats solubles (ex. glucose, glycérol, mannitol), que peu solubles (ex. huiles végétales, hydrocarbures aliphatiques et aromatiques). Le rôle physiologique exact des rhamnolipides reste mal compris (discuté à la section 5.3.6).

La voie de biosynthèse originalement postulée (Burger *et al.*, 1963, 1966) est maintenant presque élucidée (Maier et Soberón-Chávez, 2000) (voir l'article #2 à la section 5.2 et la Figure 5.1). Les rhamnolipides sont des métabolites secondaires dont la production est régulée simultanément avec les autres facteurs de compétition/virulence extracellulaires de *P. aeruginosa* (Van Delden et Iglewski, 1998). L'expression des gènes de virulence est contrôlée au niveau transcriptionnel par deux systèmes de signalisation intercellulaire tel que discuté auparavant (section 2.6.1.1.1.1) La synthèse des rhamnolipides dépend du

système *rhl* (Ochsner *et al.*, 1994b; Ochsner et Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1997). Ce système contrôle *rhlB* et *rhlC*, lesquels codent pour les rhamnosyltransférases 1 et 2, respectivement responsables de la 1^{ère} et 2^e glycosylation du dimère lipidique (Ochsner *et al.*, 1994a; Rahim *et al.*, 2001).

2.6.2.2. Biosurfactants et biodégradation

En 1971, Hisatsuka *et al.* ont étudié une substance produite par une souche de *P. aeruginosa* qui stimulait sa croissance sur l'hexadécane. La substance avait des propriétés tensioactives et émulsionnantes et fut identifiée comme un rhamnolipide. Puis, Itoh et Suzuki (1972) ont trouvé qu'un mutant d'une souche de *P. aeruginosa* ne pouvait plus croître sur la *n*-paraffine (liquide) depuis qu'il avait perdu sa capacité de produire le biosurfactant, et que la croissance était restaurée par l'ajout de rhamnolipides provenant de la souche originale. Toutefois, l'ajout de tréhalose lipides, un biosurfactant non produit par *P. aeruginosa*, n'eut aucun effet stimulateur, suggérant la spécificité de ces biosurfactants. Le même type de spécificité a été suggéré avec les sophorolipides de *Torulopsis bombicola* (Ito et Inoue, 1982). Depuis, la littérature souligne le lien entre la croissance microbienne sur des substrats insolubles, surtout les alcanes linéaires liquides et autres huiles, et la production de biosurfactants (Bertrand *et al.*, 1994; Finnerty, 1994; Hommel, 1994; Hommel, 1990). La production exclusive ou supérieure de biosurfactants, ou de bioémulsifiants, lors de la croissance sur les *n*-alcanes suggère fortement qu'ils puissent avoir un rôle à jouer dans l'assimilation de substrats faiblement disponibles (Cameotra *et al.*, 1983; Chakravarty *et al.*, 1975; Goma *et al.*, 1974; Reddy *et al.*, 1983; Yoshida et Yamane, 1971).

Des biosurfactants furent détectés dans le milieu de culture de *P. aeruginosa* S8 lors de la dégradation de différents alcanes (Shafeeq *et al.*, 1989). Oberbremer et Muller-Hurtig (1989) ont étudié la biodégradation d'une mixture d'hydrocarbures en réacteurs contenant une suspension sol-eau. Le naphtalène fut dégradé lors de la première phase, mais la

dégradation de la plupart des autres composés moins solubles eut lieu durant une seconde phase, après que la production de biosurfactants ait diminué la tension interfaciale.

Des micro-organismes produisant des biosurfactants et bioémulsifiants se retrouvent en plus grande proportion dans les sites contaminés par des hydrocarbures que dans les sols non-contaminés (Parra *et al.*, 1989).

L'habileté des biosurfactants à émulsionner des mixtures d'eau et d'hydrocarbures a été fréquemment observée (Churchill *et al.*, 1995; Harvey *et al.*, 1990; Oberbremer *et al.*, 1990). Les rhamnolipides ont montré une excellente capacité à extraire les contaminants sorbés aux sols (Bai *et al.*, 1997; Herman *et al.*, 1997; Lafrance et Lapointe, 1998; Noordman *et al.*, 1998; Scheibenbogen *et al.*, 1994). L'effet stimulateur sur la croissance de l'ajout de surfactants biologiques a été maintes fois rapporté (Haferburg *et al.*, 1986; Morán *et al.*, 2000; Zhang et Miller, 1992, 1994). Cependant, la production de biosurfactants ou de bioémulsifiants à partir de substrats hydrophobes aromatiques ou solides a été très rarement rapportée. Une faible diminution de la tension superficielle lors de la croissance de plusieurs souches de *Pseudomonas* sur le xylène a été constatée (Cooper *et al.*, 1981). *P. aeruginosa* UG2 aurait présenté une certaine activité émulsifiante lors de la croissance sur le naphthalène (Berg *et al.*, 1990). *Pseudomonas cepacia* AC1100 dégrade l'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T), un herbicide chlorée insoluble, tout en produisant un émulsifiant (Banerjee *et al.*, 1983). Ce dernier adhérerait à la cellule pendant la croissance exponentielle et serait libéré dans le milieu de culture au début de la phase stationnaire. Ces auteurs ont proposé que ce bioémulsifiant puisse jouer un rôle dans le transport du substrat dans la cellule. Une souche de *Mycobacterium* sp. utilisant le di(2-éthylhexyl) phthalate comme substrat produisait un agent solubilisant, celui-ci augmentant la solubilité et favorisant la biodégradation de plusieurs phthalates (Gibbons et Alexander, 1989). Le seul exemple ayant été rapporté de production de biosurfactants lors de la croissance sur des HAP consiste en la synthèse et

excrétion de rhamnolipides par des souches de *P. aeruginosa* croissant sur le naphthalène et le phénanthrène (Déziel, 1996; Déziel *et al.*, 1999b; Déziel *et al.*, 1996).

Alors que l'activité émulsifiante est facilement observable, l'habileté des biosurfactants à accroître l'hydro-solubilité et la biodégradation des hydrocarbures solides a plus rarement été démontrée expérimentalement. Une augmentation de la solubilité apparente du phénanthrène a été mesurée lors de l'addition de rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* PRP652 (Hunt *et al.*, 1994). Le biosurfactant produit par *Rhodococcus* sp. était plus efficace et moins toxique que le Tween-80 dans la solubilization de plusieurs HAP (Kanga *et al.*, 1997; Page *et al.*, 1999). Zhang et Miller (1992) ont stimulé la biodégradation de l'octadécane par *P. aeruginosa* ATCC 9027 en ajoutant des rhamnolipides produits par la même souche. L'utilisation du 4,4'-chlorobiphényle par une souche d'*Alcaligenes eutrophus* a aussi été favorisée par l'ajout des rhamnolipides (Robinson *et al.*, 1996). La biodégradation de l'Aroclor 1242 en cultures liquides par une population bactérienne mixte a été augmentée par l'addition d'un biosurfactant produite par *P. cepacia* (Fiebig *et al.*, 1997). Une augmentation de la biodégradation du phénanthrène par *P. putida* CRE 7 a été observée suite à l'addition de rhamnolipides (Zhang *et al.*, 1997). Un accroissement de la solubilité apparente du naphthalène servant de substrat pour la production de biosurfactant par *P. aeruginosa* 19SJ a été rapportée (Déziel *et al.*, 1996). Ces auteurs suggéraient que la pseudosolubilisation du naphthalène puisse favoriser sa biodisponibilité. L'addition de biosurfactant peut parfois inhiber la biodégradation des contaminants, entre autre parce qu'ils sont préférentiellement dégradés par les micro-organismes et entrent donc en compétition avec les hydrocarbures (Deschênes *et al.*, 1996; Foght *et al.*, 1989; Vipulanandan et Ren, 2000).

2.6.2.3. Les biosurfactants sont-ils impliqués dans la biodégradation des molécules organiques hydrophobes ?

Malgré les très nombreux arguments trouvés dans la littérature depuis 35 ans appuyant le troisième mécanisme d'assimilation, c.-à-d. que des micro-organismes croissant sur les

substrats hydrophobes produisent des biosurfactants pour accroître la biodisponibilité de ce substrat, les démonstrations sont peu convaincantes. La plupart des indications d'une activité de pseudosolubilisation «active» rapportés, même pour les hydrocarbures liquides, sont circonstanciels (e.g. Goma *et al.*, 1974; Goswami et Singh, 1991; Ito et Inoue, 1982; Rambeloarisoa *et al.*, 1984). Une population microbienne enrichi pour sa croissance sur l'anthracène produirait un agent solubilisant favorisant la biodégradation de cet HAP (Gray *et al.*, 1994). Une souche de *P. aeruginosa* membre d'un consortium dégradant une mixture d'HAP ne pouvait croître que sur les métabolites de dégradation du naphthalène et phénanthrène produit par les autres bactéries du consortium (Arino *et al.*, 1998). Ces auteurs affirment que la présence de cette souche favorise le consortium mais l'importance de la production de rhamnolipides n'a pas été démontrée. Un consortium capable de minéraliser le benzo[a]pyrène en présence de diesel a récemment été isolé (Kanaly *et al.*, 2000). La population microbienne utiliserait le diesel pour produire des surfactants favorisant la solubilisation et biodégradation du HAP.

L'isolement de mutants ayant perdu la capacité de produire des biosurfactants est probablement la meilleure façon de vérifier le rôle et l'importance de ce phénotype. En plus des observations de Itoh et Suzuki (1972) mentionnées plus haut, Cameotra *et al.* (1983) ont obtenu un mutant de la levure *Endomycopsis lipolytica* par irradiation UV. Ce mutant était incapable de croître sur des alcanes solides ou liquides, à moins que le substrat ne soit solubilisé par un surfactant synthétique. Un mutant de *P. aeruginosa* hyperproducteur de biosurfactants a été obtenu par irradiation gamma (Iqbal *et al.*, 1995). L'augmentation de la production de rhamnolipides expliquerait la croissance améliorée de ce mutant sur l'huile brute et l'heptadécane. Le principal problème de ces méthodes de mutagenèse non-spécifique est que plusieurs mutations peuvent apparaître affectant plusieurs gènes, pas nécessairement ceux responsables de la synthèse des biosurfactants (par exemple, des gènes codant pour les enzymes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures pourraient être modifiés).

Un mutant de *P. aeruginosa* PG201 non-producteur de rhamnolipides et incapable de croître sur l'hexadécane a été obtenu par insertion aléatoire d'un transposon Tn5 (Koch *et al.*, 1991). Cependant, la mutation n'inactivait pas uniquement la synthèse des rhamnolipides mais plutôt le gène régulateur *rhlR* (Ochsner *et al.*, 1994b). Par conséquent, ce mutant n'était pas uniquement affecté dans la synthèse des rhamnolipides. La mutagenèse par insertion de transposon fut cependant employée avec succès par Ochsner *et al.* (1994a) pour isoler les gènes *rhlAB* codant pour la rhamnosyltransférase 1, l'enzyme responsable de la synthèse des mono-rhamnolipides. Ces chercheurs ont alors observé que la croissance sur l'hexadécane des mutants non-producteurs de rhamnolipides était ralentie mais pas nulle. Il s'agissait de la première démonstration directe que la synthèse des rhamnolipides facilite la croissance sur un alcane linéaire liquide.

Le mécanisme par lequel les rhamnolipides pourraient aider la bactérie productrice reste inconnu. Sekelsky et Shreve (1999) ont présenté un modèle décrivant la biodégradation de l'hexadécane par *P. aeruginosa* PG201 assumant que l'assimilation s'effectue exclusivement par pseudosolubilisation et incorporation de micelles (3^e mode d'assimilation décrit à la section 2.6). Cependant, le modèle prédit relativement mal les données expérimentales obtenues, surtout pour une souche d'origine produisant elle-même des rhamnolipides.

2.6.3. Lien potentiel entre adhérence et biosurfactants

La grande majorité des études concernant la production de biosurfactants et bioémulsifiants par des micro-organismes croissant sur un hydrocarbure sont reliées à l'utilisation des alcanes linéaires liquides. Deux types de mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle des biosurfactants dans la dégradation des alcanes (Hommel, 1990). Les biosurfactants ioniques extracellulaires, comme les rhamnolipides et les sophorolipides, émulsionnent ou pseudosolubilisent le substrat hydrophobe le rendant plus biodisponible soit par augmentation de la surface d'échange, soit par assimilation

directe des molécules retrouvées dans des micelles. Il arrive toutefois que les molécules de biosurfactants restent attachées à la paroi cellulaire et la rendent hydrophobe, ce qui pourrait faciliter le contact avec les hydrocarbures et faciliter leur diffusion dans la cellule (Fiechter, 1992; Haferburg *et al.*, 1986; Hommel, 1994).

Il semble très probable qu'il y a un lien entre les biosurfactants et l'hydrophobicité de la paroi cellulaire. En fait, ces deux phénomènes sont depuis longtemps considérés comme indissociables. On peut difficilement déterminer la contribution relative de chacun pour la croissance sur les hydrocarbures car l'adhérence des cellules au substrat hydrophobe liquide cause elle-même une émulsion en empêchant la coalescence des gouttelettes fines (Erickson et Nakahara, 1975).

Zhang et Miller (1994) ont étudié quatre souches de *P. aeruginosa* métabolisant l'octadécane. Les deux souches ayant une surface très hydrophobe dégradent l'octadécane, un alcane solide, beaucoup plus rapidement que les souches moins hydrophobes. L'addition de rhamnolipides purifiés dans les milieux de cultures a augmenté la biodégradation de l'octadécane par solubilisation. Toutefois, l'activité catabolique des souches moins performantes a été davantage stimulée par le biosurfactant, ce qui fut attribuée à l'accroissement de l'hydrophobicité de leur surface cellulaire. Essentiellement le même résultat a été obtenu par l'addition des surfactants synthétiques Tween 80 et Triton X-100 (Churchill et Churchill, 1997). L'ajout de surfactants synthétiques peut parfois favoriser l'augmentation de l'hydrophobicité (Rosenberg, 1991).

Un lien entre le contact direct et la pseudosolubilisation doit probablement exister parce que la source de carbone nécessaire pour la production de l'agent tensioactif doit venir du substrat hydrophobe lui-même. Il devrait donc y avoir une adhérence préalable à la production de biosurfactants (Wilson et Bradley, 1996). En accord avec cette proposition, une augmentation importante et temporaire de l'hydrophobicité d'une bactérie croissant

sur le naphthalène a été observée juste avant le début de la production de biosurfactants (Déziel *et al.* 1996). D'autres ont obtenu un accroissement similaire de l'hydrophobicité avant l'accumulation de rhamnolipides dans le milieu de culture (Arino *et al.*, 1996, 1998).

Suite à une synthèse exhaustive de la littérature, Neu (1996) conclut que ce qu'il nomme les «surface-active compounds» (un groupe de molécules qui inclut les biosurfactants et les polymères amphiphiles et polyphiles) doivent être responsable de la régulation de l'hydrophobicité de la surface des cellules bactériennes. À partir de ces constatations, une corrélation entre la capacité de produire du biosurfactant et l'hydrophobicité de la surface externe a effectivement été observée (Pruthi et Cameotra, 1997). Récemment, Bouchez-Naïtali *et al.* (1999) ont investigué la prévalence des deux modes d'assimilation en criblant une banque de souches dégradant l'hexadécane. Quoique 53% des isolats pouvaient produire des biosurfactants, le mécanisme d'assimilation par micelles ne fut assigné qu'à 11% des isolats car la plupart étaient fortement hydrophobes et les molécules amphiphiles semblaient le plus souvent associées avec la surface cellulaire. On connaît extrêmement peu sur la production de biosurfactants en conditions environnementales naturelles et sur le rôle qu'ils peuvent jouer dans le mode de vie des micro-organismes producteurs.

2.6.4. Autres mécanismes proposés

2.6.4.1. Transport actif

Miller et Bartha (Miller et Bartha, 1989) ont suggéré que la «récalcitrance» d'un polluant puisse parfois s'expliquer par une limitation de son transport («uptake») dans les micro-organismes. Les mécanismes d'assimilation des HAP par les micro-organismes ont été très peu étudiés (Providenti *et al.*, 1993). Un phénomène de diffusion passive est généralement admis (Bateman *et al.*, 1986) mais la présence d'un système de transport actif chez une souche de *P. fluorescens* dégradant le naphthalène a aussi été observé

(Whitman *et al.*, 1998). Cependant, la diffusion passive a récemment été rapportée chez une autre souche de *P. fluorescens*, de même qu'un système d'efflux actif (Bugg *et al.*, 2000). Si la prévalence d'un système de transport actif est éventuellement confirmée, alors le taux de transport trans-membranaire deviendrait un facteur limitant très important à étudier (Mihelcic *et al.*, 1993).

2.6.4.2. Chimiotactisme

Il est bien documenté que la direction de la motilité flagellaire chez *P. aeruginosa*, comme chez les autres espèces motiles, n'est pas un phénomène aléatoire mais plutôt orienté par une attirance vers un grand nombre de substances chimiques, ce qu'on appelle chimiotactisme (Moulton et Montie, 1979). Jusqu'à récemment, aucune étude ne rapportait la présence de ce phénotype chez les bactéries métabolisant les HAP. Cependant, une publication démontrant chez *P. putida* le phénomène de chimiotactisme envers le naphthalène est paru en 1997 (Grimm et Harwood, 1997), et plusieurs autres ont été publiées depuis ce temps (Grimm et Harwood, 1999; Marx et Aitken, 1999; Samanta et Jain, 2000).

2.7. CONCLUSION

La biorestauration présente un excellent potentiel pour dépolluer les sols contaminés. Toutefois, la biodégradation intrinsèque de certains polluants, tels les HAP, est souvent trop lente et limitée pour rendre attrayante l'application immédiate à grande échelle de cette biotechnologie. Le principal facteur limitant la biodégradation de ces molécules est leur trop faible biodisponibilité. Néanmoins, certains micro-organismes ont développé des adaptations physiologiques leur permettant d'accéder aux substrats hydrophobes peu biodisponibles pour d'autres micro-organismes. Le contact direct par adhérence sur le substrat et la production de biosurfactants représentent les deux mécanismes microbiens les plus souvent cités. Ainsi, le taux de biodégradation des substrats hydrophobes dépend de la surface totale disponible, soit pour l'attachement/adhésion des cellules, soit pour

l'activité de solubilisation/émulsification. Toutefois, la capacité des micro-organismes à adhérer aux surfaces semble le mécanisme le plus important permettant la croissance sur les substrats hydrophobes. De plus, il est très probable que les molécules amphiphiles (surfactants) produites par les micro-organismes interviennent dans ce mécanisme comme médiateurs.

CHAPITRE 3. BIOFILMS BACTÉRIENS

3.1. MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE #1

Tel que décrit au Chapitre 4, les premiers travaux de ce projet de recherche ont consistés à étudier la croissance de *P. aeruginosa* 57RP en cultures liquides avec des alcanes linéaires comme seul substrat. Lors de l'ensemencement d'échantillons de certaines de ces cultures sur géloses nutritives, nous avons constaté la présence de plusieurs colonies inhabituelles, d'aspect rugueux, beaucoup plus petites que la forme habituelle des colonies de 57RP. Une gamme d'analyses phénotypiques et génotypiques ont permis de conclure que ces colonies ne provenaient pas de bactéries contaminantes mais étaient plutôt le résultat d'un phénomène de «variation phénotypique». La croissance de ces variants est favorisée lorsqu'un *n*-alcane liquide est utilisé comme substrat par 57RP.

Cet article de recherche originale a été publié en 2001 dans *Journal of Bacteriology*, vol. 183, p.1195-1204. Nous y décrivons la caractérisation de variants phénotypiques de la souche 57RP, une première chez l'espèce *P. aeruginosa*, et démontrons que les variants S sont particulièrement bien adaptés à amorcer la formation de biofilms. Nous proposons que la variation phénotypique est le mécanisme employé par 57RP, et probablement d'autres souches de *P. aeruginosa*, afin qu'une population bactérienne puisse rapidement initier la formation d'un biofilm quand les conditions environnementales sont favorables. Un concept similaire est suggéré chez d'autres bactéries tels *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus epidermidis* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Haase *et al.*, 1999; Römling *et al.*, 1998; Yildiz et Schoolnik, 1999; Ziebuhr *et al.*, 1999).

**3.2. ARTICLE #1 : INITIATION OF BIOFILM FORMATION BY
PSEUDOMONAS AERUGINOSA 57RP CORRELATES WITH
EMERGENCE OF HYPERPILIATED AND HIGHLY ADHERENT
PHENOTYPIC VARIANTS DEFICIENT IN SWIMMING, SWARMING
AND TWITCHING MOTILITIES**

Authors

Eric Déziel^{1,2}, Yves Comeau² and Richard Villemur^{1*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier-Microbiologie et Biotechnologie, 531 Boul. des Prairies,
Laval, Québec, Canada H7V 1B7

²Civil, Geological, and Mining Engineering Department, École Polytechnique de
Montréal, P.O. box 6079, station Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3A7

*Corresponding author. INRS-Institut Armand-Frappier-Microbiologie et Biotechnologie,
531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7 Phone: (450) 687-5010. Fax:
(450) 686-5501. E-mail: richard.villemur@inrs-iaf.quebec.ca

3.2.1. Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an ubiquitous environmental bacterium capable of forming biofilms on surfaces as a survival strategy. It exhibits a large variety of competition/virulence factors, such as three types of motilities: flagellum-mediated swimming and swarming, and type IV pili-mediated twitching. A strategy frequently used by bacteria to survive changing environmental conditions is to create a phenotypically heterogeneous population by a mechanism called phase variation. In this report, we describe the characterization of phenotypic variants forming small, rough colonies that spontaneously emerged when *P. aeruginosa* 57RP was cultivated as a biofilm or in static liquid cultures. These Small (S) colony variants produced abundant type IV fimbriae, displayed defective swimming, swarming and twitching motilities, and were impaired in chemotaxis. They also autoaggregated in liquid cultures, and rapidly initiated the formation of strongly adherent biofilms. In contrast, the Large (L) colony variant (parent form) was poorly adherent, homogeneously dispersed in liquid cultures and produced scant polar fimbriae. Further analysis of the S variants demonstrated differences in a variety of other phenotypic traits, including increased production of pyocyanin and pyoverdine, and reduced elastase activity. Under appropriate growth conditions, cells of each phenotype switched to the other phenotype at a fairly high frequency. We conclude that these S variants resulted from phase variation and were selectively enriched when *P. aeruginosa* 57RP was grown as a biofilm or in static liquid cultures. We propose that phase variation ensures the prior presence of phenotypic forms well adapted to initiate the formation of a biofilm as soon as environmental conditions are favorable.

3.2.2. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium found in almost every ecological niche, including soil, water, and plants. It is also an important opportunistic pathogen of humans, primarily infecting immunocompromised patients (Govan et Deretic, 1996). Recent reports indicate that environmental and clinical *P. aeruginosa* strains are functionally equivalent and taxonomically indistinguishable (Foght *et al.*, 1996). The success of *P. aeruginosa* in various environments is attributed to its broad metabolic versatility, and its elaboration of many cell-associated and secreted virulence/survival factors (Van Delden et Iglewski, 1998).

Among the cell-surface structures of *P. aeruginosa*, the polar flagellum is responsible for a mode of motility in aqueous environment called swimming. As with most other motile bacteria, direction of movement is biased by chemotactic responses to chemical stimuli (Craven et Montie, 1985; Masduki *et al.*, 1995; Taguchi *et al.*, 1997). Flagella also mediate a mode of social motility known as swarming, recently described for the first time in *P. aeruginosa* (Rashid et Kornberg, 2000). Other cell surface structures acting as virulence/survival factors are type IV pili. These polar fimbriae are presumably the principal adhesins, mediating the adherence to eukaryotic cell surfaces (Hahn, 1997), and probably to abiotic surfaces as well (Semmler *et al.*, 1999). They are also responsible for the flagellum-independent mode of surface translocation called twitching motility (Darzins et Russell, 1997; Semmler *et al.*, 1999; Wall et Kaiser, 1999).

Bacteria in natural habitats usually grow as biofilms, organized communities of cells embedded in an extracellular polysaccharide matrix and attached to a surface (Costerton *et al.*, 1995). In recent years, a great deal of knowledge about how cells initiate biofilm formation has been gained (Stickler, 1999; Watnick et Kolter, 2000). *Escherichia coli* mutants defective in biofilm formation were found either to lack the ability to produce type I pili or to be non-motile (Pratt et Kolter, 1998). Similarly, flagellar motility and

type IV pili-based twitching motility have been shown to be required for the initial attachment and development of a biofilm by *P. aeruginosa* (O'Toole et Kolter, 1998a).

Biofilm bacteria display particular phenotypes that distinguish them from their freely growing counterparts (Costerton *et al.*, 1995; Watnick et Kolter, 2000). The differential expression of a large number of genes is known to occur in the initial steps of biofilm formation (Costerton *et al.*, 1995; Prigent-Combaret *et al.*, 1999), such as the upregulation of exopolysaccharide synthesis following bacterial adhesion to a surface (Davies *et al.*, 1993; Prigent-Combaret *et al.*, 1999). However, a regulatory system controlling the conversion to the biofilm phenotype has not been described yet.

A strategy that bacteria use to rapidly adapt and survive when environmental conditions change is to create a phenotypically diverse population by a mechanism called phase variation, that is, the high-frequency and reversible switching of phenotypic traits (Dybvig, 1993). In Gram-negative bacteria, the expression of a number of cell surface structures and outer membrane proteins, especially those linked to adhesion/aggregation/colonial morphology, is known to be regulated by phase-variable mechanisms (reviewed in Henderson *et al.*, 1999).

As a part of a research project aimed at understanding the physiological mechanisms used by *P. aeruginosa* to access and catabolize hydrophobic, poorly bioavailable substrates such petroleum (Déziel *et al.*, 1996), we have observed the spontaneous emergence of alternate phenotypic forms growing as small, rough colonies when *P. aeruginosa* 57RP was cultivated as a biofilm or in static liquid cultures (E. Déziel, Y. Comeau, et R. Villemur, 99th ASM General Meeting, abstr. K-57, 1999). Since colonial morphology reflects the differential expression of components on cell surfaces within the colony, we hypothesized that the adherence and/or motility behavior of this small colony phenotype might be altered.

In this report, we describe the isolation and characterization of phenotypic variants of *P. aeruginosa* 57RP. In contrast with the Large (L) colony variant (parent form), the Small (S) variants produced abundant polar fimbriae, displayed reduced flagellar (chemotactic) and twitching motilities, and rapidly initiated the formation of strongly adherent biofilms. Under appropriate growth conditions, cells of each phenotype switched to the other phenotype at a fairly high frequency, suggesting that these Small variants resulted from a reversible phase variation phenomenon and were selectively enriched when *P. aeruginosa* was grown as a biofilm or in static liquid cultures.

3.2.3. Materials and methods

3.2.3.1. Bacterial strains and culture media.

P. aeruginosa 57RP was originally isolated from a hydrocarbon-contaminated soil (Déziel *et al.*, 1996). Bacteria were routinely subcultured on tryptic soy agar (TSA) plates from frozen stocks, and overnight cultures in Luria-Bertani broth (LB) at 37°C and 250 rpm were used to prepare inocula, unless stated otherwise.

3.2.3.2. Evaluation of cell-surface hydrophobicity and cell adherence.

MATH. Estimation of microbial cell-surface hydrophobicity was performed with a Microbial Adhesion To Hydrocarbon test (MATH; Rosenberg *et al.*, 1980). Cells from overnight cultures were washed twice and resuspended in 25 mM phosphate-buffered saline (PBS) to an OD_{600 nm} of approx. 0.6. Then, 1.5 mL of this suspension was mixed with various volumes of hexadecane (ranging from 0-700 µl) in 16 x 125 mm test tubes and vortexed for 30 sec. After 30 min equilibration, the loss in absorbance of the aqueous phase relative to that of the initial cell suspension was measured and hydrophobicity was estimated by calculating the percentage of cells adhering to hexadecane.

MATS. To estimate the adhesion potential of the cells, the MATH test was modified by replacing the hexadecane with different amounts (0-900 mg) of fine granular silica sand (MATS: Microbial Adhesion To Silica sand).

3.2.3.3. Motility and chemotaxis assays.

Swimming. Tryptone swim plates (1% tryptone, 0.5% NaCl and 0.3% agar) were inoculated with a sterile toothpick and incubated for 16 h at 25°C. Motility was then assessed qualitatively by examining the circular turbid zone formed by the bacterial cells migrating away from the point of inoculation.

Swarming. Swarm plates were composed of 0.5% Bacto-agar and 8 g/L nutrient broth, both from Difco (Detroit, Mich.), supplemented with 5 g/L dextrose, and dried overnight at room temperature (Rashid et Kornberg, 2000). Cells were point inoculated with a sterile toothpick and the plates were incubated at 30°C for 24 h.

Twitching. Cells were stab inoculated with a toothpick through a thin (approx. 3 mm) LB agar layer (1% agar) to the bottom of the Petri dish. After incubation for 24 to 48 h at 30°C, a hazy zone of growth at the interface between the agar and the polystyrene surface was observed (Darzins, 1993). The ability of bacteria to strongly adhere and form a biofilm on the polystyrene surface was then examined by removing the agar, washing unattached cells with a stream of tap water and staining the attached cells with crystal violet (1% w/v solution).

Flagellar chemotaxis. The chemotactic response was quantified by a slightly modified version of the capillary assay of Mazumder *et al.* (1999). A 1 cc tuberculin syringe with a disposable 25-gauge needle (Terumo Medical Corp., Elkton, MD) was filled with 100 µl Bushnell-Haas (BH) mineral salts medium (Difco) containing 0.1% tryptone as a chemoattractant. Cells were grown in LB at 37°C up to the logarithmic phase, washed and resuspended in BH. A 100 µl sample of this bacterial suspension was drawn into a 200-µl pipette tip. The syringe was then inserted and tightly fit into the tip with 3 mm of the needle engaged into the cell suspension. Control capillaries containing only BH were

performed with each assay. Duplicate apparatus were incubated at 37°C for 45 min and the content of the syringe was then diluted in 25 mM PBS and plated onto TSA plates for cell enumeration.

3.2.3.4. Biofilm formation assay with polystyrene culture tubes.

The biofilm formation protocol was adapted from O'Toole and Kolter (O'Toole et Kolter, 1998b). Polystyrene 12 x 75 mm tubes containing 0.5 ml of BDT medium (BH mineral salts medium supplemented with 0.2% dextrose and 0.5% tryptone) were inoculated from overnight LB cultures and incubated at 32°C without agitation. At regular time intervals, triplicate tubes were rinsed thoroughly with water and a 1% solution of crystal violet was added to stain the attached cells. After 10-15 min of incubation at room temperature, the tubes were rinsed with water and the biomass of attached cells (biofilm) was quantified by solubilisation of the dye in 2 ml of 95% ethanol. The absorbance was measured at 600 nm with a spectrophotometer.

3.2.3.5. Sensitivity to oxidative stress.

The disk assay of Hassett et al. (1995) was used to test the sensitivity of cells to oxidative stress. Briefly, 100 µl aliquots from cultures in mid-log or stationary phases of growth were uniformly spread on TSA and medium A (King *et al.*, 1954) plates containing 2% agar. Sterile Whatman no.1 filter paper disks (7 mm diam) impregnated with 10 µl of 30% H₂O₂ were placed in triplicate on each plate. The diameter of the zones of growth inhibition around the disks was measured after 5 h of incubation at 37°C.

3.2.3.6. Production of exoproducts.

Pyocyanin. Bacteria were grown for 30 h at 37°C and 250 rpm in 2 ml of medium A, which promotes pyocyanin production, and the relative amount of pyocyanin in culture supernatant was measured spectrophotometrically at 695 nm.

Pyoverdine. Cells were cultivated at 37°C and 250 rpm for 16 h in 2 ml of medium B (King *et al.*, 1954). The relative concentration of pyoverdine was quantified in the supernatants by measurement of the fluorescence at 460 nm after excitation at 400 nm with a Spectramax Gemini microplate spectrofluorometer (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA).

Total proteases and elastase. Elastase (LasB protease) activity was determined in liquid cultures by the elastin-Congo red (ECR) hydrolysis assay as described by Pearson *et al.* (1997).

Determination of alginate production. Cells were cultivated in LB supplemented with 0.2% glycerol for 92 h at 37°C and 250 rpm. The cultures were then centrifuged at 8000 x g for 5 min and the alginate contained in the supernatants was precipitated at -70°C for 16 h with three volumes of 95% ethanol. The precipitate was recovered by centrifugation at 18,000 x g for 15 min and resuspended in water. Alginate was quantified by assaying uronic acids with the borate/carbazole method (Knutson et Jeanes, 1968), with D-mannuronate lactone (Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo.) as a standard. Values were normalized to cell growth with total cellular protein concentrations. Proteins were solubilised in 0.1 N NaOH at 70°C for 30 min and analyzed by the method of Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), with bovine serum albumin as a standard.

Rhamnolipids. Cultures were conducted at 30°C in agitated glass test tubes containing 1 ml of SW1/10F mineral salts medium with 2% mannitol (Déziel *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 1996). Total production of all isomers of rhamnolipid biosurfactants was estimated in the supernatant by extraction and hydrolysis followed by quantification of rhamnose with the orcinol assay (Chandrasekaran et BeMiller, 1980). The concentration of rhamnolipids was determined considering that 1 mg of rhamnose corresponds to 2.25 mg of rhamnolipids (Déziel *et al.*, 2000). Because of the highly clumping behavior of the S variants, the whole culture was evaluated for total protein content and correlated to rhamnolipid production.

3.2.3.7. Electron microscopy.

A drop of water was deposited on the edge of a colony from an overnight grown LB agar plate. Cells were allowed to become suspended for about 1 min, then a Formvar-coated copper grid was floated on the drop for about 45 sec, rinsed in a drop of water, and stained for 15 sec with a 2% aqueous solution of phosphotungstic acid. Samples were examined with a Hitachi H-7100 transmission electron microscope.

3.2.4. Results

3.2.4.1. Emergence of phenotypic variants of *P. aeruginosa* 57RP correlates with biofilm formation.

The wild-type *P. aeruginosa* 57RP parent strain usually produces large (~16 mm diam after 2 days at 30°C), flat colonies with an irregular, finely mottled periphery on LB plates (Fig. 3.1A). We had previously observed that when this strain was cultivated in liquid medium with hexadecane as the substrate, there was a lag phase (approx. 5-10 days) before significant growth occurred. Interestingly, at the onset of the exponential growth phase, we noticed the formation of a biofilm on the surface of hexadecane droplets and this was correlated with the appearance of small, dry-looking colonies on agar plates. A progression from the wild-type form to the small rough colony phenotype with transient appearance of intermediate size and roughness was also noticed during the cultivation period on hexadecane (E. Déziel, Y. Comeau, and R. Villemur, 99th ASM General Meeting, abstr. K-57, 1999).

A variety of colonial forms were recognized and isolated. Two typical small phenotypic variants (called S1 and S2) were selected for a more detailed characterization. When cultivated on LB plates, the S1 variant formed small (~3 mm diam after 2 days at 30°C; Fig. 3.1B), convex, circular, and opaque colonies, whereas colonies of the S2 variant were larger (~8 mm diam after 2 days at 30°C; Fig. 3.1C) and flatter, with a granular and irregular surface. This phenomenon was not restricted to strain 57RP since other *P.*

aeruginosa strains demonstrating a lag phase before growth on hexadecane also formed S phenotypic variants (data not shown). Arbitrarily-primed PCR experiments with four different primers (10 nt each) produced the same DNA patterns with the two variants and the parental strain (designated L variant), confirming that the S variants were not contaminants (data not shown).

When S variant colonies were cultivated into agitated broth medium, growth appeared along the vessel walls as highly aggregative and adherent cells yielding low turbidity cultures, whereas the L variant grew as a turbid, homogeneous suspension with no adherent cells (Fig. 3.1D). The clumping behavior of the S variants prevented representative sampling of liquid culture media. However, no difference in growth kinetics between the L and the S variants was observed when cultures were grown in glass test tubes and the whole content was evaluated for total proteins. Under static culture conditions, the L variant first grew evenly in suspension in the medium then slowly formed a surface film. Plating of this pellicle showed that it was essentially composed of S variants. Accordingly, when cultivated in the same conditions, the S1 and S2 variants predominantly grew as a thick pellicle at the surface of the liquid with a clear supernatant.

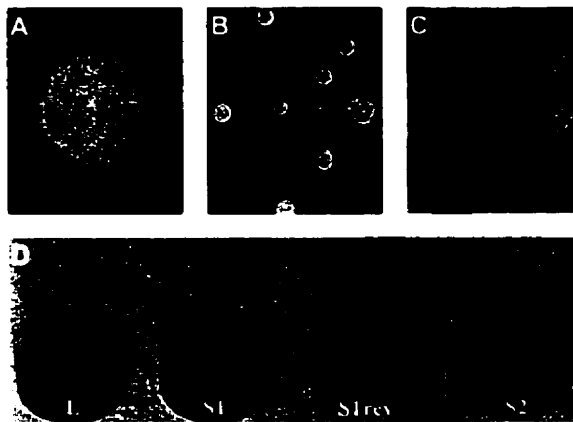


Figure 3.1 Visual differences between growth phenotypes.

(A to C) Colonies of L variant (A), S1 variant (B; the arrow indicates the emergence of a L-type revertant sector emerging from the side of a colony), and S2 variant (C) on LB agar plates incubated at 30°C. (D) Overnight growth in broth medium with shaking. The L and S1rev variants grew homogeneously dispersed in the medium whereas the S1 and S2 variants preferred the interface and the glass surface. S1rev is an L variant resulting from the reversion of an S1 variant.

Since the S variants produced adherent growth, we postulated that they could be more efficient than the L variant in initiating the formation of biofilms. In fact, we noticed that biofilms formed in test tubes or in continuous-flow bioreactors after inoculation with the L variant were always predominantly composed of S phenotypic variants. The dynamic of biofilm formation was measured for the three variants by cultivating them in non-agitated polystyrene tubes. As shown in Fig. 3.2, the L variant did not form a significant biofilm after 10 h of incubation. In contrast, the S variants quickly adhered and formed a dense biofilm within a few hours. The biofilm formed by S1 then rapidly dispersed, probably following exhaustion of the growth substrate, whereas the biofilm developed by S2 was much more stable, eventually coming off as large cell clumps during the washing steps (as shown by the larger error bars at the end of the incubation period).

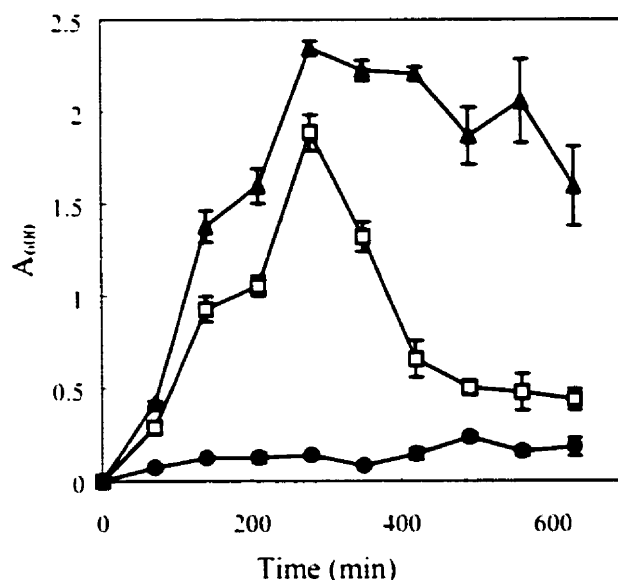


Figure 3.2 Kinetics of biofilm formation.

L (●), S1 (□), and S2 (▲) variants were cultivated in polystyrene tubes at 32°C without agitation. At the indicated time intervals, triplicate tubes were rinsed and stained with crystal violet. The amount of stained cells was then quantified by spectrophotometry (A_{600}) after solubilization of the dye in ethanol.

3.2.4.2. S variants can revert to the parent L variant phenotype.

Outside of a selective environment, the S1 variant reverted to the L phenotype at a relatively high frequency. Transfer plating of an S1 colony on TSA plates consistently resulted in the emergence of L-type revertants forming sectors emerging from the colonies (arrow on Fig. 3.1B). For example, after one week of incubation at room temperature, most colonies on a plate displayed outgrowth of L variant cells. The same phenomenon also occurred with the S2 variant but at a much lower frequency, with only occasional revertants appearing on plates. Because of the differences in growth behavior and environmental niche preferences between the L and S variants, determination of switching rates is not readily possible.

3.2.4.3. S variants demonstrate increased cell-surface hydrophobicity and adhesivity.

The aggregating and adherent behavior of the S variants suggested that their cell-surface hydrophobicity was higher than the L variant. According to the standard assay used to quantitatively evaluate cell surface hydrophobicity (MATH test), the cell surface of S1 was much more hydrophobic than the surface of the parent L variant (Fig. 3.3A). However, this variant was also more adhesive to silica sand, a hydrophilic substratum (Fig. 3.3B), indicating that the S variants are mainly characterized by their adherence. It was not possible to perform these assays with S2 because of the highly clumping behavior of this variant.

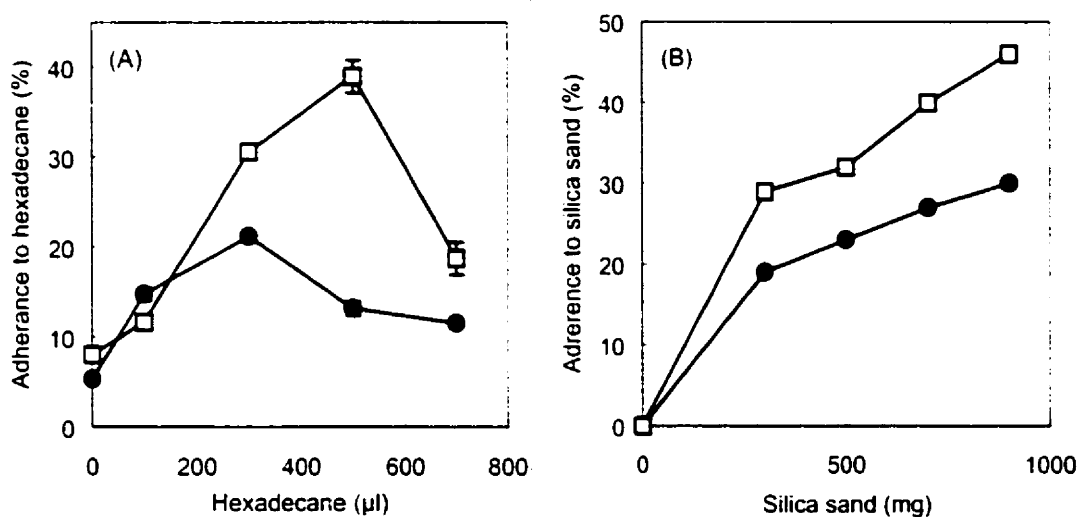


Figure 3.3 Evaluation of the cell surface hydrophobicity and adhesion potential of L and S1 variants.

With the MATH (A) and MATS (B) tests, respectively in L (•) and S1 (□) variants. Various amounts of hexadecane (MATH) or silica sand (MATS) were mixed with a washed cells suspension in PBS, and the optical densities at 600 nm before and after were compared. Values for the MATH test are means $\pm$ standard deviation of duplicates.

3.2.4.4. S variants are deficient in swimming, swarming and twitching motilities.

The reduced diameter of S variants colonies suggested that they were impaired in motility and/or chemotaxis. When the S variants were cultivated on soft agar plates, their zones of swimming were reduced compared to the L phenotype, with S2 producing slightly larger zones than S1 (Fig. 3.4A). There was some dispersion of cells from the point of inoculation but without the formation of concentric chemotactic rings, suggesting that the S variants are not completely defective in motility but may be impaired in chemotaxis. Microscopic examination showed that the S variants were motile but many cells exhibited a tumbling behavior, random movements, and lacked the directional swimming typical of the L phenotype. On swarm agar plates, the S variants remained near the point of inoculation and did not form the expanding and irregular branching pattern which is characteristic of swarming motility in *P. aeruginosa*, as recently described by Rashid and Kornberg (2000) (Fig. 3.4B).

Finally, when the strains were stabbed through a thin agar layer, the S variants formed a more reduced and denser zone of twitching motility at the polystyrene/agar interface than the L variant (Fig. 3.4C). When the agar was scraped off and the polystyrene surface rinsed with tap water, the thin layer of L variant growth was readily dispersed by the stream of water, whereas the bacteria in the twitching zone of the S variants remained firmly attached to the polystyrene surface. Staining with crystal violet indicated that the attached cells closely matched the twitching area (Fig. 3.4D). Furthermore, observation of the stained cells area on the polystyrene plate demonstrated striking differences between the adherence pattern of the S1 and S2 variants. S1 produced an expanding donut-shaped adherent zone, indicating that only the outer side of the twitching area was attached, whereas S2 cells remained adherent to the polystyrene surface, with only a few bacteria released from the center of the colony (Fig. 3.4D). Microscopic analysis revealed that the leading edge of the twitching zone was composed of rafts of cells longitudinally oriented toward the expanding direction of the colony (Fig. 3.4E-H). These rafts were

usually composed of a single layer of cells, but their density varied depending on the culture medium and temperature of incubation. Behind these rafts, a complex lattice-like arrangement of cells was formed, very similar to what was recently reported by others for *P. aeruginosa* (Rashid et Kornberg, 2000; Semmler *et al.*, 1999). In contrast to what was observed for S1, the rafts of S2 were generally larger, shorter, often multilayered, and the highly structured fine lattice-work network behind the rafts of microcolonies was absent (Fig. 3.4H). Identity of zones of bacterial adherence as a typical biofilm was confirmed by the presence of dispersed microcolonies in an alginate matrix, the latter demonstrated by staining with the exopolysaccharide-specific dye alcian blue (data not shown).

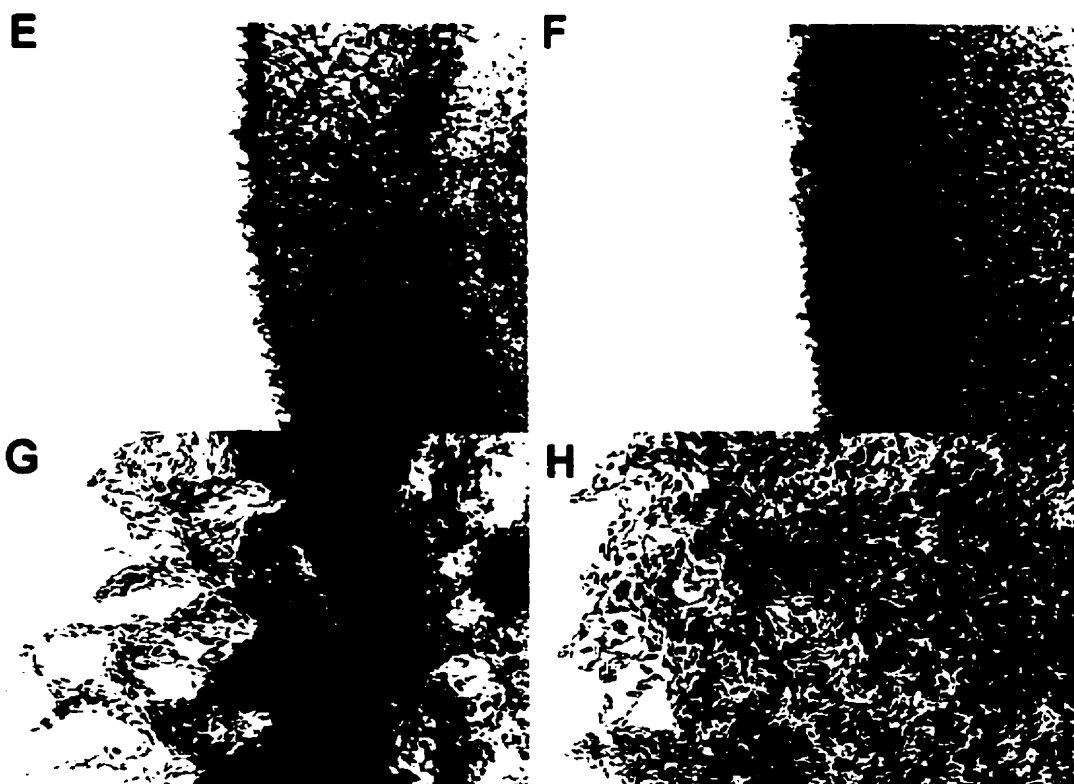
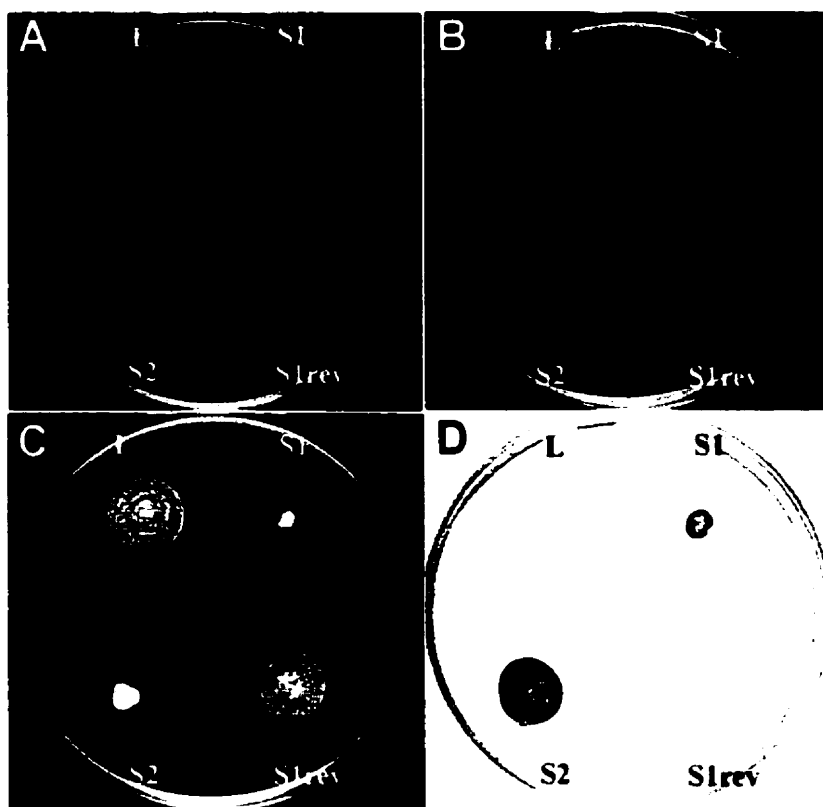


Figure 3.4 Differences in motility phenotype of the L and S variants.

(A) Swimming motility on a tryptone swim plate (0.3% agar). (B) Swarming motility on a 0.5% agar plate. (C) Twitching motility on a thin (3-mm) LB plate containing 1% agar. Twitching is observed as a hazy zone of interstitial growth surrounding the surface colony. (D) Staining with crystal violet of cells in twitching zones that remained attached to the polystyrene surface after removing the agar layer and washing with water. (E to H) Light microscopy of the outside of the twitching zone stained with crystal violet. (E and F) S1 and S2 at a magnification of X90; (G and H) rafts of S1 and S2 variant cells oriented toward the expending direction of the twitching area at a magnification of X900.

3.2.4.5. Flagellar chemotactic response is impaired in the S variants.

The fact that all three types of motilities were affected, in addition to the absence of clear chemotactic rings on swim plates, suggested a defect in chemotaxis. The capillary chemotaxis assay showed that the S variants were not significantly attracted toward tryptone, a strong chemoattractant. The relative chemotaxis response (ratio of bacterial cell number in the capillary with tryptone to that without tryptone) was between 3.5 and 4 for the L variant and between 1 and 1.5 for the S variants (Fig. 3.5). A ratio of 2 or more is considered significant (Mazumder *et al.*, 1999), confirming that the S variants displayed a defective chemotactic response.

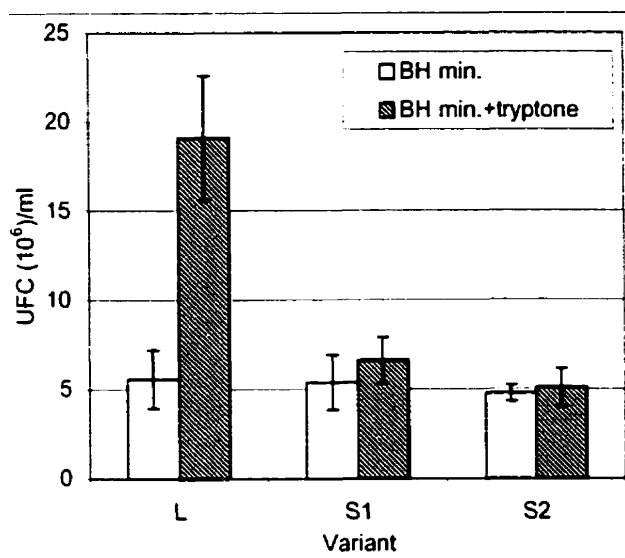


Figure 3.5 Comparison of the chemotactic responses of the L and S variants.

Capillary apparatus with or without 0.1% tryptone as a chemoattractant was prepared as described in Materials and methods and incubated at 37°C for 45 min. The content of the syringe was then plated onto TSA plates for cell enumeration. Error bars represent the standard deviation of duplicates.

3.2.4.6. Electron microscopy.

The high adherence and impaired motility of the S variants hinted at abnormal pili or flagella. Transmission electron microscopy of cells directly sampled from the edge of colonies revealed that the S variants are hyperpiliated (Fig. 3.6), with the environment of the cells surrounded with pili fragments. Pili were especially abundant in cell aggregates. Bundles formed by the entwinement of numerous pili, some larger than flagella, were frequently observed.



Figure 3.6 Transmission electron micrographs of the L (A) and S2 (B) variants.
Cells were grown overnight on LB agar plates, transferred onto Formvar-coated copper grids, and stained with phosphotungstic acid. Arrows indicate type IV pili. Bars = 0.2 μ m.

3.2.4.7. Expression of various virulence/survival factors is altered in the S variants.

We investigated whether there were any differences in other virulence/survival factors besides chemotaxis, motility and piliation. Pyocyanin, the blue phenazine pigment of *P. aeruginosa*, is an extracellular secondary metabolite with antibiotic activity. As shown in Table 3.1, the S variants produced 3-to-5-fold more pyocyanin than the L variant. Furthermore, culture supernatants of the S variants contained about 70 % more of

pyoverdine, the primary siderophore of *P. aeruginosa*, than the L phenotype. The elastase activity assay with Elastin-Congo red unambiguously demonstrated that the S variants excrete less lasB protease (Table 3.1). Alginate is an exopolysaccharide that is secreted by *P. aeruginosa* for the establishment of the biofilm matrix. Considering that the S variants formed a biofilm more readily than the L variants, we examined the production of extracellular alginate. In agitated flask cultures at 37°C, there was no difference in the concentration of uronic acids in the supernatant (Table 3.1). Rhamnolipids are heat-stable hemolysins, displaying surface-active properties, which are co-produced with other extracellular factors (Pearson *et al.*, 1997; Van Delden et Iglewski, 1998). The S variants, especially S2, appeared to produce slightly lower concentrations of this biosurfactant than the parent variant (Table 1). Finally, we examined the ability of the variants to survive stress aggression. As shown in Table 3.1, there was no clear difference in sensitivity to H₂O₂ between the L and S variants when stationary-phase cells were tested. However, when cells from the logarithmic phase of growth were plated, the zone of inhibition caused by H₂O₂ was about 30% smaller for the L variant than for the S variants, indicating hypersensitivity of the latter. Results obtained on TSA plates did not significantly differ from the ones on medium A agar.

Tableau 3.1. Comparison of production of extracellular products and sensitivity to oxidative stress between the L and S variants.

Variant	Pyocyanin ^a	Pyoverdine ^b	Elastase ^c	Alginate (mg uronic acid/ mg protein)	Rhamnolipids (mg/mg proteins)	H ₂ O ₂ sensitivity ^d	
						Stationary- phase cells	Log-phase cells
L	0.27 ± 0.02	29700 ± 2700	2.26 ± 0.27	6.53 ± 0.56	2.01 ± 0.12	17.2 ± 0.7	16.4 ± 0.5
S1	0.89 ± 0.08	50000 ± 1100	1.43 ± 0.10	6.69 ± 0.31	1.82 ± 0.08	18.3 ± 0.5	23.0 ± 0.6
S1rev ^e	0.23 ± 0.02	33000 ± 1100	ND ^f	ND	ND	17.0 ± 0.6	16.3 ± 0.5
S2	1.36 ± 0.04	48100 ± 1800	0.42 ± 0.07	7.15 ± 0.27	1.58 ± 0.13	18.5 ± 0.5	24.5 ± 1.0

^aMeasured as A₆₉₅ of the supernatant of a 30-h culture at 37°C in King's A medium.

^bMeasured in the supernatant of a 16-h culture at 37°C in King's B medium. A₄₆₀ was determined after excitation at 400 nm then reported in Relative Fluorescence Units.

^cMeasured in ECR assays of culture supernatants from 18-h cultures as described in Materials and methods and reported as A₄₉₅.

^dFilter paper disks (7-mm diameter) soaked with 10 µl of 30% H₂O₂ were placed on top of medium A agar plates covered with *P. aeruginosa* cells. Bacteria from exponential- or stationary-phase cultures in LB at 37°C were used as inoculum, and the diameter of the zone of inhibited growth was measured after 5 h of incubation at 37°C. All values are means ± standard errors of triplicates.

^eS1rev is an L variant resulting from the reversion of an S1 variant.

^fND, not determined.

3.2.5. Discussion

3.2.5.1. Colonial phenotypes and type IV pili.

Our work describes the isolation and characterization of phenotypic variants forming small colonies (S variants) selectively enriched when *P. aeruginosa* 57RP was cultivated as a biofilm, whereas the parent L phenotype, which forms large colonies, predominates in suspended growth. We also observed that the L variant of *P. aeruginosa* 57RP produced a surface pellicle enriched in S variants when cultivated in static liquid medium. Under these growth conditions, S variants demonstrated a strong preference for aggregative growth at the air-broth interface. The presence of hydrophobic type I fimbriae in *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella* is known to mediate the formation of surface film in non-agitated aerobic cultures (Hasman *et al.*, 2000; Old et Duguid, 1970; Snellings *et al.*, 1997). Hasman *et al.* (2000) reported that the physical presence of type I fimbriae on *E. coli* K-12 is responsible for the formation of small, convex colonies, whereas the absence of fimbriae is correlated with larger, flat colonies. A similar correlation is commonly used as an indicator of pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae*, which display type IV pili (Long *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 1971). Hyperpilated mutants of *P. aeruginosa* have been shown to form small colonies very similar to the S1 variant (Bradley, 1974). Thus, both surface film formation and small colonial phenotype are in agreement with hyperfimbriation of our S variants, as also confirmed by transmission electron microscopy (Fig. 3.6). Observations that the cell surface of the S variants is more hydrophobic and their adhesivity higher than the parent L variant are also coherent with the hyperpilated phenotype.

3.2.5.2. Motility and chemotaxis.

Characterization of *P. aeruginosa* mutants which lack twitching motility has allowed the identification of about 34 genes involved in type IV pili biogenesis, regulation, and function in twitching (Alm et Mattick, 1997; Wall et Kaiser, 1999). Mutation in any of

these genes results in nonpiliated cells, with few exceptions such as strains with defects in *pilT* or *pilU*, which overexpress surface pili but are incapable of twitching motility (Whitchurch *et al.*, 1991; Whitchurch et Mattick, 1994). The S variants are apparently not directly affected in any of these genes since they actually formed twitching zones at the agar/polystyrene interface, albeit smaller than the L variants. Another notable exception is *pilH*, which encodes a homologue of the enteric CheY response regulator. Strains with a defective *pilH* gene are piliated but form reduced twitching zones, with the presence of donut-shaped swirls at the outer edge of the motile zone (Darzins, 1994). We also noticed, especially with S2, many holes and rings of cells reminiscent of the swirls reported by Darzins, suggesting that *pilH* may be affected in the S variants.

Interestingly, cells in the twitching zone of the S variants were highly adherent to the polystyrene surface, suggesting that a biofilm had formed. With the S1 variant, which is the typical S phenotype, only the exterior of the twitching area was adherent, resulting in an expanding donut-shaped biofilm. Accordingly, Semmler *et al.* (1999) have shown by Western blotting with anti-pilin antisera that type IV fimbriae are expressed only on the outside of active twitching zones. It appears that cells left behind the zone of expansion, where the growth substrate was depleted, were much less adherent and readily detached when the polystyrene surface was rinsed. In this context, the observations that S variants were mostly found attached to surfaces (in biofilms and surface pellicles) and L variant in suspension suggest that the bacteria switched back to the non-adherent, chemotactically swimming L phenotype when growth conditions were no longer favorable. The doughnut-shaped ring of adherent cells therefore appears to extend at the rate of substrate consumption and twitching motility. Twitching motility was recently implicated in *P. aeruginosa* biofilm movement on abiotic surfaces (Semmler *et al.*, 1999) and in the formation of microcolonies within a differentiating/developing biofilm (O'Toole et Kolter, 1998a).

Although S variants had defects in all three known modes of motility in *P. aeruginosa*, flagellum-mediated swimming and swarming, and type IV pili-mediated twitching, only swarming was completely abrogated. *P. aeruginosa* is usually strongly attracted towards commonly occurring amino acids (Craven et Montie, 1985; Taguchi *et al.*, 1997), such as those found in tryptone. However, the lack of chemotactic rings in the swimming assay on soft agar and chemotactic response in the capillary assay indicated that the S variants are deficient in chemotaxis (Figs. 3.4a and 3.5). To control the direction of swimming, *P. aeruginosa* uses a two-component sensor-regulator system with methyl-accepting chemotaxis proteins similar to those found in enteric bacteria (Masduki *et al.*, 1995; Taguchi *et al.*, 1997). Phenotypic differences between the L and the S variants, such as small colonial size, defective flagellar and twitching motilities, were not only observed with undefined broth substrates but also with the BH mineral salts medium supplemented with succinate or dextrose (data not shown), indicating that the defect is not simply limited to chemotactic transducers. At least two additional signal transduction systems regulating pilus biosynthesis and twitching motility have been described in *P. aeruginosa*. The PilS/PilR network controls fimbrial biogenesis (Alm et Mattick, 1997), while the *pilGHJKL* gene products appear to support both pilus production and twitching motility (Alm et Mattick, 1997; Darzins et Russell, 1997). The latter gene cluster resembles both the chemotaxis (Che) network controlling flagellar rotation in enteric bacteria and the Frz system which controls gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Darzins, 1994; Darzins et Russell, 1997). Gliding, which was recently shown to be essentially the same as twitching (Semmler *et al.*, 1999), is also mediated by type IV fimbriae (Wu et Kaiser, 1995). Although the environmental signals detected by the twitching motility signal transduction system are still undefined (Darzins et Russell, 1997), it is suggested that pili might play a role as sensory organs for detecting cells nearby (Wall et Kaiser, 1999). Since twitching motility requires cell-to-cell contact (Semmler *et al.*, 1999; Wall et Kaiser, 1999), and our S variants produce denser, less differentiated twitching zones, it can be suggested that they are affected in their ability to sense neighbor cells. In this context, it is pertinent to note that swarming motility also

seems to require cell-to-cell contact (Fraser et Hughes, 1999). Since swarming was only recently described in *P. aeruginosa* (Rashid et Kornberg, 2000), any involvement of chemotaxis in this type of motility has yet to be reported. In *E. coli*, chemotaxis is not required for swarming motility but a functional chemotaxis system is essential (Burkart *et al.*, 1998).

It was recently established that inactivation of the *rhlA* gene, which is required for rhamnolipid synthesis, abolishes swarming motility in *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000; our unpublished results). However, the moderate decrease in rhamnolipid production by the S variants (Table 3.1) does not justify the complete elimination of swarming in these bacteria.

Although a modification of sensory systems is a more likely hypothesis to explain the peculiar motility behavior of the S variants, we must consider the possibility that L variant-type motility is simply prevented by the very large number of pili, causing obstruction of the normal flagellar activity and excessive adherence to the solid surface.

In agreement with our results, Pratt and Kolter (1998) have shown with *E. coli* that motility, but not chemotaxis, is essential for normal biofilm formation. Put all together, our observations (overexpression of surface pili, elevated hydrophobicity and adhesivity, defective (chemo)sensory response resulting in decreased motilities) imply that the S phenotypic variants display a modified expression of regulatory genes involved in the rapid initiation of biofilm formation.

In addition to the accelerated initiation of biofilm formation by a more efficient attachment to the surface, we investigated whether the S variants produced higher concentrations of alginate. Agitated liquid cultures showed that extracellular production of uronic acids polymers was not significantly different between the S and L variants

(Table 1). These results are in agreement with the predominant role of alginate in the consolidation of a biofilm rather than in the initial adhesion process.

3.2.5.3. Phase variation.

Phase variation is a diversity-generating mechanism ensuring that a portion of a bacterial population will be adapted to survive under new environmental conditions (Dybvig, 1993). Mechanisms regulated by phase variation are essentially stochastic within a population, yet at least partially modulated by environmental signals. We observed that under appropriate environmental/growth conditions, cells of each phenotype could switch to the other phenotype at a fairly high frequency, suggesting that the shift between S and L variant phenotypes is regulated by a phase variation mechanism.

Phenotypic variations of surface structures are common in many pathogenic bacteria. They have been observed in *E. coli* adhesins, in *Salmonella typhimurium* flagellum expression, in antigenic and phase variation of *Neisseria* adhesins, etc. (Henderson *et al.*, 1999). We have uncovered many activities coordinately regulated by a putative phase variation mechanism, indicating that a major regulator might be the target of the switch (Table 3.2). Very few examples of phase variation mechanisms regulating simultaneously multiple phenotypic determinants have been reported. Interestingly, in most cases, the phenotypic switch influences the tactic response (Kamoun et Kado, 1990; Kelman et Hruschka, 1973). In the mushroom pathogen *P. tolaasii*, a spontaneous and reversible duplication within a two-component sensor regulator, causing a frameshift mutation, regulates many phenotypic traits, including attachment, colonial form and chemotaxis (Han *et al.*, 1997). To our knowledge, no typical phenotypic variation switching mechanism has been reported in *P. aeruginosa*.

The motility phenotype that we observed for our S variants, especially S2, is strikingly similar to the one described by Rashid & Kornberg (2000) for a polyphosphate kinase (PPK) knock-out mutant of *P. aeruginosa* PAO1. They proposed that PPK, or its

product polyphosphate (poly P), might be required for the expression of *rpoS*, like in *E. coli*. The alternative sigma factor RpoS has been initially identified as a central regulator of stationary phase-responsive genes and is now associated with the general stress response (Loewen et Hengge-Aronis, 1994). Our observations of increased pyoverdine and pyocyanin production and decreased swimming and twitching motilities were also reminiscent of a recently described *rpoS* mutant of *P. aeruginosa* PAO1 (Suh *et al.*, 1999). Interestingly, it has been hypothesized that a sigma factor might control the expression of genes responsible for the biofilm phenotype (Costerton *et al.*, 1995). This prompted us to investigate further the possibility that the S variants could be affected in their synthesis of, or response to, RpoS. Like Suh *et al.* (1999), we observed an increased sensitivity to H₂O₂ (Table 3.1). However, only our log phase-grown S cells were more sensitive than the L cells. Also in contrast to the RpoS-negative mutant, we obtained a substantial decrease in elastase production but not in alginate accumulation in liquid medium (Table 3.1). Moreover, the responses to heat shock (53°C) and osmotic stress (NaCl 3M) were not significantly different between the S and L variants (data not shown). These results thus invalidate the RpoS hypothesis.

3.2.5.4. S1 is different from S2.

Although the S1 form is the more abundant phenotypic small variant that we observed, other morphotypes were obtained when the parental L variant was cultivated on hexadecane, in static cultures or as a biofilm. The S2 variant displayed many differences with the S1 variant and most of its phenotypic idiosyncrasies were expressed with more amplitude (Table 3.2). As demonstrated by the retention of adherence in the twitching zone (Fig. 3.4D) and in the biofilm kinetic assay (Fig. 3.2), S2 appears to have an impaired detachment phenotype and to form defective biofilms. The fact that this variant did not build the fine lattice-like network of cells typically found behind the rafts in twitching motility expansion zones (Semmler *et al.*, 1999) may also be related to this defect. These features could be explained by the much lower reversion frequency to the L

phenotype displayed by S2. It suggests that the S2 variant is blocked in the S phase; a mutation might impede its ability to undergo phase variation.

Tableau 3.2. Comparison of phenotypic characteristics between the L and S variants^a.

Phenotype	Description ^b	
	L variant	S variants
Colony shape	Large, flat, irregular	Small, rounded
Adherence to surfaces	+	++
Hydrophobicity	+	++
Initiation of biofilm formation	-	++
Flagella number	+	+
Polar pili number	+	++
Motility:		
– Swimming	++	+
– Swarming	+	-
– Twitching	++	+
Chemotaxis	+	-
Exoproducts:		
– Pyoverdine	+	++
– Pyocyanin	+	++
– Alginate	+	+
– Elastase	++	+
– Rhamnolipids	++	+ ^c
Sensitivity to H ₂ O ₂ stress	+	++

^aThe L variant predominates on agar plates or in agitated liquid cultures; S variants predominate in biofilms or in static liquid cultures.

^b-, absence of the phenotype; +, presence of the phenotype; ++, expression of the phenotype more pronounced than +.

^cRhamnolipid production is significantly lower than the L variant for the S2 variant only.

3.2.5.5. Biofilm phenotype.

Bacteria in biofilms are phenotypically different from their freely-swimming counterpart (Costerton *et al.*, 1995; Prigent-Combaret *et al.*, 1999). Our results indicate that the biofilm way of growth selects for a specific phenotypic population that is highly adherent but with reduced motility. Why would chemotactically-deficient cells be selected for in biofilms? Chemotaxis is essentially required in environments that are scarce in nutrients. One of the features of biofilms is to provide an environment where nutrients are continuously trapped by the exopolysaccharide matrix and available to the bacteria (Costerton *et al.*, 1995). Obviously, cells inside a biofilm do not require extensive motility until the time they leave to colonize another available surface (Watnick et Kolter, 2000). Mucoid and rough *P. aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients, thus selected for by a biofilm environment (Govan et Deretic, 1996), lack flagella or are deficient in chemotaxis (Garrett *et al.*, 1999; Luzar *et al.*, 1985).

S variants demonstrated a preference for growth at interfaces, such as a biofilm (liquid:solid), as a surface pellicle (air:liquid), or on hexadecane (liquid:liquid), suggesting that high surface hydrophobicity is a major characteristic of this phenotype. In contrast, the L variant was predominantly found freely dispersed in liquid medium, and was not able to form a biofilm. We propose that the S and L phenotypic forms of *P. aeruginosa* are adapted to different environmental niches and that growth as a biofilm selects for a phenotypically distinct subpopulation usually found in minority in counter-selective environments such as homogeneously agitated liquid cultures or agar plates. Biofilms thus act as an ecological niche colonized by a specific phenotypic population.

Our results suggest that transition between the planktonic and the biofilm phenotype is regulated by phase variation. Therefore, phenotypic diversity determined by phase variation ensures that cells well adapted to initiate the formation of a biofilm are already present as soon as environmental conditions are favorable. This may contribute to explain the major shift in gene expression and physiological properties displayed by bacteria

growing as biofilms. Although the molecular mechanisms underlying the regulation of the phase variation control mechanism involved in switching between the L and S phenotypes remains to be elucidated, this work provides useful information that will assist in the molecular characterization of the process of biofilm formation in *P. aeruginosa*.

3.2.6. Acknowledgements

We are grateful to Réjean Beaudet for the photographs, Robert Alain for the electron microscopy and Francine Turcotte-Rivard for technical assistance.

3.3. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

En plus des expériences rapportées dans la publication, d'autres hypothèses ont été considérées afin d'expliquer les phénomènes observés.

3.3.1. Est-ce que les variants phénotypiques S sont des mutants rugueux («rough») ?

Les observations initiales effectuées lors de l'étude des variants S montraient que ces formes phénotypiques étaient très hydrophobes et adhérentes, croissaient plus rapidement que le phénotype «normal» sur l'hexadécane, et formaient des colonies petites et à l'aspect rugueux. La paroi externe des bactéries Gram négatif contient des lipopolysaccharides (LPS). Ces LPS sont composés de trois sections principales : le lipide A, l'oligosaccharide central, et l'antigène O, un polysaccharide. *P. aeruginosa* possède deux types de LPS, différents dans leur antigène O : la bande A, qui est commune à toutes les souches, et la bande B, laquelle est variable et définit le sérotype d'une souche déterminée (Rivera et McGroarty, 1989). Des souches mutantes ayant perdu complètement ou en partie les bandes A et/ou B sont appelées «rugueuses» et peuvent former des colonies montrant certaines ressemblances avec les variants S décrits à l'article #1 (Déziel *et al.*, 2001). Les mutants ayant perdu la bande B deviennent hydrophobes et adhérents, et sont singulièrement efficaces dans la formation de biofilms (Beveridge *et al.*, 1997; Makin et Beveridge, 1996). Ces mutants apparaissent spontanément dans des conditions de croissance particulières, comme *in vivo* dans les poumons de patients atteints de fibrose kystique, c.-à-d. dans des biofilms (Lam *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 2000).

Nous avons donc émis l'hypothèse que les variants S soient «rugueux». Un test préliminaire a été effectué consistant en l'étude de la tendance à l'agglutination des variants S. La technique de Kropinski *et al.* (1979) a été employée. Une colonie des variants L, S1 et S2 de la souche 57RP a été dispersée dans 1 ml de PBS + 0,5 ml

d'hydrochlorure d'acriflavine (0,2% p/v) et la précipitation des cellules a été observée : les cellules du phénotype L sont demeurées en suspension alors que les variants S ont floculés, cette dernière réaction étant compatible avec un phénotype «rugueux».

Une anomalie des LPS rend la bactérie plus perméable aux molécules hydrophobes, et par conséquent plus sensible aux antibiotiques hydrophobes (Plesiat *et al.*, 1997). Nous avons donc examiné la possibilité que les variants S soient davantage perméables aux substrats hydrophobes comme hypothèse expliquant leur efficacité supérieure de biodégradation de l'hexadécane. Toutefois, aucune différence dans la sensibilité aux antibiotiques hydrophobes entre les variants L et S de 57RP n'a été observée (Fig. 3.7).

Nous avons ensuite demandé au Dr Joseph Lam (Université de Guelph, Ont.) d'analyser la composition des LPS des souches et variants suivants: 57RP-L, 57RP-S1, et 57RP-S2, 78RJ-L, 78RJ-S1, et 78RJ-S2. 78RJ est une autre souche de *P. aeruginosa* préalablement isolée (Déziel, 1996; Déziel *et al.*, 1996) formant des variants S lors de la croissance sur l'hexadécane. Les profils migratoires des LPS obtenus par électrophorèse sur gel dénaturant (SDS) de polyacrylamide n'ont montré aucune différence entre les variants L et S (résultat non-présentés).

Ces résultats indiquent que le phénotype S de *P. aeruginosa* 57RP n'est pas attribuable à une modification des LPS.

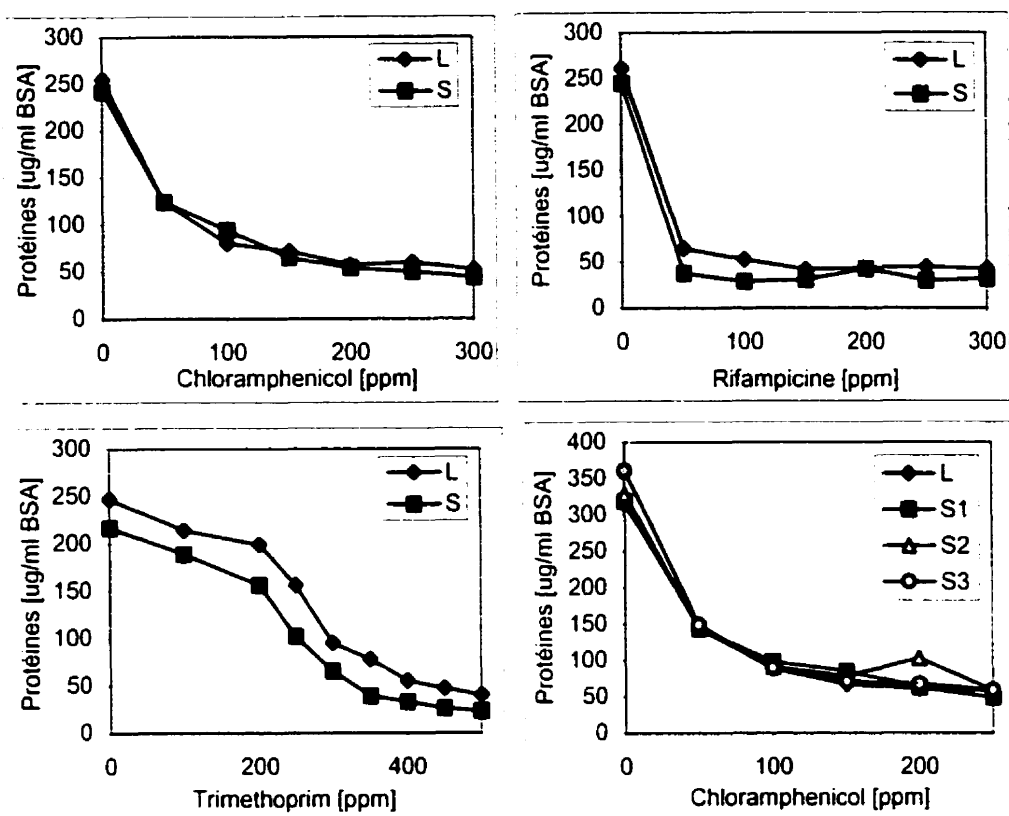


Figure 3.7 Comparaison de la sensibilité des variants L et S de la souche 57RP à différents antibiotiques hydrophobes.

La procédure a consisté à ensemencer plusieurs séries de tubes à essai contenant 1 ml de BHf + 1% (p/v) de succinate de sodium + différentes concentrations d'un des antibiotiques suivants : chloramphénicol, triméthoprim, et rifampicine. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 16h, puis la croissance a été évaluée par la quantification des protéines totales (à cause de la très forte agglutination des cellules, la détermination de la densité cellulaire par DO était inadéquate). S1, S2 et S3 sont trois formes différentes de variants S.

3.3.2. Est-ce que les variants phénotypiques sont des mutants «mucoïdes» ?

La matrice des biofilms formés par *P. aeruginosa* est principalement constituée d'un exopolysaccharide nommé alginate (Boyd et Chakrabarty, 1995). Il existe des souches mutantes surproductrices d'alginate que l'on appelle «mucoïdes». Celles-ci sont particulièrement retrouvées dans les poumons des personnes atteintes de fibrose kystique

(Govan et Deretic, 1996) où elles sont associés à la formation de biofilms (Lam *et al.*, 1980; Mathee *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000). Ces mutants «mucoïdes» exhibent habituellement une mutation spécifique dans le gène *mucA* (Martin *et al.*, 1993), qui code pour un anti-facteur σ contrôlant l'activité du facteur σ^{22} , lequel est codé par *algT* (aussi appelé *algU*) (Mathee *et al.*, 1997; Schurr *et al.*, 1996). L'inactivation de *mucA* résulte en la dérégulation de σ^{22} et l'activation des gènes de synthèse de l'alginate, lesquels dépendent de σ^{22} pour leur transcription (Mathee *et al.*, 1997; Schurr *et al.*, 1996). L'hypothèse a déjà été émise qu'un facteur σ puisse réguler l'expression des gènes spécifiant le phénotype particulier des bactéries se trouvant en biofilm (Costerton *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1993).

Les souches mucoïdes sont instables en dehors d'un environnement sélectif tel qu'un biofilm et elles subissent une réversion relativement rapidement vers le phénotype non-mucoïde. Ce système de conversion mucoïde $\leftrightarrow$ non-mucoïde pourrait donc être considéré comme un mécanisme de variation phénotypique. Quoique nos variants S ne surproduisent pas d'alginate, ils ont plusieurs traits phénotypiques en communs avec les mutants mucoïdes, tels la sélection dans un milieu biofilm, une motilité déficiente (Luzar *et al.*, 1985) et une activité élastolytique réduite (Mathee *et al.*, 1999). Nous avons donc émis l'hypothèse que les variants S soient des mutants «mucoïdes» possédant la plupart de leurs caractéristiques sauf la plus évidente, soit la surproduction d'alginate (ce qui pourrait, par exemple, s'expliquer par une mutation particulière à la souche 57RP).

Les mutants «mucoïdes» ont une délétion dans une série de cinq nucléotides guanine (G) aux positions 426-430 du gène *mucA*. Nous avons vérifié si cette mutation était présente dans les variants L, S1 et S2. Les amorces mucA1 (TGCGTCTGTACAACCAGAAC) et mucA2 (GTCTCTCCTCATCGGTTTT) (Mathee *et al.*, 1999) ont été employées pour effectuer une amplification de type PCR («Polymerase Chain Reaction») afin d'isoler la portion du gène *mucA* contenant les nucléotides d'intérêt. Le produit de l'amplification a ensuite été introduit dans le vecteur plasmidique pGEMT-Easy et cloné dans l'hôte

Escherichia coli XL1. L'insert provenant d'un clone représentatif de chaque souche a été séquencé. L'analyse des séquences obtenues a clairement démontré que la série de cinq G était présente dans le gène *mucA* des trois souches (résultat non-présenté). Par conséquent, les variants S ne peuvent pas être considérés comme «mucoïdes». Ceci confirme les observations que la production d'alginate entre les variants L et S comparée sur une variété de milieux de cultures liquides ou solides n'ait pas montré de différence significative.

3.3.3. Effets de la température d'incubation sur le phénotype

Nous avons observé que la température d'incubation affectait l'expression du phénotype particulier des variants S. En effet, les cellules des variants S1 et S2 s'agglutinaient lorsque cultivées dans un bouillon nutritif à 35°C. Toutefois, à 43°C, la température maximale de croissance tolérée par *P. aeruginosa*, le phénomène d'agglutination ne fut pas observé (culture bien dispersée) chez le variant S1. De plus, à cette température, le phénotype de S1 sur géloses était identique à L, autant pour la forme et dimension des colonies que pour les trois types de motilité («swimming», «twitching» et «swarming»)². Cependant, le génotype S1 n'était pas perdu chez ce variant car une colonie S1 présentant un phénotype L (à 43°C) repiquée à 35°C retrouva toutes les caractéristiques de son phénotype, démontrant que le changement de température de croissance n'induit pas une réversion.

Nous avons également observé que le variant S2 cultivé à 43°C montrait le même phénotype que le variant S1 à 35°C, c.-à-d. formation de plus petites colonies, des zones de «swimming» et de «swarming» réduites, avec une zone d'adhérence sur le polystyrène en forme de beignet (Fig. 3.4). Finalement, à 21°C, le variant S1 a gardé le même

² Les expressions motilité par nage ou natatoire pourraient être proposées pour le «swimming», motilité saccadée ou par secousses pour le «twitching» et motilité par essaimage ou par fourmillement pour le «swarming».

phénotype qu'à 35°C alors que S2 retrouvait une fois de plus le phénotype manifesté à 43°C.

Ces résultats indiquent que la variation phénotypique chez *P. aeruginosa* 57RP est sensible à la température d'incubation et que le mécanisme contrôlant la variation phénotypique est probablement thermorégulé. D'autres études seront nécessaires afin d'élucider le processus de transition entre les phénotypes L et S.

CHAPITRE 4. MÉCANISMES MICROBIENS IMPLIQUÉS DANS LA BIODÉGRADATION

4.1. INTRODUCTION

La biodégradation des HAP et plusieurs autres polluants persistants est principalement limitée par leur faible biodisponibilité et non par l'absence dans l'environnement de micro-organismes possédant le potentiel catabolique adéquat (Bosma *et al.*, 1997; Harms et Bosma, 1997; Hughes *et al.*, 1997; Laor *et al.*, 1996; Luthy *et al.*, 1997; Pignatello et Xing, 1996; White et Alexander, 1996). Plusieurs méthodes ont été employées afin d'accroître la biodisponibilité des contaminants hydrophobes. Cependant, relativement peu d'études ont porté sur les adaptations physiologiques développées par les micro-organismes afin de leur permettre l'utilisation de substrats peu disponibles. En effet, des travaux récents ont démontré que certaines bactéries possèdent des capacités particulières pour accéder aux substrats sorbés et/ou insolubles alors que d'autres possédant le même potentiel catabolique n'auront pas accès au substrat (Bastiaens *et al.*, 2000; Calvillo et Alexander, 1996; Friedrich *et al.*, 2000; Guerin et Boyd, 1992; Tang *et al.*, 1998). Il est souvent suggéré que la production de biosurfactants et/ou une surface hydrophobe/adhérente puisse constituer les adaptations physiologiques de ces bactéries. Ces mécanismes ont été très bien caractérisés depuis la fin des années 1960 chez des bactéries et levures croissant sur les alcanes linéaires liquides.

Des recherches sont nécessaires afin de mieux comprendre les processus naturels à l'œuvre lors de la biodégradation des HAP et autres contaminants persistants, ce qui permettrait ainsi améliorer la performance des biotraitements.

Un mutant de *P. aeruginosa* spécifiquement inactivé dans la synthèse des rhamnolipides a été généré dans le but de déterminer l'importance de la production de biosurfactants dans l'assimilation des hydrocarbures hydrophobes.

4.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.2.1. Souches microbiennes

Les souches de *P. aeruginosa* ayant été utilisées au cours de ce projet de recherche avaient toutes été isolées auparavant pour leur capacité à produire des rhamnolipides lors de la croissance sur les HAP (Déziel, 1996; Déziel *et al.*, 1996). Notons qu'elles peuvent également employer les alcanes linéaires comme substrat. Des bactéries capables de dégrader autant les HAP que les alcanes ont été très rarement rapporté dans la littérature (Churchill *et al.*, 1999; Whyte *et al.*, 1997). Les souches ont été conservées à -70°C avec le glycérol (20% v/v) comme agent cryoprotecteur.

4.2.2. Cultures

Lors de chaque expérience, un nouvel aliquot des souches a été décongelé sur gélose TSA («Tryptic Soy Agar») et incubé à 30°C . La méthode standard pour la préparation des ensemencements a consisté à repiquer des colonies fraîches dans le bouillon LB (Luria-Bertani Broth) et les cultiver à 30°C et 200 rpm pendant 16 h.

Les milieux de sels minéraux utilisés ont été le Bushnell-Haas (Difco, Detroit, Mich.), conçu pour les tests de biodégradation des hydrocarbures (Bushnell et Haas, 1941) et le SW1/10F, conçu pour favoriser la production de rhamnolipides chez *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 1996; Siegmund et Wagner, 1991). Le Bushnell-Haas était filtré avec un papier analytique Whatman afin d'enlever le précipité ferrugineux toujours présent dans ce milieu (BHf). Le milieu Siegmund-Wagner modifié (SW1/10F) contient (g/L): KH_2PO_4 , 0,7; Na_2HPO_4 , 0,9; NaNO_3 , 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1; et $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001. Le milieu Bushnell-Haas (BHf) est composé de (g/L): KH_2PO_4 , 1,0; K_2HPO_4 , 1,0; NH_4NO_3 , 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; FeCl_3 , 0,05; et $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02.

Les alcanes ont été ajoutés sous forme liquide aux milieux de cultures avant la stérilisation par autoclavage (121°C , 20 min). Par conséquent, les quantités ajoutées aux cultures sont toujours décrites en v/v, même si l'alcane en question était à l'état solide à

la température d'incubation. Les HAP ont été ajoutés aux milieux de culture stérile sous forme d'une solution préparée dans l'acétone. Le solvant était ensuite volatilisé pendant 24 h sous agitation avant l'ensemencement. Tous les hydrocarbures provenaient de Sigma ou Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI). Toutes les cultures ont été effectuées dans des flacons de type «Erlenmeyer», incubées en général à 25-30°C dans l'obscurité, sous agitation rotative (150-200 rpm).

Toutes les expériences ont été effectuées en duplicatas ou triplicatas; les exceptions sont indiquées dans le texte. Les valeurs rapportées représentent les moyennes arithmétiques et les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

4.2.3. Construction d'un mutant non-producteur de rhamnolipides.

Le premier objectif des travaux de ce doctorat consistait à évaluer l'importance de la production de rhamnolipides chez une souche de *P. aeruginosa* capable de croître sur des HAP. Nous avons commencé par créer et sélectionner un mutant spécifiquement inactivé dans sa capacité à synthétiser ces glycolipides. Une mutagenèse insertionnelle a été effectuée par recombinaison homologue résultant de l'insertion d'un gène conférant la résistance à l'antibiotique kanamycine à l'intérieur de la séquence codante du gène *rhlA*. Puisque les gènes *rhlA* et *rhlB* forment un opéron, l'inactivation du premier assure l'élimination de l'expression du second. Un tel mutant ne produira donc pas de rhamnolipides car *rhlB* code pour la rhamnosyltransférase I, l'enzyme responsable de la synthèse des mono-rhamnolipides, qui sont précurseurs des di-rhamnolipides (voir sections 2.6.2.1 et 5.2).

Afin de choisir la souche à muter, nous avons comparé la sensibilité à la kanamycine de 16 de nos souches de *P. aeruginosa*. La souche 57RP, la moins résistante à la kanamycine, a été choisie pour la suite des expériences. L'inactivation de *rhlA* par mutagenèse par insertion est décrite à la section 5.3.2.1. La sélection pour des mutants Kan^r et la contre-sélection envers la bactérie donatrice *E. coli* S17-1 *λpir* a été effectuée

sur géloses SW Bleue + kanamycine (300 mg/L). Cette gélose a permis d'éliminer les *P. aeruginosa* n'ayant pas acquis la résistance à l'antibiotique de sélection, tandis que la présence de cétrimide (bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium) a empêché la croissance de *E. coli*. Finalement, cette gélose a permis de détecter la production de rhamnolipides par l'apparition d'un halo bleu foncé autour des colonies (Siegmund et Wagner, 1991). Cent-seize colonies ne formant pas de halo ont été repiquées sur TSA + kanamycine (400 mg/L) pour vérifier si elles étaient affectées dans leur niveau de croissance, puis 98 transconjugants potentiels ont été transférés sur géloses SW Bleu + kanamycine (300 mg/L). Les 35 transconjugants présentant une bonne croissance et ne formant aucun halo ont ensuite été cultivés en milieu liquide SW1/2F + mannitol 2% + kanamycine (400 mg/L). Finalement, 4 transconjugants ne produisant aucune mousse et un DCT négatif (voir 4.2.7) tout en atteignant une DO_{600} normale (>2) ont été obtenus : 57RP-98, -103, -108, et -121. Le mutant 57RP-98 a été choisi pour la suite des expériences.

4.2.4. Évaluation de la biomasse bactérienne par mesure des protéines totales.

Les protéines ont été libérées de la biomasse bactérienne par chauffage à 70°C pendant 30-60 min dans NaOH 0,1N. La concentration de protéines dissoutes a été ensuite évaluée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) avec la trousse commerciale de Bio-Rad (Hercules, CA). Une courbe étalon préparée avec de l'albumine sérique bovine (BSA) a été utilisée pour la quantification.

4.2.5. Procédure de séparation des cellules attachées aux hydrocarbures

Afin de détacher la biomasse adhérant à la phase liquide hydrophobe, 200 µl d'une solution 100 : 100 : 8 d'acétone/éthanol/chloroforme (Jimenez et Bartha, 1996) a été ajouté à un échantillon de 1 ml de culture puis le tube a été vortexé 10 s. Les cellules ont été ensuite séparées par centrifugation (16000 x g, 2 min) et 1 ml de surnageant a été

retiré pour d'autres analyses. Pour évaluer la croissance par la mesure des protéines totales, nous avons ajouté 500 µl H₂O et 300 µl NaOH 1 N au culot cellulaire, suivi d'un bref mélange par vortex et d'une incubation à 70°C pour 30 min pour dissoudre les protéines.

4.2.6. Suivi de la dégradation par minéralisation d'un substrat radioactif

La procédure générale a consisté à suivre la formation de ¹⁴CO₂ résultant de la biodégradation d'un substrat marqué au ¹⁴C. Les cultures ont été effectuées dans des bouteilles sérologiques de 100 ml contenant le milieu de culture approprié et bouchées hermétiquement. Une solution d'hexadécane dont le carbone en position C1 est radioactif (¹⁴C) a été préparée en mélangeant avec de l'hexadécane non-marqué. La quantité de substrat marqué ajoutée par bouteille correspondait à environ 10⁵ désintégrations par minute (DPM). Chaque bouteille contenait une trappe à CO₂ constituée d'une éprouvette (12 x 75 mm) contenant 1 ml de KOH 1N. Les bouteilles ont été ensuite scellées hermétiquement à l'aide d'un bouchon recouvert d'une couche de Téflon,ensemencées, et incubées aux vitesses d'agitation et température appropriées. À des intervalles de temps réguliers, le KOH de la trappe a été remplacé par du KOH frais. La radioactivité du KOH prélevé a été ensuite déterminée avec un compteur à scintillation (modèle 3375, Packard Instruments) après ajout de 8 ml de liquide à scintillation (Ultima Gold XR, Packard Instruments, Meriden, CT). Les valeurs cumulatives en DPM ont été converties en % de minéralisation.

4.2.7. Détection et dosage des rhamnolipides

Le test d'étalement d'une goutte («Drop Collapsing Test» (DCT)) a été employé afin de détecter la présence de rhamnolipides dans les cultures (Jain *et al.*, 1991). Cette technique consiste à déposer 150 µl de surnageant à tester sur un couvercle de microplaquette en polystyrène recouvert d'un mince film d'hexadécane. La présence de biosurfactants à une concentration proche de la CMC provoque une réduction significative de la tension

superficielle et ainsi l'étalement de la goutte. Le dosage des rhamnolipides extracellulaires a été effectué par quantification de la portion du L-rhamnose grâce à la méthode colorimétrique à l'orcinol (Chandrasekaran et BeMiller, 1980). La concentration de rhamnolipides est rapportée en équivalence de rhamnose et obtenue grâce à une courbe étalon préparée avec du rhamnose. La procédure détaillée a été décrite précédemment (Déziel, 1996).

4.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.3.1. Contribution des biosurfactants à la biodégradation des hydrocarbures aliphatiques et polyaromatiques

L'inactivation spécifique du gène *rhlA* de *P. aeruginosa* 57RP a permis d'étudier l'importance de la capacité à synthétiser des rhamnolipides pour la croissance sur des substrats faiblement hydro-solubles.

4.3.1.1. Alcanes linéaires liquides ou solides

Nous avons commencé par comparer la croissance de la souche 57RP à la souche 57RP-98 (mutant non-producteur de rhamnolipides) lors de cultures avec un alcane linéaire à l'état liquide, l'hexadécane (C₁₆). Un départ plus rapide de la croissance exponentielle de 57RP que de 57RP-98 a été constaté. Cependant, il a été extrêmement difficile d'obtenir des données quantitatives fiables de duplicatas ou triplicatas pour produire des courbes de croissance représentatives. Un point faible de la méthode de suivi de la croissance par densité optique a été très tôt noté : l'aggrégation et l'adhérence supérieure du mutant *rhlA* au substrat insoluble. Ceci avait pour résultat que les densités optiques des cultures de 57RP-98 ne reflétait pas la croissance réelle. Une observation plus poussée des cultures par microscopie optique a montré que l'hexadécane dans les flaconsensemencés avec 57RP formait une fine émulsion, alors que dans les cultures de 57RP-98 la plupart des cellules se trouvaient sous formes d'agrégats, entourant de larges gouttes d'hexadécane.

Une des avenues étudiées pour régler cette source d'erreur a consistée à homogénéiser les cultures avant les échantillonnages, par une agitation vigoureuse, et séparer la biomasse attachée par un lavage avec un mélange de solvants (voir section 3.2.5). La croissance était ensuite estimée par la quantification des protéines totales contenues dans l'échantillon. Un exemple de résultats obtenus par cette procédure est présenté à la Fig. 4.1. La souche d'origine et le mutant *rhlA* ont été comparée dans le milieu BHf. Malgré la croissance plus rapide de la souche d'origine, une phase de latence d'une durée variable a toujours été observée dans les cultures où un *n*-alcane liquide étaient la source de carbone et d'énergie.

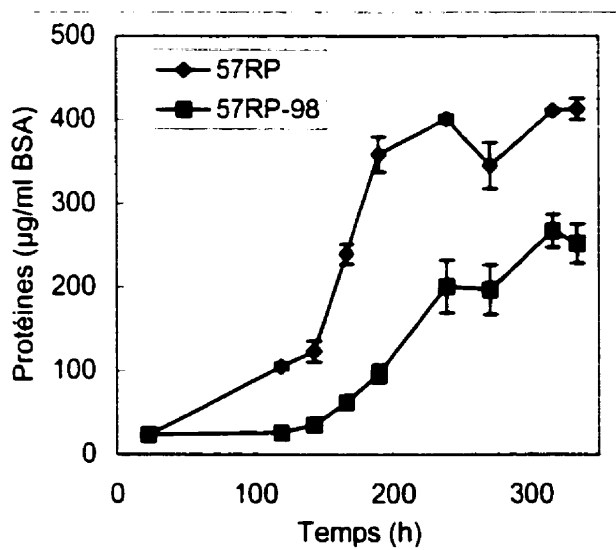


Figure 4.1 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane.

Chaque flacon de 250 ml contenait 40 ml BHf et 1,0% (v/v) d'hexadécane. Incubation à 30°C et 150 rpm.

Ce résultat semblait conforter l'importance de l'habileté à synthétiser des rhamnolipides pour la croissance sur l'hexadécane, mais un doute persistait car les cultures de 57RP-98 étaient très floculantes (agglutination des cellules) et les bactéries virtuellement

impossibles à disperser complètement. Comme méthode alternative, nous avons suivi la croissance bactérienne sur l'hexadécane par l'analyse du contenu protéique total des flacons (Fig. 4.2). Nous avons observé une meilleure croissance, quoique faible, de 57RP relativement à 57RP-98.

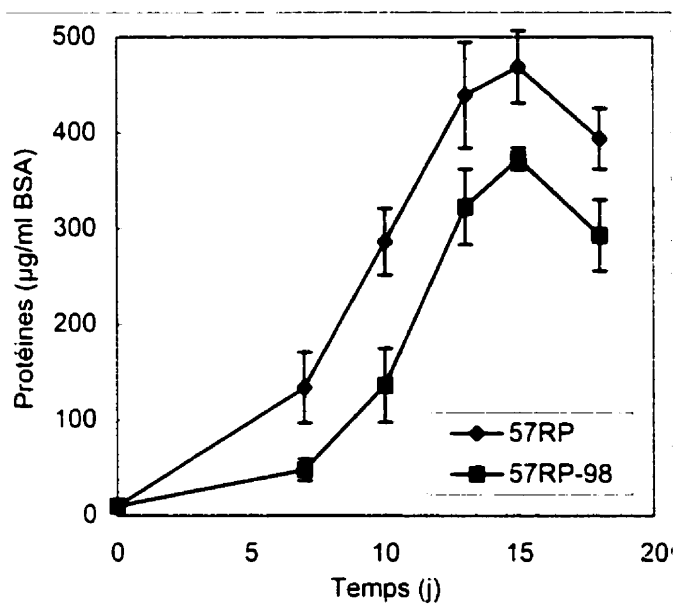


Figure 4.2 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane

Chaque flacon de 125 ml contenait 20 ml BHf et 1,0% (v/v) d'hexadécane. Incubation à 26°C et 150 rpm. Chaque point correspond à la moyenne des protéines totales contenues dans trois flacons.

Afin de vérifier avec plus de certitude que 57RP démontre une meilleure croissance que son mutant *rhlA*, nous avons étudié la minéralisation de l'hexadécane marqué au ^{14}C . L'expérience a été répétée trois fois, et un résultat représentatif est présenté à la Fig. 4.3. Le profil de la courbe de minéralisation est similaire à celui de la courbe de croissance de l'expérience précédente, ce qui confirme que le mutant incapable de synthétiser les rhamnolipides est relativement peu désavantagé pour la croissance sur l'hexadécane.

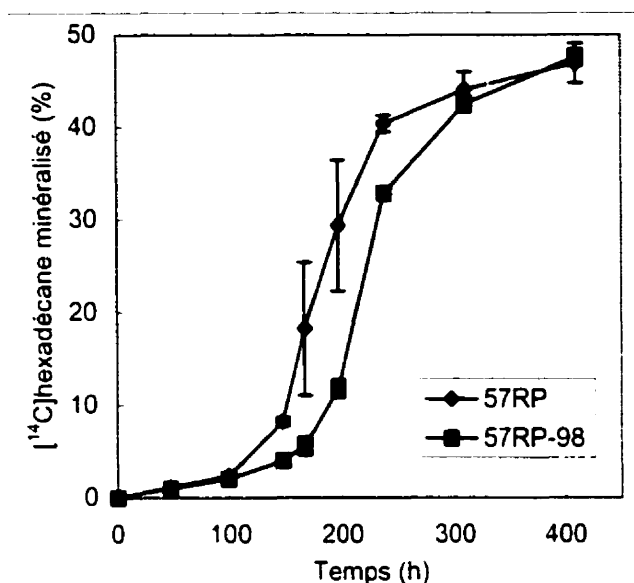


Figure 4.3 Minéralisation de l'hexadécane par les souches 57RP et 57RP-98 en cultures liquides.

Chaque bouteille sérologique de 100 ml contenait 10 ml BHf et 0,05% (v/v) d'hexadécane. Incubation à 30°C et 150 rpm.

Les variants S de la souche 57RP ont été initialement isolés de cultures sur l'hexadécane (Déziel *et al.*, 2001). La Fig. 4.4 démontre par une expérience de minéralisation essentiellement identique à celle rapportée à la Fig. 4.3 que ces variants phénotypiques initient plus rapidement la croissance sur les substrats insolubles liquides, tel l'hexadécane. On constate que la période de latence a été nettement raccourcie (d'environ 150 h à moins de 50 h) et que le taux de minéralisation maximal a été plus élevé (1,13 %/h) que lors de l'ensemencement avec les variants L (de 0,50 %/h). Toutefois, la différence entre la souche d'origine et le mutant *rhL4* reste relativement minime.

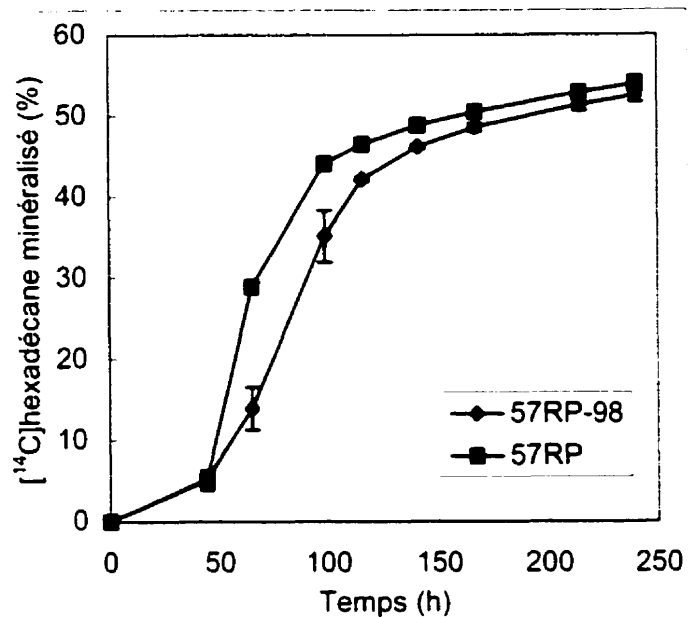


Figure 4.4 Minéralisation de l'hexadécane par les variants S1 des souches 57RP et 57RP-98 en cultures liquides.

Chaque bouteille sérologique de 100 ml contenait 14 ml BHf et 0,05% (v/v) d'hexadécane. Incubation à 30°C et 150 rpm.

Afin de confirmer que la croissance supérieure de 57RP n'a pas lieu uniquement sur l'hexadécane mais aussi sur d'autres alcanes linéaires, nous avons comparé la croissance de 57RP et 57RP-98 sur l'écicosane liquide (C_{20}). La Fig. 4.5 démontre que le mutant *rhlA* était nettement désavantagé dans ces conditions de culture.

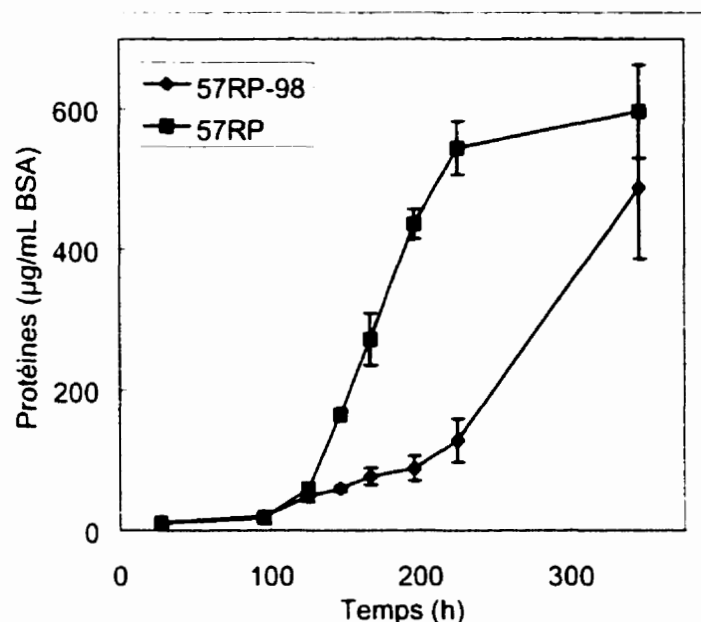


Figure 4.5 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'écicosane liquide.

Chaque flacon de 250 ml contenait 50 ml BHf et 0,5% (v/v) d'écicosane. Incubation à 37°C et 150 rpm.

Nous avons ensuite comparé les taux de croissance de la souche d'origine et du mutant *rhlA* sur l'écicosane à l'état solide, c.-à-d. à une température d'incubation plus près de celle habituellement employée pour les tests de biodégradation. La Fig. 4.6 montre que la période de latence a été presque complètement éliminée, en comparaison avec les cultures sur les alcanes liquides. De plus, la croissance de 57RP et 57RP-98 a été égale, suggérant que la capacité de synthétiser les rhamnolipides ne confère pas d'avantage lors de la croissance sur les substrats insolubles solides.

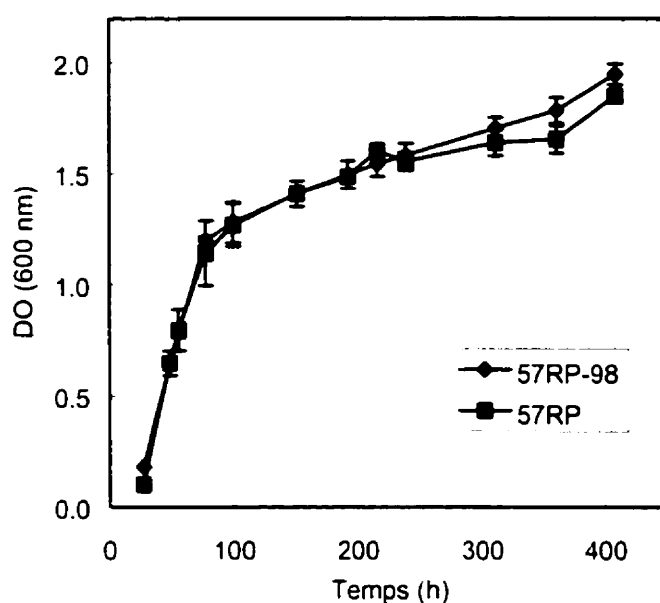


Figure 4.6 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'écicosane solide.

Chaque flacon de 250 ml contenait 40 ml BHf et 0,5% (v/v) d'écicosane. Incubation à 26°C et 150 rpm.

Afin de confirmer cette observation, nous avons comparé la minéralisation d'un autre alcane à l'état solide, l'octadécane. La Fig. 4.7 démontre que les taux de biodégradation d'un alcane linéaire à l'état solide sont identiques entre la souche 57RP et le mutant *rhlA*. On constate que les taux de minéralisation sont très lents, ce qui suggère que la biodégradation des alcanes solide est plus lente que celle des alcanes liquides. En effet, autant la croissance (Fig. 4.6) que la minéralisation (Fig. 4.7) présentent des courbes linéaires, alors que la croissance et la biodégradation des alcanes liquides semblaient présenter une tendance exponentielle.

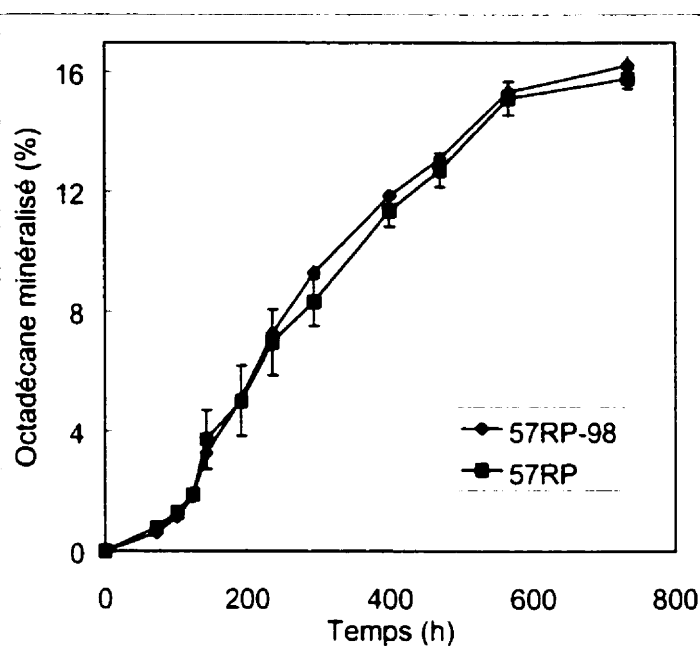


Figure 4.7 Minéralisation de l'octadécane solide par les souches 57RP et 57RP-98 en cultures liquides.

Chaque bouteille sérologique de 100 ml contenait 10 ml BHf et 0,1% (v/v) d'octadécane. Incubation à 26°C et 150 rpm.

Ces résultats suggèrent que la capacité à synthétiser des rhamnolipides favorise la croissance sur les alcanes en phase liquide, et que l'état physique du substrat (solide ou liquide) détermine la présence ou l'absence d'une phase de latence.

Malgré une meilleure croissance de la souche 57RP sur les alcanes liquides, la présence de rhamnolipides n'a jamais pu être détectée dans les cultures effectuées dans le milieu minéral BHf. Ceci suggère que l'avantage conféré par l'aptitude à synthétiser des rhamnolipides ne se situe pas au niveau de la solubilisation des alcanes ou de l'activité tensioactive. Cependant, la possibilité que les biosurfactants aient été synthétisés sans être excrétés ne peut être exclue.

À la suite de cette constatation, quelques expériences ont été effectuées dans le SW1/10F, un milieu minéral spécifiquement conçu pour favoriser la production des rhamnolipides.

Dans ces conditions, la phase de latence avant le début de la croissance sur l'hexadécane était encore présente et l'avantage de 57RP sur 57RP-98 n'était pas plus prononcé que dans le BHf (Fig. 4.8).

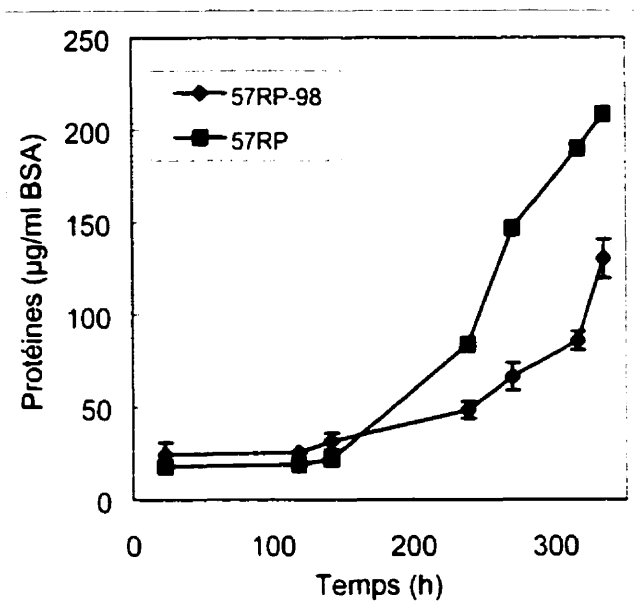


Figure 4.8 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane.

Chaque flacon de 250 ml contenait 40 ml SW1/10F et 1,0% (v/v) d'hexadécane. Incubation à 30°C et 150 rpm.

Cependant, la Fig. 4.9a démontre que dans le milieu SW1/10F la croissance du mutant *rhlA* sur un alcane solide (dans le cas montré ici, l'octadécane) a été significativement ralentie, au contraire de ce qui était observé dans le BHf. La concentration des rhamnolipides dans chacune des cultures de 57RP est montrée indépendamment pour illustrer qu'ils n'étaient pas synchroniser, au contraire de leur croissance (Fig. 4.9b). Notons cependant que la concentration micellaire critique (CMC) des rhamnolipides se situe autour de 50 mg/L (Syldatk *et al.*, 1985) et si on applique le facteur de multiplication de 2,25 pour convertir les équivalents de rhamnose en rhamnolipides

(Déziel *et al.*, 2000), nous constatons que la CMC était atteinte presque tout au long. Il est donc possible que des micelles aient été présentes dans ces cultures de 57RP.

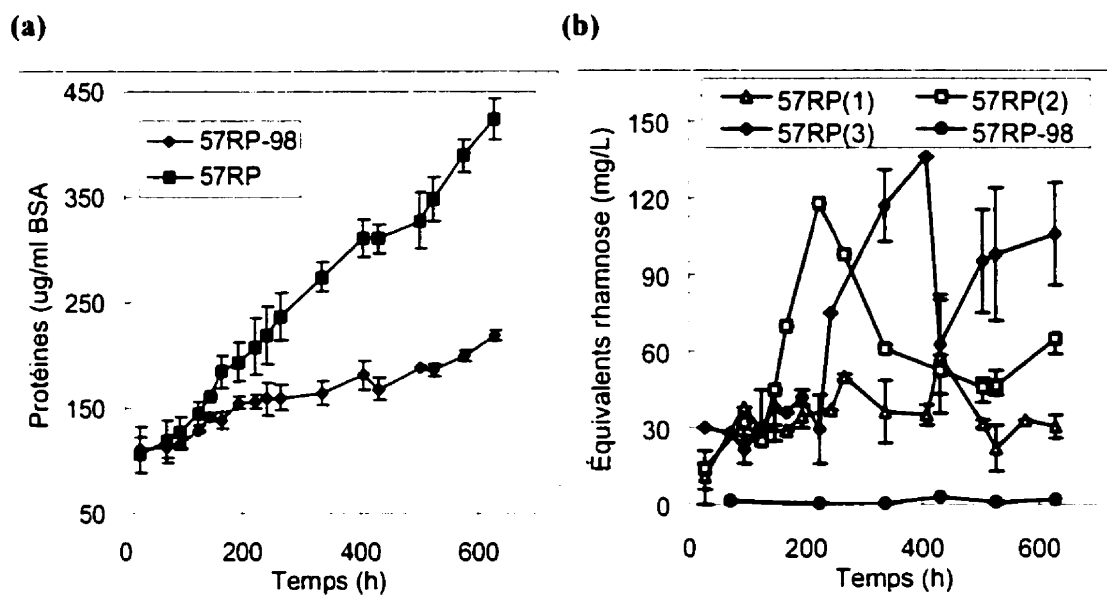


Figure 4.9 Comparaison de la croissance et de la production de rhamnolipides entre 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'octadécane solide.

(a) suivi de la croissance par mesure de la concentration des protéines cellulaires; (b) suivi de la production de rhamnolipides pour les trois cultures 57RP et une des cultures 57RP-98. Rhamnolipides exprimés en équivalents de rhamnose. Les flacons de 250 ml contenaient 50 ml SW1/10F et 0,5% v/v octadécane. Incubation à 25°C et 150 rpm.

Ce résultat dans des conditions favorisant l'excrétion de rhamnolipides a ensuite été confirmé par la minéralisation de l'octadécane solide. La Fig. 4.10 montre que la différence de croissance entre 57RP et 57RP-98 sur un *n*-alcanes à l'état solide semble avoir lieu au tout début de la culture, comme dans les expériences de minéralisation des de l'hexadécane.

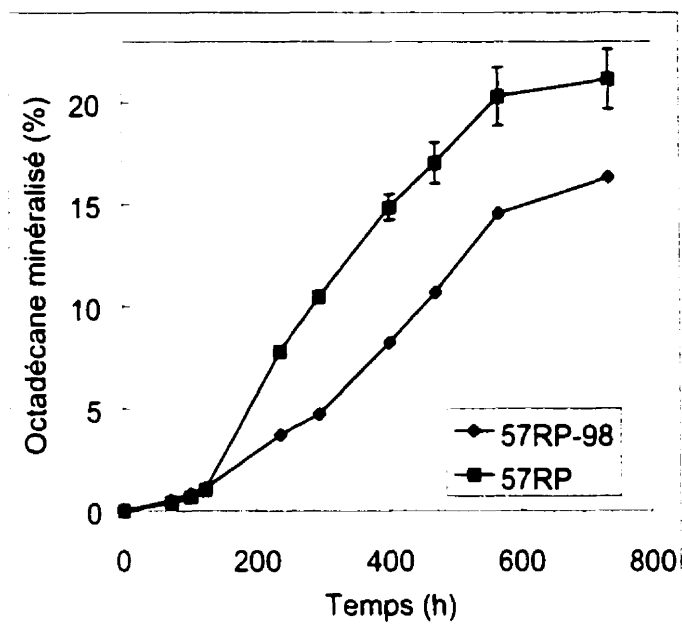


Figure 4.10 Minéralisation de l'octadécane solide par les souches 57RP et 57RP-98 en cultures liquides.

Chaque bouteille sérologique de 100 ml contenait 10 ml SW1/10F et 0,1% (v/v) d'octadécane. Incubation à 26°C et 150 rpm.

4.3.1.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Plusieurs expériences ayant pour but de comparer la croissance sur le naphthalène (2 cycles aromatiques, solubilité = 31 mg/L) ont été effectuées, mais aucune n'a démontré de différence significative entre 57RP et 57RP-98. Par exemple, favoriser la production de rhamnolipides n'a pas créer de différence détectable entre la croissance des deux souches (Fig. 4.11).

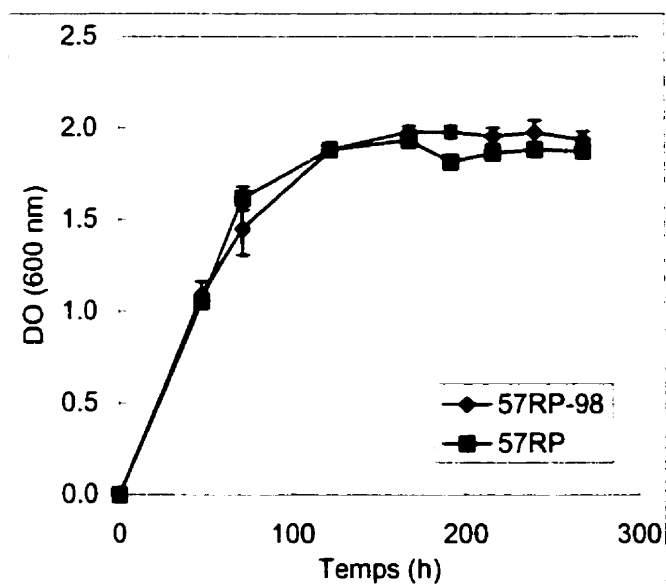


Figure 4.11 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec le naphtalène.

Les flacons de 500 ml contenaient 100 ml SW1/10F et 2% p/v de cristaux de naphtalène. Incubation à 25°C et 150 rpm dans l'obscurité.

La croissance très rapide observée suggérait que la biodégradation de cet HAP ajouté sous forme de fins cristaux était peu limitée par sa biodisponibilité. Afin de rendre le substrat moins accessible, la même expérience a été répétée avec le naphtalène ajouté sous forme d'une seule particule (une boule à mites) offrant par conséquent une surface d'échange et de contact considérablement réduite. Encore une fois, aucune différence de croissance n'a été mesurée entre 57RP et 57RP-98, quoique, cette fois-ci, la linéarité des courbes indique clairement des taux de croissance limités par la biodisponibilité (Fig. 4.12).

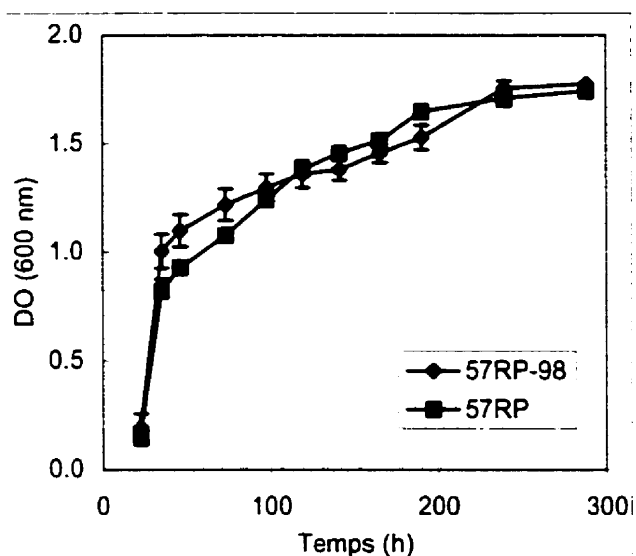


Figure 4.12 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec le naphthalène.

Les flacons de 250 ml contenaient 50 ml BHf et une boule à mites. Incubation à 25°C et 150 rpm. La boule à mites avait été stérilisée par un trempage de 30 s dans l'éther diéthylique avant d'être ajoutée au milieu de culture.

L'expérience suivante a consisté à comparer la croissance sur le phénanthrène, un HAP de 3 cycles aromatiques avec une solubilité de 1,3 mg/L. La Fig. 4.13 illustre une longue période de latence (environ deux semaines) avant le début de la croissance linéaire. Le phénanthrène n'induit que très faiblement la voie catabolique de dégradation des HAP chez la souche 57RP. Une dizaine de jours après le début de la croissance, une tendance statistiquement significative s'est dessinée, suggérant une meilleure croissance de la souche d'origine (Fig. 4.13).

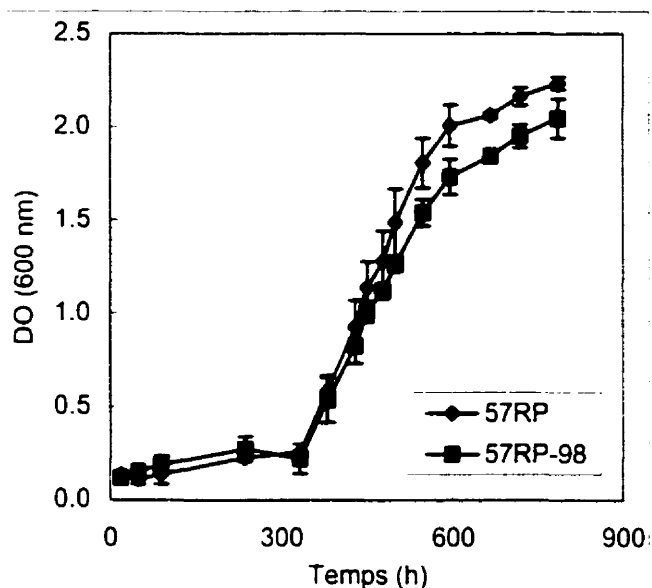


Figure 4.13 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec le phénanthrène.

Chaque flacon de 250 ml contenait 50 ml SW1/10F et 0,55 (p/v) de phénanthrène. Incubation à 25°C et 200 rpm.

Les résultats de cultures avec les HAP décrits jusqu'ici ont été obtenus avant la découverte des variants S et de l'importance de l'adhérence pour la dégradation des hydrocarbures, ce qui explique que les suivis de croissance ont été effectués par la densité optique des cultures. Une observation préliminaire suggérait néanmoins que les bactéries puissent adhérer à la surface des cristaux de HAP. L'expérience avec les boules à mites a été répétée plusieurs fois car la boule s'effritait parfois en fine poudre dans les culturesensemencées avec la souche d'origine (mais jamais avec le mutant *rhlA*). Nous avons utilisé le cristal violet afin de colorer la biomasse attachée à la surface des boules retirées des cultures. L'observation microscopique a démontré que les boules intactes provenant autant des culturesensemencées avec 57RP que 57RP-98 étaient recouvertes d'une couche plutôt homogène de bactéries, alors que les boules qui se désagrégeaient étaient moins bien colonisées. Cette observation a suggéré que la biomasse adhérente doit aussi être considérée lors de la détermination de la croissance.

Un suivi par l'analyse du contenu protéique total des flacons a été effectué, similaire à ce qui avait été fait à la Fig. 4.2. La croissance sur le phénanthrène a été comparée en analysant des cultures en quadruplicata après 3 et 7 jours de croissance dans le milieu BHf et dans le milieu SW1/10F. Dans le but d'éliminer la phase de latence, du salicylate de sodium a été ajouté aux cultures afin d'induire la voie catabolique. Tel que discuté à la section 2.4.1.1.2, le salicylate est l'inducteur de la voie de dégradation du naphthalène retrouvé sur les opérons *nah* et *sal*. Nous avons précédemment rapporté que le salicylate induisait également la biodégradation du phénanthrène chez la souche 57RP (Dagher *et al.*, 1997). Le résultat de cette expérience est présenté à la Fig. 4.14. Moins de deux jours après l'ensemencement des cultures, une teinte rouge orangé évidente est apparue, le signe de l'accumulation de sous-produits de biodégradation du phénanthrène dans le milieu extracellulaire. Plusieurs indices suggèrent que 57RP a bénéficiée de la production de rhamnolipides pour la croissance sur le phénanthrène. Premièrement, la comparaison de la croissance entre les deux milieux de culture montre que le niveau de croissance de 57RP-98 est le même dans les deux, alors que la croissance de 57RP est significativement plus forte dans le milieu favorisant la production de rhamnolipides. Deuxièmement, la comparaison de la croissance entre les deux souches suggère une tendance vers une meilleure croissance de 57RP que 57RP-98 dans le SW1/10F mais pas dans le BHf, et ce pour les deux temps d'échantillonnage. De plus, seul le DCT de la culture de 57RP dans le SW1/10F était positif. Des cristaux de phénanthrène récupérés dans les flacons ont été colorés avec l'Alcian bleu, un colorant permettant de révéler la présence de l'alginate, le polysaccharide formant la matrice des biofilms. L'observation microscopique a démontré que les bactéries colonisent en permanence la surface de leur substrat, quoique différemment pour chaque souche : 57RP recouvrait une grande portion des cristaux alors que 57RP-98 formait plutôt des agrégats auxquels des cristaux étaient attachés.

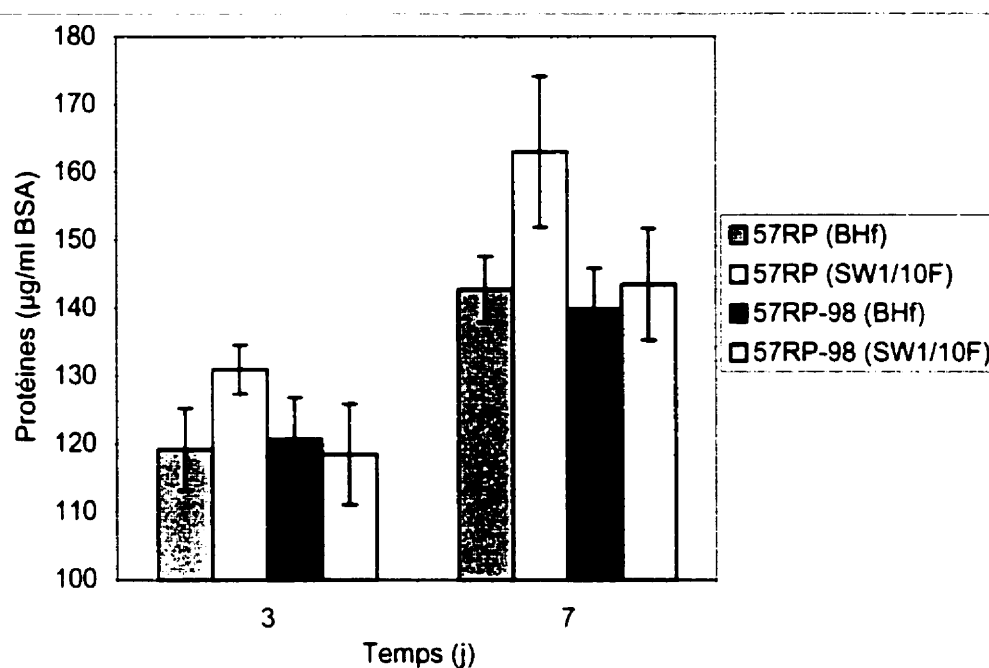


Figure 4.14 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec le phénanthrène.

Chaque flacon de 250 ml contenait 25 ml de milieu de culture BHf ou SW1/10F, 100 ppm de salicylate de sodium et 0,1 (p/v) de phénanthrène. Incubation à 30°C et 200 rpm.

4.3.2. Différences entre les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente

Comme mentionné au chapitre 3 (Déziel *et al.*, 2001), quelques-unes de nos autres souches de *P. aeruginosa*, en plus de 57RP, forment des variants de type S lors de cultures sur l'hexadécane. En fait, les souches étudiées semblaient se partager en deux classes : [1] celles à croissance rapide et [2] celles à croissance lente, ces dernières nécessitant une période de latence avant la croissance exponentielle sur les alcanes liquides, comme 57RP (résultats non-présentés). Un phénomène similaire a déjà été rapporté chez des souches de *P. aeruginosa* différentes (Zhang et Miller, 1995). Il est remarquable que seules les souches Lentes formaient des variants S lors de cultures sur les alcanes liquides. De plus, une comparaison de la vitesse de croissance sur l'écicosane à

30°C a confirmé que cette différence se manifestait aussi sur un alcane à l'état solide (Fig. 4.15). Bien qu'elle n'ait pas atteint une DO aussi élevée que les deux autres souches Rapides, le taux de croissance maximal de la souche 19SJV (entre 66 h et 110 h) indique que cela n'est attribuable qu'au ralentissement (inexpliqué) observé entre les temps 42 h et 66 h.

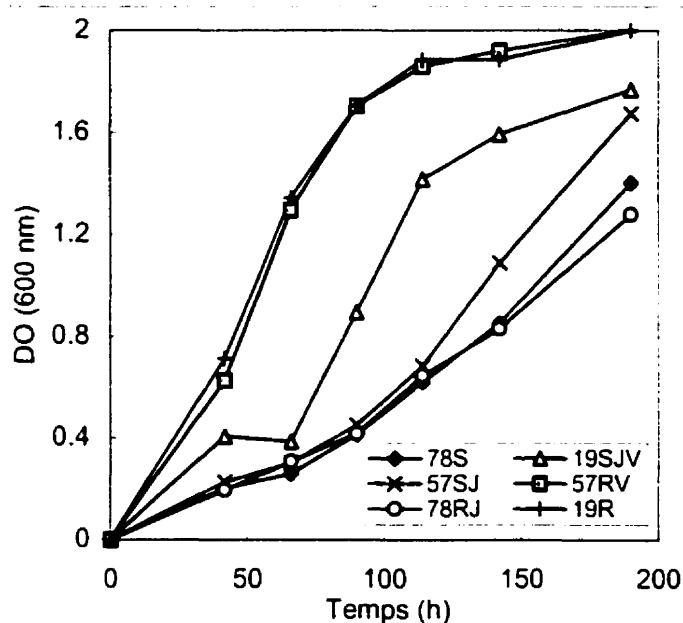


Figure 4.15 Comparaison de la croissance de quelques souches de *P. aeruginosa* en cultures liquides avec l'écicosane solide.

Chaque flacon de 50 ml contenait 10 ml BHf et 0,75% (v/v) d'écicosane. Incubation à 30°C et 200 rpm.

Sachant que les variants S sont plus hydrophobes/adhérents, nous avons vérifié si les souches Rapides ne seraient pas naturellement plus hydrophobes que les souches Lente. Dans ce but, le test MATH a été effectué sur trois souches Lentes (57RP, 78RJ et 57SJ) et trois souches Rapides (19R, 57RV et 19SJV). La Fig. 4.16 montre qu'une excellente corrélation existe entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire et le potentiel de croissance rapide sur l'hexadécane, les trois souches Rapides étant nettement plus hydrophobes.

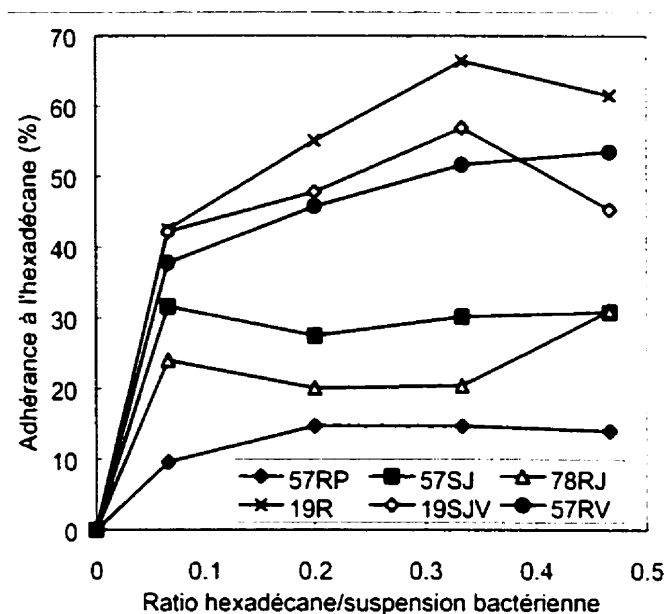


Figure 4.16 Évaluation de l'hydrophobicité de la surface externe de quelques souches de *P. aeruginosa* par le test MATH.

Souches Lentes : 57RP, 57SJ, 78RJ; souches Rapides : 19R, 57RV, 19SJV.

Ces résultats suggèrent que les souches Lentes soient désavantagées pour la croissance sur les substrats hydrophobes à cause de leur hydrophobicité de surface naturellement réduite. Ceci pourrait résulter en une période de latence liée au temps nécessaire pour que les variants S deviennent dominants dans la population lors de cultures sur substrats hydrophobes liquides. Cette hypothèse est appuyée par les observations suivantes : seules les souches Lentes forment des variants S, et l'émergence de ceux-ci coïncide avec le début de la croissance sur les alcanes liquides.

4.3.2.1. Aptitude des souches Rapides et Lentes à former un biofilm

Nous avons démontré que les variants S ont la caractéristique d'initier la formation de biofilms, et que cette aptitude est liée à leur hydrophobicité et leur adhérence (Déziel *et al.*, 2001). Puisque les souches Rapides sont aussi plus hydrophobes, nous avons émis

l'hypothèse qu'elles puissent se distinguer des souches Lentes par leur capacité à initier la formation d'un biofilm. Effectivement, une procédure identique à celle de la Figure 2.5 a confirmé que les souches Rapides établissent des biofilms contenant une plus grande quantité de biomasse que les souches Lentes (Fig. 4.17).

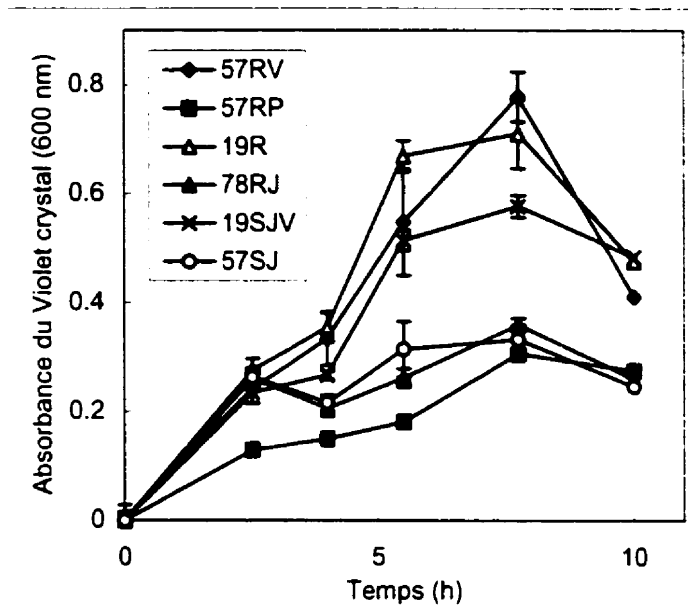


Figure 4.17 Cinétique de formation d'un biofilm sur le polystyrène par quelques souches de *P. aeruginosa*.

Souches Rapides : 57RV, 19R, 19SJV; **souches Lentes :** 57RP, 57SJ, 78RJ.

4.4. CONCLUSION

Au moment où nos travaux ont été entrepris, la seule information disponible dans la littérature scientifique montrant qu'un mutant spécifique de *P. aeruginosa* incapable de produire des rhamnolipides croissait plus lentement que la souche d'origine était un suivi par densité optique de cultures liquides avec l'hexadécane comme substrat (Ochsner *et al.*, 1994a). Or, nous avons observé que le mutant *rhlA* avait une tendance à former une biomasse agglutinante, ce qui fausse les évaluations de croissance par DO, pour les cultures sur alcanes liquides surtout.

Malgré que quelques-uns des résultats rapportés dans ce chapitre ne soient que préliminaires, certaines expériences n'ayant été effectuées qu'une seule fois, plusieurs conclusions peuvent être tirées.

Il est clair que la présence de l'opéron *rhlAB* intact favorise, quoique faiblement, la croissance de *P. aeruginosa* sur les alcanes linéaires à l'état liquide. D'autres ont récemment tiré la même conclusion (Beal et Betts, 2000). La présence de rhamnolipides extracellulaires ne semble toutefois pas nécessaire.

Une phase de latence d'une durée variable (en général entre 4 à 8 jours) a toujours été observée avant le début de la croissance significative sur les alcanes liquides. Le même phénomène a déjà été rapporté avec *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Miguez *et al.*, 1986; Zhang et Miller, 1995). Ce délai n'est pas attribuable à un besoin d'induction de la voie catabolique car la croissance sur le même *n*-alcane à l'état solide ne sera pas affectée par cette période de latence. Nos résultats démontrent que la fin de cette dernière coïncide avec l'émergence de variants phénotypiques de type S très adhérents et vraisemblablement spécialisés dans la formation de biofilms. Ces formes phénotypiques alternatives de 57RP croissent rapidement sur les alcanes liquides sans phase de latence. Il est probable que l'émergence de ces variants soit nécessaire à la croissance de la souche 57RP sur les alcanes liquides. Les variants S n'ont été détectés que lorsque le substrat était un liquide hydrophobe. La période de latence dans les cultures sur alcanes liquides est donc vraisemblablement attribuable au temps nécessaire pour que la faible proportion de variants S présents dans l'inoculum de départ prennent le dessus sur les variants L dans la population.

Dans les conditions de culture où une différence avait été observée sur les alcanes liquides, la croissance sur les substrats solides tels que les *n*-alcanes en dessous du point de fusion et HAP n'a pas été affectée par l'inactivation de *rhlA*. De plus, aucune phase de

latence n'a été observée. Ceci pourrait s'expliquer par l'observation que l'émergence de variants S n'est apparemment pas nécessaire pour la croissance sur les hydrocarbures solides. Des cultures sur le naphthalène des formes L et S de 57RP et 57RP-98 n'ont montré aucune différence dans les niveaux de croissance (résultats non-présentés). Cependant, les résultats obtenus avec un milieu de culture favorisant la production de rhamnolipides suggèrent que la présence de rhamnolipides dans le surnageant puisse promouvoir la croissance sur l'octadécane et le phénanthrène.

Une comparaison de la croissance sur les *n*-alcane entre plusieurs souches de *P. aeruginosa* a démontré que certaines possèdent naturellement un phénotype particulier leur permettant d'utiliser plus rapidement ces substrats hydrophobes. Les tests ont confirmé que, à l'image des variants S de la souche 57RP, ces souches Rapides possèdent une surface externe hydrophobe et sont particulièrement efficaces dans la formation d'un biofilm. De plus, au contraire des souches Lentes, elles ne présentent pas de phase de latence et ne nécessitent pas l'émergence de variants S. La raison pour ces différences phénotypiques entre divers souches de *P. aeruginosa* est inconnue mais doit être reliée à des variations dans la composition de la surface cellulaire (ex. LPS) ou des structures extracellulaires (ex. pili).

En résumé, nos résultats indiquent que la croissance de *P. aeruginosa* sur les alcanes linéaires liquides nécessite la capacité à former un biofilm. De plus, la croissance légèrement ralentie du mutant *rhlA* suggère que les rhamnolipides jouent un rôle dans ce processus. Cette dernière hypothèse est explorée au chapitre 5. Pour ce qui est des substrats hydrocarbures solides, d'autres expériences sont nécessaires afin de pouvoir conclure sur la nécessité de former un biofilm et le rôle des rhamnolipides. Cependant, nos résultats suggèrent que la croissance en suspension et acquisition des molécules dissoutes serait le mode privilégié par 57RP. Cette hypothèse est appuyée par les tendances à une croissance linéaire et l'absence d'apparition de variants S. Cette question sera discutée au chapitre 7.

CHAPITRE 5. BIOSURFACTANTS DE *P. AERUGINOSA*

5.1. MISE EN CONTEXTE

Tel que discuté dans les deux chapitres précédents, l'émergence de variants phénotypiques de type S est directement reliée à l'essor de la croissance de *P. aeruginosa* 57RP sur les alcanes linéaires liquides. Puisque les variants S constituent un phénotype initiant la formation de biofilms, on peut déduire que le développement d'un biofilm soit nécessaire pour la croissance de cette souche sur les alcanes liquides. Nous avons également observé que lorsque le mutant 57RP-98 (*rhlA*⁻) était cultivé sur l'hexadécane, la biomasse se retrouvait associée de façon persistante aux gouttelettes de substrat non-miscibles, alors que 57RP finissait par se détacher. Ces observations ont donc suggéré que les rhamnolipides puissent jouer un rôle dans le détachement et/ou la dispersion des cellules d'un biofilm. Cette hypothèse a été explorée par Anna-Maria Donetti, étudiante sous la direction du Dr Richard Villemur (INRS-Institut Armand-Frappier), dans le cadre de son projet de maîtrise (Donetti, 2000).

En avril 2000, un article est paru décrivant, pour la première fois chez *P. aeruginosa*, la capacité à coloniser rapidement la surface d'une gélose grâce à la motilité par «swarming» (Rashid et Kornberg, 2000). Or, *Serratia marcescens* peut également se mouvoir par «swarming» et cela nécessite la production d'un biosurfactant, la serrawettine (Matsuyama *et al.*, 1992; Matsuyama *et al.*, 1986). Nous avons donc émis l'hypothèse que la production de rhamnolipides soit nécessaire au «swarming» chez *P. aeruginosa*, en comparant 57RP au mutant *rhlA* 57RP-98. Cette hypothèse a été rapidement confirmée. Cependant, un article a été publié en novembre 2000 dans lequel les auteurs rapportaient qu'un mutant *rhlA* était incapable de «swarming» et, par conséquent, ils concluaient que la production de rhamnolipides est essentielle à ce type motilité (Köhler *et al.*, 2000).

Des travaux supplémentaires effectués en collaboration avec le Dr François Lépine (INRS-Institut Armand-Frappier) ont toutefois permis de démontrer que *RhlA* n'est pas

une sous-unité de la rhamnosyltransférase I comme généralement considéré (Maier et Soberón-Chávez, 2000; Ochsner *et al.*, 1994a), mais est plutôt impliqué dans la synthèse de la portion lipidique des rhamnolipides. De plus, nous avons déterminé que l'excrétion de ces acides gras libres par la bactérie est suffisante pour permettre le «swarming» chez *P. aeruginosa*, et que la production de rhamnolipides n'est donc pas nécessaire.

L'article #2 a été soumis pour publication dans *Biochimica et Biophysica Acta* en juillet 2001. Nous y démontrons que le gène *rhlA* code pour une enzyme nécessaire pour la synthèse du dimère lipidique précurseur des rhamnolipides, et qu'une partie de ces acides gras est excrétée dans le milieu extracellulaire.

L'article #3 (section 5.3) a été soumis pour publication dans *Microbiology* en mai 2001. Nous y rapportons que la mixture de dimères lipidiques excrétée en plus des rhamnolipides par *P. aeruginosa* possède des propriétés tensioactives. Elle peut donc être considérée comme un biosurfactant auquel nous avons attribué le nom d'aeruwettine. Nous montrons que les deux classes de biosurfactants excrétés par *P. aeruginosa* contribuent à la motilité de type «swarming», ainsi qu'au détachement et à la dispersion des cellules faisant partie de biofilms formés en conditions statiques et dynamiques.

5.2. ARTICLE #2 : THE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* *RHLA* GENE IS INVOLVED IN SYNTHESIS OF THE 3-HYDROXYACYL-3-HYDROXYACID MOIETY OF RHAMNOLIPIDS

Authors

Eric Déziel, François Lépine*, Sylvain Milot and Richard Villemur

INRS-Institut Armand-Frappier-Microbiologie et Biotechnologie
Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

*Corresponding author. Mailing address: Centre de Microbiologie et Biotechnologie, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. Tel: (450) 687-5010. Fax: (450) 686-5501. E-mail: francois.lepine@inrs-iaf.quebec.ca.

5.2.1. Abstract

Pseudomonas aeruginosa excretes rhamnolipids. The *rhlAB* operon encodes the rhamnosyltransferase I which catalyses the transfer of TDP-L-rhamnose to 3-hydroxyacyl-3-hydroxyacid (HHA). RhlB is the actual catalytic subunit of the rhamnosyltransferase but the function of RhlA has not been determined. We had previously detected free HHAs in the supernatant of *P. aeruginosa* cultures. Using liquid chromatography/mass spectrometry, we monitored the production of rhamnolipids and free HHAs by the wild-type strain *P. aeruginosa* PG201, the *rhlA* mutant UO299 and the *rhlB* mutant UO287. No HHAs were detected in the supernatant of UO299, whereas UO287 produced an elevated concentration of HHAs, indicating that the RhlA protein is involved in HHA biosynthesis. Rhamnolipids were released by wild-type cells as soon as they were synthesized but HHA accumulation was delayed and slower. Rhamnosyltransferase I prefers to glycosylate longer chain and saturated HHAs, leaving a HHA pool enriched in shorter chain and unsaturated congeners which are then released in the extracellular milieu. Proposed functions for RhlA in rhamnolipid synthesis are discussed and a thioesterase activity is postulated.

5.2.2. Introduction

Pseudomonas aeruginosa produces extracellular glycolipids composed of L-rhamnose and 3-hydroxyalkanoic acid (rhamnolipids) (Hauser et Karnovsky, 1957; Jarvis et Johnson, 1949). Although their exact physiological function is undetermined, these amphiphilic molecules are usually considered as biosurfactants, acting as solubilising agents promoting the uptake of hydrophobic substrates, especially *n*-alkanes (Beal et Betts, 2000; Itoh *et al.*, 1971). Moreover, rhamnolipids are virulence factors found in high concentrations in sputa of *P. aeruginosa*-colonised cystic fibrosis patients (Kownatzki *et al.*, 1987). They have been shown to interfere with the normal tracheal ciliary function (Read *et al.*, 1992), to inhibit the phagocytic response of macrophages

(McClure et Schiller, 1996), and act as heat-stable extracellular hemolysins (Johnson et Boese-Marrazzo, 1980).

Rhamnolipids are produced in liquid cultures as a complex mixture of congeners containing one or two 3-hydroxy fatty acids of various length, linked to a mono- or di-rhamnose moiety (Déziel *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 2000). In general, the two more abundant rhamnolipids are L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate and L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate (Lang et Wullbrandt, 1999). According to the biosynthetic pathway proposed by Burger *et al.* (1963), rhamnolipid synthesis proceeds by two sequential glycosyl transfer reactions, each catalysed by a different rhamnosyltransferase. The *rhlAB* genes encoding the first rhamnosyltransferase, which catalyses the transfer of TDP-L-rhamnose to 3-hydroxyacyl-3-hydroxyacid (HAA), have been characterised (Ochsner *et al.*, 1994a). Both genes are essential for rhamnolipid synthesis but, whereas *rhlB* is known to encode the catalytic subunit of the rhamnosyltransferase, the function of *rhlA* is still unknown. Expression of the *rhlAB* operon and rhamnolipid production is regulated by quorum sensing (Ochsner *et al.*, 1994b; Ochsner et Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1997) and environmental factors, especially the nutritional conditions (Guerra-Santos *et al.*, 1986). The second rhamnosyltransferase, encoded by *rhlC*, was recently characterised and its expression shown to be co-ordinately regulated with *rhlAB* by the same quorum-sensing system (Rahim *et al.*, 2001).

The biosynthetic pathway of HAAs is not completely elucidated. Campos-García *et al.* (1998) have described a NADPH-dependent ketoacyl reductase, RhIG, which is presumably responsible for draining the fatty acid precursors of HAAs from the general *de novo* biosynthetic pathway toward HAA synthesis (Fig. 5.1). They proposed that HAAs could result from the condensation of 3-hydroxyacyl-CoA by the activity of a poly-3-hydroxyalkanoate (PHA) synthase, two of which are found in *P. aeruginosa*, PhaC1 and PhaC2 (Timm et Steinbüchel, 1992), but this has not been demonstrated.

Using a LC/MS method that we have developed to directly analyse rhamnolipids in culture supernatants (Déziel *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 2000), we recently detected the production of free HAHA by *P. aeruginosa* 57RP (Lépine *et al.*, 2001). We demonstrated that these compounds were not rhamnolipid degradation products but the actual intermediates of rhamnolipid biosynthesis postulated by Burger *et al.* (1963). We now present evidence that *rhlA* is directly required for production of the HAHA precursors of rhamnolipids and that extracellular HAHA constitute the portion of the HAHA pool not used for rhamnolipid synthesis.

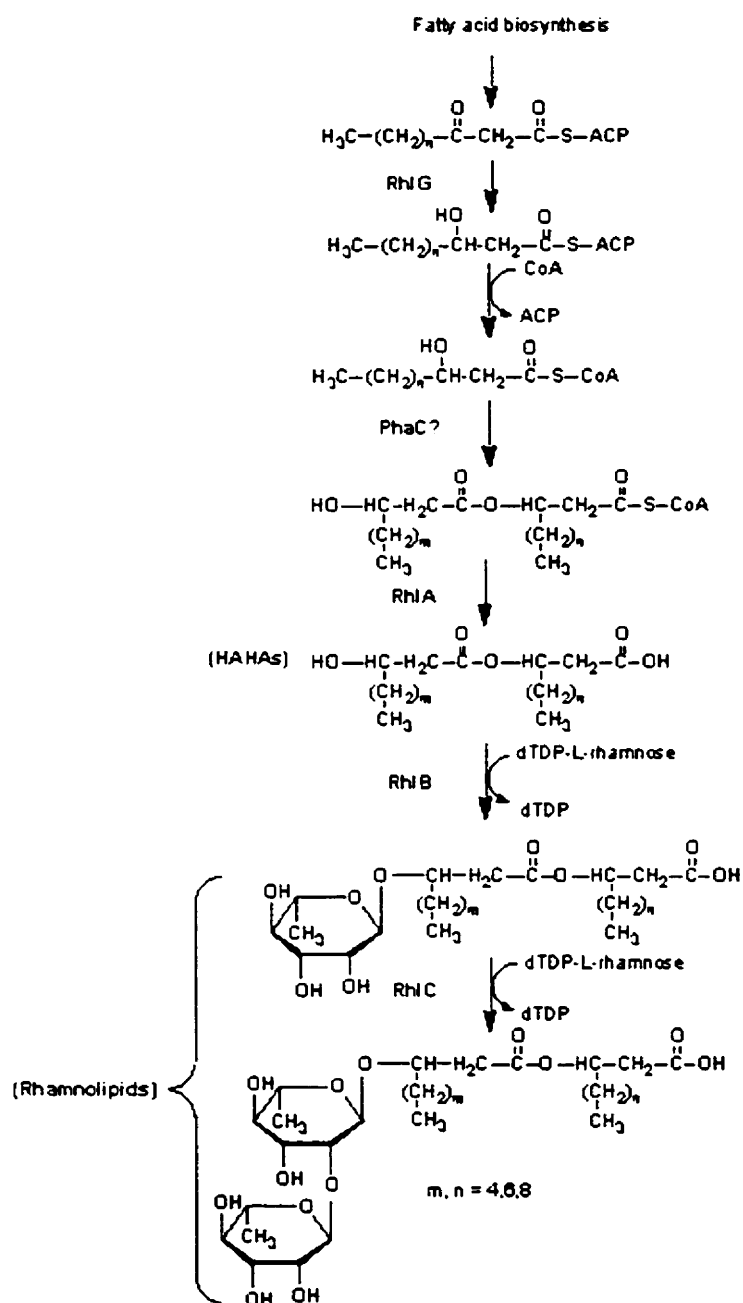


Figure 5.1 Modifications to the rhamnolipids biosynthetic pathway proposed by Campos-García *et al.* (1998).

RhIA is postulated to cleave the coenzyme A from the HAHA-CoA before the first glycosylation step. TDP, thymidine diphosphate; ACP, acyl carrier protein; CoA, coenzyme A.

5.2.3. Materials and methods

5.2.3.1. Bacteria and culture media

Three strains of *P. aeruginosa* used in this study were kindly provided by Dr. Urs Ochsner (Department of Microbiology, University of Colorado): wild-type strain PG201, and Tn5-Gm induced mutants *rhlA*-negative UO299 and *rhlB*-negative UO287 (Ochsner *et al.*, 1994a). Strain 57RP was isolated in our laboratory and used as reference (Déziel *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 2000).

Transcription from the promoter upstream of the *rhlAB* operon was investigated by monitoring the β -Gal activity of the wild-type strain 57RP containing a *rhlA'*-*lacZ* translational fusion (plasmid pECP60) (Pesci *et al.*, 1997). pECP60 was introduced into strain 57RP by electroporation (Smith et Iglewski, 1989) and 57RP(pECP60) transformants were selected with carbenicillin (200 μ g/ml). The β -Gal activity was assayed according to Miller (1972).

Cultures were grown in 50 mL of an iron-limited mineral salts medium supplemented with 2% (wt/vol) mannitol, in 250 mL Erlenmeyer flasks incubated at 30°C with gyratory shaking at 200 rpm (Déziel *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 2000). Growth was evaluated by measuring the total cellular protein concentration. Proteins were solubilised in 0.1 N NaOH at 70°C for 30 min and analysed by the method of Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), with bovine serum albumin as a standard.

5.2.3.2. Chemical analysis

Culture samples were centrifuged at 16000 x g for 5 min. to remove the bacteria and the supernatant was filtered on a 0.2 μ m filter. 16-Hydroxyhexadecanoic acid was added as an internal standard and the sample injected unto the LC/MS. All the analyses were performed in triplicate with a triple quadrupole mass spectrometer Quattro II (Micromass,

Pointe-Claire, Canada) equipped with a Z-spray interface using electrospray ionisation in negative mode. It was interfaced to a HP 1100 HPLC (Agilent Technologies, Montreal, Canada) equipped with a 150 mm x 4 mm Zorbax C₈ reverse phase column (particle size 5 µm) using the same acetonitrile-water gradient as described previously (Déziel *et al.*, 2000). Quantification was performed by integration of the pseudomolecular and the proper fragment ions.

5.2.3.3. PHA determination

The method of Brandl *et al.* (1988) was followed. Briefly, lyophilised cells were subjected to methanolysis in the presence of sulfuric acid. The resulting 3-hydroxyalkanoic acid methyl esters were then analysed by gas chromatography.

5.2.4. Results and discussion

5.2.4.1. *rhlA* mutants do not produce rhamnolipids or HAHAs

HAHAs, the lipidic precursors of rhamnolipids, have been detected along with rhamnolipids in culture supernatants of *P. aeruginosa* 57RP (Lépine *et al.*, 2001). We cultivated a *rhlA* negative mutant of this strain in order to increase the production of HAHAs. Because *rhlA* is considered part of the rhamnosyltransferase 1 complex (Ochsner *et al.*, 1994a), we anticipated that inactivation of this gene would inhibit the glycosylation of HAHAs and lead to an increase in the concentration of HAHA intermediates in culture supernatants. As expected, this mutant did not produce rhamnolipids but, surprisingly, it did not produce any HAHAs either (data not shown). This suggested that *rhlA* is involved in the synthesis of HAHAs. Thus, to investigate the role of *rhlA* in biosynthesis of rhamnolipids, the same experiment was repeated with the reference strain PG201, which was originally used to isolate the *rhlAB* operon, and the *rhlA* UO299 and *rhlB* UO287 mutants, both derived from PG201 (Ochsner *et al.*, 1994a).

Table 5.1 shows the concentrations of free HAHA congeners, along with the mono- and di-rhamnolipids, in the supernatant of a 169 h culture of PG201. The free HAHA profile in strain PG201 is similar to the one previously observed with strain 57RP (Lépine *et al.*, 2001). It was proportionally depleted in C₁₀-C₁₀ (23.6%) relative to the mono- (64.4%) and di-rhamnolipids (60.8%) and contained a large proportion of C₈-C₈ (22.1%) while no rhamnolipids containing C₈-C₈ were detected. No trace of HAHA or rhamnolipids was detected in cultures of the *rhlA* mutant UO299.

Tableau 5.1. Concentration of HAHA, mono- and di-rhamnolipids in PG201 and UO287 culture supernatants after 169 h of incubation

HAHA	HAHA concentration in PG201 (μM)	Mono-rhamnolipid concentration in PG201 (μM)	Di-rhamnolipid concentration in PG201 (μM)	HAHA concentration in UO287 (μM)
C ₄ -C ₄	18.5 (1.7) [22.1]	ND	ND	3.4 (0.2) [0.5]
C ₄ -C ₁₀	6.6 (1.3) [7.9]	81.2 (5.7) [13.5]	593.3 (63.0) [11.9]	66.4 (3.7) [9.2]
C ₁₀ -C ₄	6.5 (1.3) [7.8]	37.8 (2.7) [6.3]	275.8 (29.3) [5.5]	43.9 (2.4) [6.1]
C ₄ -C ₁₂	ND	3.1 (0.1) [0.5]	23.9 (2.4) [0.5]	3.0 (0.2) [0.4]
C ₁₂ -C ₄	ND	ND	ND	ND
C ₁₀ -C ₁₀	19.7 (1.0) [23.6]	388.8 (17.5) [64.4]	3039.3 (310.9) [60.8]	409 (32.3) [56.6]
C ₁₀ -C ₁₂	4.6 (0.4) [5.5]	26.1 (1.2) [4.3]	434.5 (53.2) [8.7]	102.7 (11.6) [14.2]
C ₁₂ -C ₁₀	0.8 (0.1) [0.9]	8.4 (0.4) [1.4]	140.3 (17.2) [2.8]	23.3 (2.6) [3.2]
C ₁₂ -C ₁₂	ND	1.2 (0.2) [0.2]	23.2 (2.7) [0.5]	2.7 (0.2) [0.4]
C ₄ -C ₁₂ 1	ND	9.3 (0.6) [1.5]	47.6 (7.0) [1.0]	2.4 (0.3) [0.3]
C ₁₂ 1-C ₈	ND	ND	ND	ND
C ₁₀ -C ₁₂ 1	26.2 (1.3) [31.3]	44.5 (4.2) [7.4]	392.8 (39.0) [7.9]	62.0 (2.3) [8.6]
C ₁₂ 1-C ₁₀	ND	ND	ND	ND
C ₁₂ -C ₁₂ 1	0.8 (0.2) [1.0]	3.3 (0.6) [0.5]	30.6 (3.6) [0.6]	3.4 (0.3) [0.5]
C ₁₂ 1-C ₁₂	ND	ND	ND	ND
TOTAL	83.8	603.6	5001.3	722.2

ND, not detected; ^a Numbers in parenthesis are the standard deviation. Samples were analysed in triplicate

^b Numbers in bracket are the concentration percentage of a given congener within the same family of compounds.

5.2.4.2. The *rhlB* mutant produces HAHAs

Because the *rhlA* and *rhlB* genes form a bicistronic operon and *rhlA* is upstream of *rhlB*, inactivation of *rhlA* by insertional mutagenesis prevents *rhlB* expression by interrupting its transcription (Ochsner *et al.*, 1994a). Table 5.1 shows the concentrations of free HAHAs excreted by the *rhlB* mutant UO287 after 169 h of incubation. No mono- or di-rhamnolipids were detected, as expected. However, the total free HAHA concentration in UO287 supernatant was almost nine times higher than in the wild strain PG201.

Proportions of the various free HAHAs differed between strains UO287 and PG201. Most notably, the percentage of free HAHAs represented by the C₁₀-C₁₀ congener goes from 23.6% for PG201 to 56.6% for strain UO287. This value is very close to the percentage of the C₁₀-C₁₀ congener observed in mono- (64.4%) and di-rhamnolipids (60.8%) in PG201. The percentage of free HAHAs represented by the C₈-C₈ congener decreased from 22.1% for PG201, to only 0.5% for strain UO287, while no C₈-C₈ congeners were observed in mono- and di-rhamnolipids of PG201. The very high percentage of free HAHAs represented by the C₁₀-C_{12:1} congener (31.3%) in PG201 decreased to 8.6% in UO287, close to the values observed for the C₁₀-C_{12:1} congeners in mono- and di-rhamnolipids of PG201. These results suggest that rhamnosyltransferase 1 prefers longer chain and saturated HAHAs, leaving a HAHA pool enriched in shorter chain and unsaturated congeners, as seen in the free HAHAs of PG201. Because most of the HAHAs are used by the rhamnosyltransferase, the residual free HAHA pool of PG201 is small. The larger UO287 pool is therefore more representative of the initial HAHA pool before rhamnolipid synthesis. This explains why the pool of free HAHAs in UO287 cultures is very similar to the HAHA profile of mono- and di-rhamnolipids observed with PG201.

These observations further strengthen our hypothesis of a preferential action of RhlB on longer chain HAHAs (Lépine *et al.*, 2001), based on the depletion of C₁₀-C₁₀ and the excess of C₈-C₈, C₈-C₁₀ and C₁₀-C₈ in free HAHAs versus those found in rhamnolipids.

The lack of correlation between the composition of the HAH pool and the preferences of the rhamnosyltransferase, and the actual natural excretion of HAHAs by the wild strain, are intriguing and suggests that free HAHAs may have a specific role in the bacteria. Interestingly, we have recently found that expression of *rhlA* and release of HAHAs allows *P. aeruginosa* to colonise surfaces by swarming motility, probably as a result of the wetting activity of extracellular HAHAs (unpublished results).

5.2.4.3. Extracellular accumulation of HAHAs is delayed compared to rhamnolipids

To further investigate the hypothesis that HAHAs are excreted as unused metabolites, we studied the accumulation of mono-rhamnolipids, di-rhamnolipids and HAHAs following activation of *rhlA* (Fig. 5.2). β -Gal activity of a *rhlA*'-lacZ fusion was assayed to monitor *rhlA* expression. As illustrated in Fig. 5.2b, mono-rhamnolipids appeared in the supernatant immediately following upregulation of *rhlA* expression. This results confirms that rhamnolipid synthesis is tightly coupled to *rhlA* activation and indicates that rhamnolipids are released by the cells as soon as they are synthesized. Appearance of di-rhamnolipids in the supernatant was delayed, probably because they require a supplemental glycosylation (Rahim *et al.*, 2001). Nevertheless, the rates of accumulation of both rhamnolipid families were essentially the same, as previously reported (Déziel *et al.*, 2000). This is the first direct kinetic demonstration of correlation between activation of *rhlAB* and rhamnolipid production. Finally, accumulation of HAHAs occurred later and more slowly than rhamnolipids, reflecting release by the cells of the less preferred precursors of rhamnosyltransferase 1.

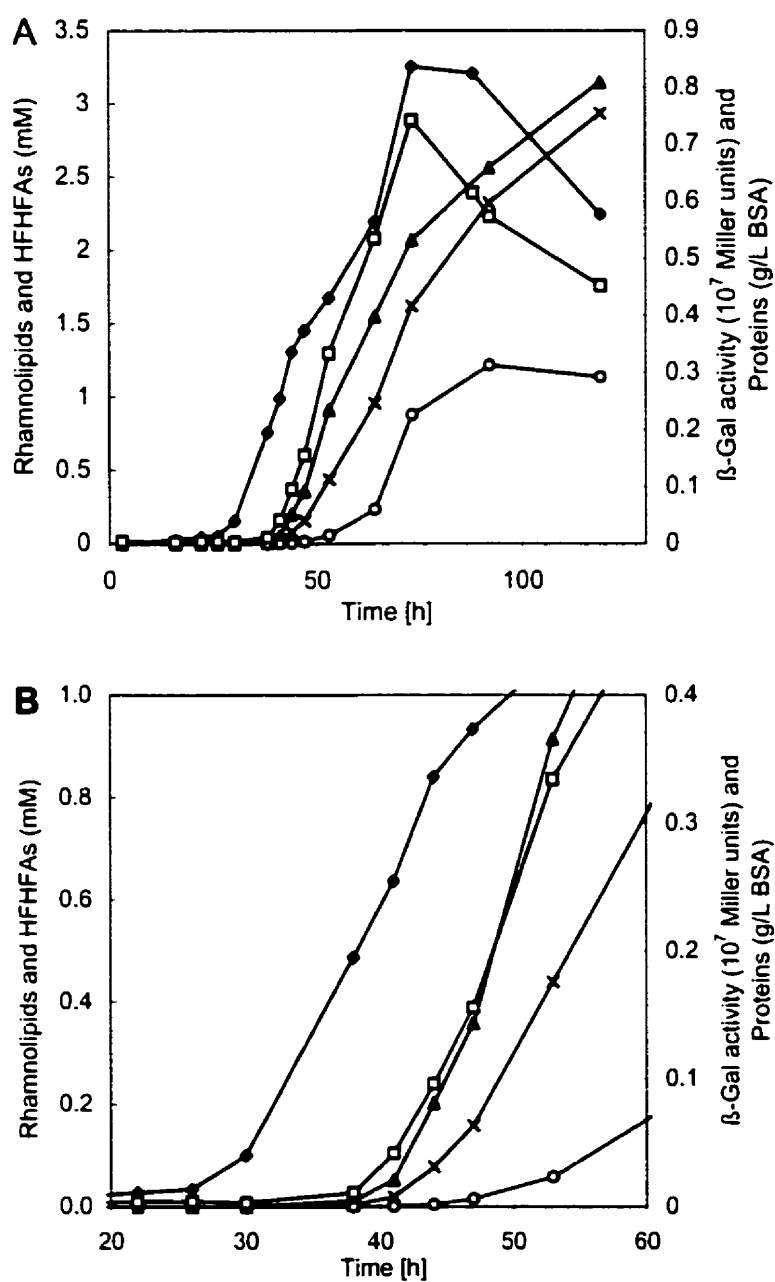


Figure 5.2 Production of rhamnolipids and HAAs by *P. aeruginosa* 57RP(pECP60) following *rhlA* expression.

(A) Total cultivation period. (B) Focus on the 20 to 60 h time frame. Proteins represent cellular growth (◆), β -Gal activity reflects activation of *rhlA* expression (□), mono-rhamnolipids (●), di-rhamnolipids (x), HAAs (○).

5.2.4.4. The *rhlB* mutant accumulates more PHAs

The smaller amounts of HAHA obtained with mutant UO287 (722.2 μ M) in comparison with the total amounts of free and linked HAHA in PG201 (5688.7 μ M) may reflect a negative feed-back effect on HAHA synthesis. It could also be that HAHA excretion is less efficient than rhamnolipids or is normally promoted by the simultaneous release of rhamnolipids. PHA consisting of polyesters of various 3-hydroxy fatty acids, mainly with carbon chain length from 8 to 12 carbons like rhamnolipids, are accumulated as intracellular storage compounds by Pseudomonads (Huisman *et al.*, 1989). Comparison of PHA accumulation between PG201 and UO287 have shown that the *rhlB* mutant produces increased concentrations of PHAs, indicating that unused 3-hydroxyalkanoic acids were redirected towards PHA synthesis (18.9% wt/wt of cellular dry weight for PG201 vs. 40.1% for UO287). Indeed, PHA and rhamnolipid biosynthetic routes are competing for common 3-hydroxyalkanoic acids precursors coming from the fatty acid *de novo* biosynthetic pathway (Rehm *et al.*, 2001).

5.2.4.5. Putative function of *rhlA* in rhamnolipid synthesis

Although RhlA is required for rhamnolipid production, its function is undetermined. Ochsner *et al.* suggested that it is a periplasmic protein, presumably involved in the synthesis or transport of rhamnosyltransferase precursor substrates or in the stabilisation of the RhlB protein in the cytoplasmic membrane (Ochsner *et al.*, 1994a). The absence of HAHA production by the *rhlA* mutant UO299 indicates that this gene is involved in HAHA synthesis.

Amino acid sequence analysis of the *rhlA* gene product exhibits 42-44% identity and 51-54% similarity with 3-hydroxyacyl ACP:CoA transferases (PhaG) identified in various members of the *Pseudomonas* genus (*P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. oleovorans* and *Pseudomonas* sp. 61-3). This enzyme, encoded by the *phaG* gene, directly links *de novo* fatty acid biosynthesis to PHA synthesis (Rehm *et al.*, 1998). Thus, based on its significant degree of homology with PhaG, RhlA could be an acyltransferase catalysing

the transfer of the 3-hydroxyacyl moiety from the ACP thioester to CoA. However, the RhIA protein (295 amino acids) lacks the conserved HX₄D motif of acyltransferases (Heath et Rock, 1998), having a HX₄A instead (positions 177-182 of the amino acid sequence). Substitution of the invariant aspartic acid with an alanine was specifically shown to eliminate the catalytic activity of the membrane-bound *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Escherichia coli* (Heath et Rock, 1998). This argue against an acyltransferase function for RhIA.

As shown previously (Burger *et al.*, 1963; Ochsner *et al.*, 1994b), nonactivated 3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoic acid is directly glycosylated by rhamnosyltransferase 1. This is in contrast to the pathway suggested by Campos-Garcia *et al.* (1998), who proposed glycosylation of HAHa-CoA by RhIAB, but consistent with our detection of free HAHAs in the supernatant of PG201 and UO287. Therefore, RhIA could be a thioesterase acting on the product of the putative HAHa synthase (Fig.1), which was proposed to be PhaC (Campos-García *et al.*, 1998). Many bacterial thioesterases have an unknown physiological role, whereas several of their eukaryotic counterparts display a distinct chain-termination function. This would be in agreement with a role for RhIA in diverting 3-hydroxyalkanoic acids from PHA synthesis towards HAHa synthesis. Accordingly, a switch of the flow of 3-hydroalkanoic acids from PHA polymerisation to rhamnolipid synthesis was recently described to occur at the onset of the stationary phase, that is when expression of *rhIA* is upregulated (Chayabutra et Ju, 2001). Search in conserved protein domain databases (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) showed that RhIA (GenBank accession number A53652) contains a significant homology (positions 53 to 275 of the amino acid sequence) with the consensus fold of the α/β hydrolase superfamily. Both thioesterases and acyltransferases belong to this superfamily. Interestingly, some thioesterases can also act as acyltransferases (Byers et Meighen, 1985). The absence of significant amino acid sequence identity of RhIA with other thioesterases is consistent with the high level of primary structure divergence observed among the thioesterase group (Arpigny et

Jaeger, 1999). Nevertheless, most thioesterases characterised to date contain a conserved serine at the active site, often located in a GX SXG motif about 100 amino acids from the N-terminus (Arpigny et Jaeger, 1999), and/or a C-terminal GXH sequence (Cho et Cronan, 1993). Alignment of the deduced amino acid sequence of RhIA with the α/β hydrolase consensus sequence revealed a corresponding serine in a SASWG sequence at positions 100-104 and also a GFH at the C-terminal end (positions 286-288). The bordering glycine residues are not always conserved (Arpigny et Jaeger, 1999). Thus, putative conserved sites of thioesterases seem to be present in RhIA. Additional work will be required to confirm this hypothesis.

5.2.5. Acknowledgments

We thank Dr. Urs Ochsner who kindly provided strains PG201, UO299 and UO287.

5.3. ARTICLE #3 : THE *RHLA* GENE IS REQUIRED FOR THE PRODUCTION OF A NOVEL BIOSURFACTANT INVOLVED IN SWARMING MOTILITY AND BIOFILM DEVELOPMENT OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Authors

Eric Déziel,^{1,2†} François Lépine,¹ Anna-Maria Donetti,¹ Yves Comeau,² and Richard Villemur^{1*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier-Microbiologie et Biotechnologie, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

²Department of Civil, Geological and Mining Engineering, École Polytechnique of Montreal, P.O. box 6079, Station Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3A7

*Corresponding author. Phone: (450) 687-5010. Fax: (450) 686-5501. e-mail: richard.villemur@inrs-iaf.quebec.ca

†Present address: Department of Surgery, Molecular Surgery Laboratory, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114

Keywords: aeruwettin, rhamnolipids, continuous-flow chamber, green fluorescent protein, *in situ* hybridization, confocal laser microscopy

Abbreviations: GFP, green fluorescent protein; HAHA, 3-hydroxyacyl-3-hydroxyacids

5.3.1. Summary

Pseudomonas aeruginosa produces extracellular glycolipids composed of L-rhamnose and 3-hydroxyfatty acids. Although these compounds display surface-active properties, their physiological function is not well understood. Rhamnolipids are synthesised by a rhamnosyltransferase, encoded by the *rhlAB* operon, which catalyses the transfer of TDP-L-rhamnose to 3-hydroxyacyl-3-hydroxyacid (HAAA) moieties of various lengths. RhlB is the catalytic protein of the rhamnosyltransferase and *rhlA* encodes a protein which is absolutely necessary for rhamnolipid synthesis but has an unknown function. Swarming motility was recently described in *P. aeruginosa*. Swarming cells need to overcome the strong surface tension of water surrounding the colony and this surface conditioning is usually achieved by the production of wetting agents. Using *rhlA* and *rhlB* mutants, we demonstrated that swarming requires the expression of the *rhlA* gene but it does not necessitate rhamnolipid production. Swimming and twitching motilities were not affected. We determined that *rhlA* is involved in the production of a novel biosurfactant with potent wetting activity, composed of a mixture of HAAs, which we named aeruwettin. Biofilms are highly organised surface-associated communities of microorganisms enveloped within an exopolymer matrix. There is increasing evidence that motility plays a role in biofilm structural development, especially in the first steps of formation. However, very limited information is available on the detachment and dispersal mechanisms used by biofilm bacteria. Compared to the wild-type strain, static biofilms formed on polystyrene surfaces by *rhlA* and *rhlB* mutants were thicker. To investigate further the role of biosurfactants, we cultivated a wild-type strain tagged with the green fluorescent protein and its *rhlA* mutant together as a biofilm in a flow chamber. Analysis of this biofilm by confocal microscopy coupled to *in situ* hybridization revealed a higher proportion of wild-type cells at the surface of the biofilm and in the effluent of the flow cell. These results indicate that biosurfactants produced by *P. aeruginosa* are involved in biofilm development.

5.3.2. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous and versatile gram-negative bacterium capable of three types of motility: flagellum-mediated swimming, type IV pilus-dependent twitching, and swarming, which was only recently reported in this species (Déziel *et al.*, 2001; Köhler *et al.*, 2000; Rashid et Kornberg, 2000). Swarming is a form of organised surface translocation allowing rapid colonisation of surfaces that depends on extensive flagellation and cell-to-cell contact (Fraser et Hughes, 1999; Harshey, 1994). It is a multicellular phenomenon requiring cell differentiation and co-operation, which is analogous to biofilm formation (Harshey, 1994).

Swarming cells need to overcome the strong surface tension of water surrounding the colony in order to efficiently colonise the surface (Matsuyama et Nakagawa, 1996). This surface conditioning is often achieved by the production of surface-active compounds which act as wetting agents (Lindum *et al.*, 1998; Matsuyama *et al.*, 1995; Matsuyama *et al.*, 1992; Mendelson et Salhi, 1996; Toguchi *et al.*, 2000). Spreading growth of *Serratia marcescens* is known to depend on the production of various extracellular lipopeptides named serrawetins (Matsuyama *et al.*, 1995; Matsuyama *et al.*, 1992; Matsuyama *et al.*, 1986). Synthesis of serrawettin W2, a cyclic lipodepsipeptide required for swarming motility of *Serratia liquefaciens*, is regulated in a cell-density-dependent manner by an acyl-homoserine lactone-based quorum-sensing system (Lindum *et al.*, 1998). Normal swarming of *Bacillus subtilis* relies on the production of surfactin (Mendelson et Salhi, 1996), a cyclic lipopeptide biosurfactant whose synthesis is also controlled by quorum-sensing via two pheromone signal peptides, ComX and CSF (Lazazzera *et al.*, 1997; Solomon *et al.*, 1996).

It has long been known that *P. aeruginosa* produces extracellular glycolipids composed of L-rhamnose and 3-hydroxydecanoic acid (Jarvis et Johnson, 1949). However, rhamnolipids are among the less well understood virulence factors released by this bacterium. Since they display surface activity, these molecules are considered

biosurfactants and have been mostly studied for their role in the uptake of hydrophobic substrates, especially *n*-alkanes (Beal et Betts, 2000; Itoh et Suzuki, 1972). They have also been studied as heat-stable extracellular hemolysins (Johnson et Boese-Marrazzo, 1980). In liquid cultures, rhamnolipids are produced as a complex mixture of congeners containing one or two 3-hydroxy fatty acids of various length, linked to a mono- or di-rhamnose moiety (Déziel *et al.*, 1999b; Déziel *et al.*, 2000). In general, the two more abundant rhamnolipids are L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate and L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate (Lang et Wullbrandt, 1999; Maier et Soberón-Chávez, 2000). According to the biosynthetic pathway proposed by Burger *et al.* (1963), rhamnolipid synthesis proceeds by sequential glycosyl transfer reactions, each catalysed by a different rhamnosyltransferase. The *rhl* genes encoding the first rhamnosyltransferase, which catalyses the transfer of TDP-L-rhamnose to 3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate, have been characterised, along with their regulatory genes (Maier et Soberón-Chávez, 2000; Ochsner *et al.*, 1994a; Ochsner *et al.*, 1994b; Ochsner et Reiser, 1995). In a similar way to the wetting agents involved in swarming motility of *Serratia* and *Bacillus* species, rhamnolipid production in *P. aeruginosa* is controlled by cell-to-cell signalling. This quorum-sensing system is composed of *rhlI*, the N-butyrylhomoserine lactone autoinducer synthase gene, and *rhlR*, which encodes the transcriptional activator (Ochsner *et al.*, 1994b; Ochsner et Reiser, 1995). This system regulates the expression of the *rhlAB* operon which encodes the rhamnosyltransferase I required for rhamnolipid synthesis (Ochsner *et al.*, 1994a; Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1997). RhlB is the catalytic protein of the rhamnosyltransferase and *rhlA* encodes a periplasmic protein presumably involved in the synthesis or transport of rhamnosyltransferase precursor substrates, or in the stabilisation of the RhlB protein (Ochsner *et al.*, 1994a).

Biofilms are highly organised surface-associated communities of microorganisms enveloped within an exopolymer matrix (Costerton *et al.*, 1995). Biofilms are also dynamic structures in constant evolution (O'Toole *et al.*, 2000b). After initial attachment

and biofilm maturation, cells must be able to detach and disperse to colonise new habitats. However, besides physical break off and possible involvement of enzymes that degrade exopolysaccharides, very limited information is available on the detachment and dispersal mechanisms used by bacteria (Boyd et Chakrabarty, 1994; Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000b). There is increasing evidence that motility plays a role in the structural development of biofilms (Pratt et Kolter, 1999; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000).

During the preparation of this manuscript, Köhler *et al.* (2000) reported that cell-to-cell signalling, and both flagella and type IV pili, are required for swarming motility in *P. aeruginosa*. These authors observed that a *rhlA* mutant was unable to swarm and therefore concluded that rhamnolipid production is required for swarming motility of *P. aeruginosa*. We report here that swarming indeed requires the expression of the *rhlA* gene but it does not necessitate rhamnolipid production. We show that *rhlA* is involved in the production of a novel biosurfactant with a powerful wetting activity, which we named aeruwettin. We also present evidence that biosurfactants produced by *P. aeruginosa* are involved in biofilm development.

5.3.3. Methods

5.3.3.1. Bacterial strains, plasmids and culture media.

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 5.2. The *rhlA* mutant 57RP-98 was generated by insertional mutagenesis by the following procedure. Part of the *rhlA* gene was amplified by PCR and cloned in the pCRII T-vector (Invitrogen). A 0.5 kb *Bam*HI fragment containing a portion of the *rhlA* sequence was isolated from a positive clone. pUT mini-Tn5 Km^r (de Lorenzo & Timmis, 1994) was digested separately by *Bam*HI and *Bgl*II, and a 2 kb *Bam*HI fragment containing the Km^r gene and a 5 kb *Bgl*II fragment which lacked the transposase gene were then isolated. These two fragments plus the *rhlA* *Bam*HI fragment were ligated together and transferred into *E. coli* CC118 λ *pir*. One positive clone was then transferred in *E. coli* S17-1 λ *pir* and conjugated with strain 57RP (de Lorenzo & Timmis, 1994). Km^r transconjugants products of homologous recombination were selected and verified for the absence of rhamnolipid production on SW Blue agar plates (Siegmund et Wagner, 1991) containing kanamycin (100 μ g/ml). Transconjugant 57RP-98 was selected and a Southern blot hybridization (Sambrook et Russell, 2001) with a *rhlA* probe was performed to confirm insertion of the construction in the chromosomal *rhlA* gene.

The fluorescent *P. aeruginosa* 57RP-gfp strain was obtained by conjugation of *E. coli* S17-1 λ *pir* containing the green fluorescent protein gene *gfpmut3** (pJBA28) cloned into a mini-Tn5 suicide vector (Andersen *et al.*, 1998), and selected on *Pseudomonas*-specific Cetrimide agar supplemented with kanamycin (500 μ g/ml). 57RP-gfp was indistinguishable from the parent strain on agar plates and in liquid cultures. The pECP60 plasmid was introduced into strain 57RP by electroporation (Smith et Iglewski, 1989) and 57RP(pECP60) transformants were selected with carbenicillin (200 μ g/ml). X-gal (40 μ g/ml) was added when required.

Swarm plates were composed of 0.5% Bacto-agar and 8 g/L nutrient broth, both from Difco, supplemented with 5 g/L dextrose, and dried overnight at room temperature before use (Rashid et Kornberg, 2000). Cells were point inoculated with a sterile toothpick and the plates were incubated at 30°C for 24 to 48 h. A defined mineral salts medium (MSM) designed to promote rhamnolipid production (Déziel *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 1996), supplemented with 2% dextrose, was also used. The composition was (g/L): KH_2PO_4 , 0.7; Na_2HPO_4 , 0.9; NaNO_3 , 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1; and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001. The final pH was 6.7. The BDT medium used for biofilm cultivation in the flow cell chamber contained 0.2% dextrose and 0.5% tryptone in Bushnell-Haas mineral medium (Difco).

Tableau 5.2. Bacterial strains and plasmids.

Strain/plasmid	Description	Source or reference
<i>P. aeruginosa</i>		
PG201	Wild-type	(Guerra-Santos <i>et al.</i> , 1984)
UO287	$\Delta rhlB$ derivative of PG201; Gm^r	(Ochsner <i>et al.</i> , 1994a)
UO299	$\Delta rhlA$ derivative of PG210; Gm^r	(Ochsner <i>et al.</i> , 1994a)
57RP	Wild-type	(Déziel <i>et al.</i> , 1999b; Déziel <i>et al.</i> , 1996)
57RP-98	$\Delta rhlA$ derivative of 57RP; Km^r	This study
57RP-gfp	57RP with a mini-Tn5-Km-T ₁ -T ₀ - <i>gfp</i> mut3*-P _{A1 04 03} cassette from pJBA28 randomly inserted into the chromosome; Km^r	This study
Plasmids		
pECP60	<i>ori</i> (colE1) <i>ori</i> (<i>P. aeruginosa</i>) <i>rhlA</i> *- <i>lacZ</i> translational fusion vector; Ap^r	(Pesci <i>et al.</i> , 1997)
pJBA28	Delivery plasmid for mini-Tn5-Km-P _{A1 04 03} -RBSII- <i>gfp</i> mut3*-T ₀ -T ₁ ; Ap^r , Km^r	(Andersen <i>et al.</i> , 1998)

5.3.3.2. Biosurfactant production and analysis.

Bacteria were cultivated in MSM supplemented with 2% mannitol. After six days of incubation at 30°C and 200 rpm, the cell-free supernatant was analysed. Surface and wetting activities were qualitatively compared with the drop-collapsing test (Jain *et al.*, 1991) and surface tension was measured by the ring method with a du Nouy tensiometer (Fisher Scientific, Toronto, Ontario, Canada). Determination of biosurfactant production on swarm plates was performed as follows: each strain was inoculated on five MSM agar plates with 2% mannitol and after 48h of incubation, the whole content was mixed with 100 ml of 1% KHCO₃ (pH 9), incubated overnight at 4°C, and centrifuged 10 min at 1800 x g to remove solids. The supernatant was then acidified to pH 4 with concentrated HCl and extracted three times with 40 ml of ethyl acetate. The organic fractions were finally pooled, dried and evaporated. The residue was resuspended in an aqueous solution containing 36 % acetonitrile and 4 mM ammonium acetate. Liquid chromatography/mass spectrometry analyses were performed as described previously for rhamnolipids (Déziel *et al.*, 1999b; Déziel *et al.*, 2000) except for the scanning mass range which was increased from m/z 250-760 to 135-760 in order to better detect the lower molecular weight 3-3-hydroxyacyl-3-hydroxyacids (HAHAs).

5.3.3.3. Electron microscopy.

A drop of water was deposited on the periphery of a swarming colony. Cells were allowed to become suspended for about 1 min, then a Formvar-coated copper grid was floated on the drop for about 45 s, rinsed in a drop of water, and stained for 15 s with a 2% aqueous solution of phosphotungstic acid. Samples were examined with a Hitachi H-7100 transmission electron microscope.

5.3.3.4. Biofilm formation assay in polystyrene culture tubes.

The biofilm formation protocol was adapted from O'Toole and Kolter (1998b) as described before (Déziel *et al.*, 2001). Polystyrene 12 x 75 mm tubes containing 0.5 ml of

MSM (in which the NaNO_3 was replaced by glutamate) supplemented with 2% dextrose were inoculated with overnight LB cultures and incubated at 35°C without agitation. At regular time intervals, triplicate tubes were rinsed thoroughly with water and a 1% solution of crystal violet was added to stain the attached cells. After 15 min at room temperature, the tubes were rinsed with water and the biomass of attached cells (biofilm) was quantified by solubilisation of the dye in 2 ml of 95% ethanol. The absorbance was measured at 600 nm with a spectrophotometer.

5.3.3.5. Biofilm formation in flow cell chamber.

A biofilm composed of both 57RP-gfp and 57RP-98 was cultivated in a flow cell chamber with channel dimensions of 1 by 4 by 40 mm (a kind gift from John Lawrence, National Water Research Institute, Saskatoon, Saskatchewan, Canada). The flow system was assembled and prepared as described by Christensen et al. (1999). The substratum consisted of a microscope glass coverslip (50 x 45 mm) (Fisher Scientific). The flow cell was inoculated with equal volumes of overnight cultures of 57RP-gfp and 57RP-98 diluted to an OD_{450} of 0.2 in BDT medium. After inoculation, the medium flow was stopped for 1 h to allow for substratum colonization then BDT was pumped through the flow cell at a constant rate of 0.28 mm/s using a Masterflex (Cole-Parmer) peristaltic pump. The chamber was incubated at 21°C for 8 days.

57RP-98 cells were differentiated from 57RP-gfp cells expressing *gfpmut3** by 16S rRNA *in situ* hybridization with the eubacterial probe Eub338 (5' GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3') labeled with the indocarbocyanine fluorescent dye CY3, which binds to both 57RP-gfp and 57RP-98. *In situ* detection of biofilm cells tagged with CY3 and GFP (57RP-gfp [yellow-orange]) or CY3 only (57RP-98 [red]) was performed by fixing and embedding of the biofilm, followed by hybridization as described by Christensen et al. (1999).

The biofilm was examined with a Bio-Rad Radiance 2000 scanning confocal laser microscope (SCLM) equipped with an argon laser and standard filter blocks. The laser system was mounted on a Nikon epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E-800) equipped with a 60 $\times$, 1.4 numerical aperture oil immersion lens. The SCLM was controlled by the Bio-Rad Radiance Laser Sharp system. The microscope stage was also computer-controlled for *xy* and *xz* positioning. Cells tagged with GFP appeared in the green channel while cells tagged with CY3 appeared in the red channel. Images were sampled with the Laser Sharp software and analyzed with Photo-Paint (Corel Draw Suite, version 8.0).

5.3.4. Results

5.3.4.1. Swarming requires *rhlA* expression

We and others recently reported that *P. aeruginosa* can migrate over semi-solid agar surfaces by swarming motility (Déziel *et al.*, 2001; Köhler *et al.*, 2000; Rashid et Kornberg, 2000). Since it was previously shown that other bacterial species capable of swarming motility require the production of an extracellular wetting agent, we investigated whether there is a relationship between swarming motility and rhamnolipid production in *P. aeruginosa*. We monitored the β -galactosidase activity of strain 57RP containing a *rhlA*'-lacZ fusion under the control of the *rhlAB* promoter. Visual detection of *rhlAB* expression was assayed on MSM swarm plates containing X-gal. We tested the replacement of NaNO₃ by an equimolar concentration of NH₄Cl as nitrogen source, and the addition of excess iron. Nitrate promotes, whereas ammonium and iron repress, rhamnolipid production (Guerra-Santos *et al.*, 1984). Swarming was only observed on plates allowing biosurfactant production and this was accompanied by a blue pigmentation of the central colony and of the expending tendrils, revealing β -Gal activity (Fig. 5.3). Results for iron excess were the same as for ammonium addition (data not shown).

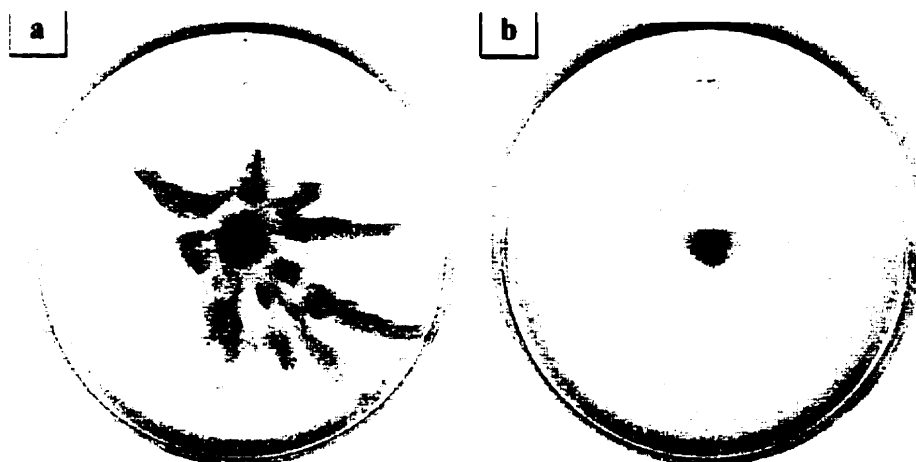


Figure 5.3 Wild-type *P. aeruginosa* strain 57RP containing a *rhlA'*-*lacZ* translational fusion was grown on MSM swarm agar supplemented with X-gal.

(a) NaNO_3 as nitrogen source, which stimulates biosurfactant production. **(b)** NH_4Cl as nitrogen source, which inhibits biosurfactant production. Blue pigment indicates expression of *rhlA*.

We then investigated whether mutants of *P. aeruginosa* unable to synthesise rhamnolipid biosurfactant would be affected in swarming, as was recently suggested by Köhler et al. (2000). Three *P. aeruginosa* strains were obtained: a *rhlA* mutant (strain UO299), a *rhlB* mutant (strain UO287) and the wild-type strain PG201 from which both mutants were derived. With the swarm medium described by Rashid and Kornberg (2000), a Bacto-agar concentration between 0.4 and 0.8% allowed the formation of a zone of swarming motility by strain PG201, at every assayed incubation temperature (21°C, 30°C and 37°C). The same result was obtained with strain 57RP. In comparison, swarming was completely abrogated in the *rhlA* mutant but, unexpectedly, the *rhlB* mutant was still able to swarm (Fig. 5.4). Since *rhlA* is located upstream of *rhlB* on the operon, a *rhlB* mutant still has an active *rhlA* gene. These results indicated that rhamnosyltransferase activity, hence production of rhamnolipids, is not required for swarming of *P. aeruginosa* but that *rhlA* is essential.

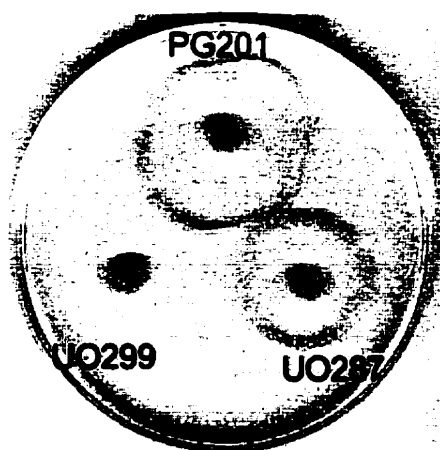


Figure 5.4 Swarm plate incubated for 24h at 30°C.

P. aeruginosa PG201 is a wild-type strain, UO287 is a *rhIB* mutant and UO299 a *rhIA* mutant. Under these conditions, swarming colonies formed by this strain are concentric rather than dendritic.

We also examined the two other known types of motility in *P. aeruginosa*. Flagella-dependent swimming on 0.3% agar and type-IV pili-dependent twitching on a polystyrene surface under 1.0% agar were not affected by inactivation of *rhIA*. Growth patterns of UO299 and 57RP-98 (a *rhIA* mutant of strain 57RP) were identical to the wild-type strains, indicating that the *rhIAB* operon is only involved in swarming (data not shown).

5.3.4.2. Involvement of *rhIA* in the production of a novel biosurfactant.

The secretion of anionic biosurfactants, such as rhamnolipids, is revealed by the formation of a dark blue halo around colonies growing on SW Blue agar plates (Siegmond et Wagner, 1991). Interestingly, the *rhIB* mutant produced a small halo on these plates, suggesting that the cells released anionic amphiphilic compounds other than rhamnolipids. Significant surface activity was detected in the extracellular fluids of strains PG201 and UO287 cultivated in a liquid medium designed to promote the production of rhamnolipids (Table 5.3).

Tableau 5.3 Properties of studied *P. aeruginosa* strains and biosurfactant mutants.

Strain	Size of Swarming zone	Halo on SW Blue agar plates	Foaming of liquid cultures*	Cellular aggregation (clumps)*	Drop collapsing test on supernatant*	Surface tension of supernatant (mN/m)*
PG201 (wild-type)	++	+++	+++	-	++	38
UO299 (<i>rhlA</i> -) [†]	-	-	-	+	-	59
UO287 (<i>rhlB</i> -)	+	-	+	-	+++	29
57RP (wild-type)	+++	+++	+++	-	++	35
57RP-98 (<i>rhlA</i> -)	-	-	-	+	-	62

*Cells were cultivated for six days at 200 rpm and 30°C in MSM with 2% mannitol.

[†]*rhlA* mutants do not express RhlB.

A positive drop-collapsing test and a surface tension below 40 mN/m usually denote the presence of surface-active agents. Analysis of the supernatants by liquid chromatography/mass spectrometry showed that PG201 produced the usual mixture of about twenty different rhamnolipid congeners (Déziel *et al.*, 1999b; Déziel *et al.*, 2000), the main ones being L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxyoctanoyl-3-hydroxydecanoate and L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate (data not shown). The analysis also revealed that low concentrations of a variety 3-hydroxyacyl-3-hydroxyacids (HAHAs) corresponding to the fatty acid moieties of rhamnolipids were concurrently released by the wild-type strain (Fig. 5.5). Whereas there was no trace of rhamnolipids or 3-hydroxyfatty acid dimers in the supernatant of the *rhlA* mutants (UO299 and 57RP-98), the *rhlB* mutant was still producing HAHAs (Table 5.4). We then checked directly for biosurfactant release on swarm plates. Extraction of the whole content of MSM swarm agar plates, after removal of the cells, confirmed that PG201 and UO287 (Table 5.4) also produced HAHAs under these growth conditions. These results indicate that *rhlA* is required for the synthesis of this mixture of extracellular amphiphilic lipids displaying tensio-active properties. Thus, HAHAs represent a new class of biosurfactants released by *P. aeruginosa* besides rhamnolipids.

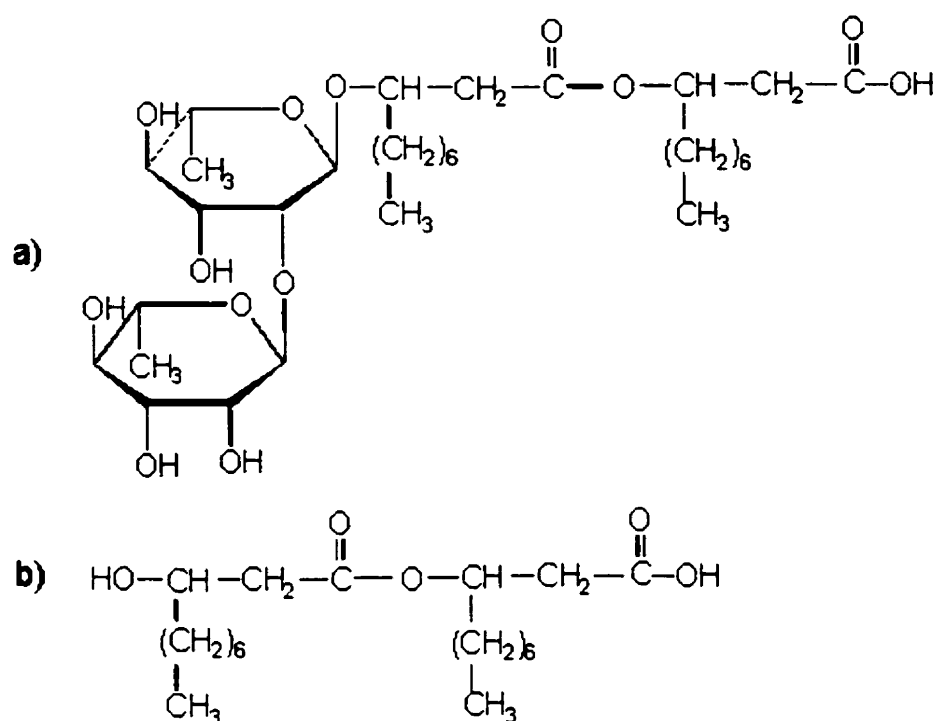


Figure 5.5 Representations of typical (a) rhamnolipid (L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate) and (b) aeruwettin (3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoic acid) isomers.

Tableau 5.4. Quantification of biosurfactant (rhamnolipids and aeruwettin) production by liquid chromatography/mass spectrometry.

Strains	Rhamnolipids (mg/L)		Fatty acid dimers (mg/L)	
	Liquid culture*	Agar plates†	Liquid culture	Agar plates
PG201 (wild-type)	2738	85	11.7	0.6
UO299 (<i>rhlA</i> -)	0	0	0	0
UO287 (<i>rhlB</i> -)	0	0	135.2	4.3

*Cells were cultivated for six days at 30°C and 200 rpm in MSM supplemented with 2% mannitol.

†The whole agar content of five MSM swarm plates was extracted after 48 h of growth.

5.3.4.3. Requirements for swarming

Examinations by light and electron microscopy showed that most PG201 cells sampled at the edge of swarming zones were elongated (average length 3-3.5 μm) whereas normal cells length was between 1.5 and 2 μm . Rashid & Kornberg (2000) and Köhler *et al.*

(2000) also observed that differentiated swarm cells were about twice as long. However, less than 5% of the cells were elongated in a UO299 colony on swarm agar and in a PG201 colony on MSM swarm agar with NH_4^+ or arginine as nitrogen source (inhibition of biosurfactant production), implying that differentiation of *P. aeruginosa* into swarming cells does not depend uniquely on the right viscosity of the medium.

To verify that surface conditioning was in fact the missing activity in the *rhlA* mutant, we investigated whether the presence of surfactants could promote swarming of UO299. Addition to swarm agar plates of Triton X-100 or supernatants of PG201, or UO287, cultivated in liquid swarming medium (thus containing HAHAs and rhamnolipids) did not allow swarming of the *rhlA* mutant. Before swarming cells actually began to migrate on the surface of the agar, we always observed a transparent halo of fluid around the swarming colonies resulting from the release of the wetting agents, as also reported by Rashid & Kornberg (2000) and Köhler *et al.* (2000). We therefore inoculated UO299 near PG201 on a swarm plate (distance of 2-3 cm) in order for the *rhlA* mutant colony to reside in the zone containing the biosurfactants released by the wild-type strain, but no swarming was induced. Finally, swarming of the *rhlA* mutant UO299 could be restored when it was co-inoculated with the *rhlB* mutant UO287 into a single colony on a swarm plate. After 24h of incubation at 30°C, cells were sampled at the migrating edge of the swarming colony and enumerated on SW Blue agar. Nearly equal numbers of each strain was detected, indicating that the *rhlB* mutant had restored the ability of the *rhlA* mutant to swarm and that they had co-migrated. A similar complementation was also achieved by PG201.

5.3.4.4. *rhlAB* plays a role in biofilm maturation

It has been suggested that swarming motility could be linked to biofilm formation (Fraser et Hughes, 1999; Morris *et al.*, 1999). Investigation of biofilm formation in static cultures by the wild-type strain PG201 and the mutants UO299 and UO287 showed that cellular adhesion is influenced by the expression of *rhlAB* (Fig. 5.6). Under these

experimental conditions, biofilms generated by the *rhlA* mutant UO299 and *rhlB* mutant UO287 contained respectively 35 to 50% and 14 to 18% more biomass than the wild-type biofilm, suggesting that biosurfactant production prevents adhesion or promotes dispersal of cells from biofilm.

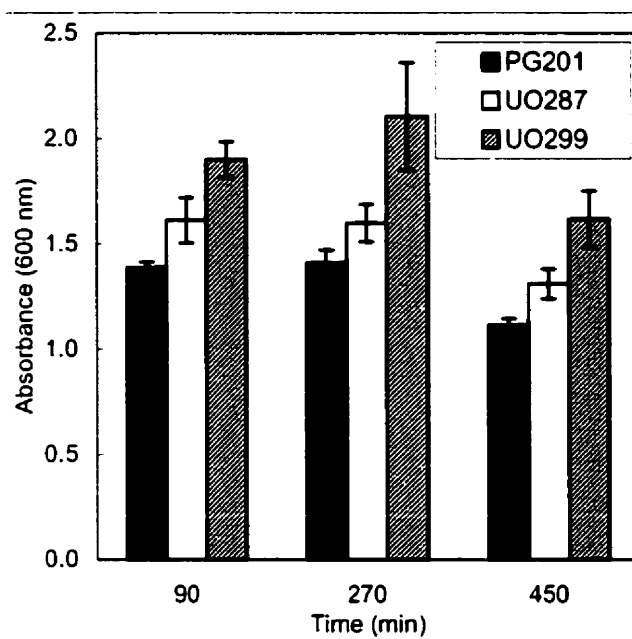


Figure 5.6 Comparison of biofilm formation.

Cells were incubated in polystyrene tubes at 35°C without agitation. At the indicated time intervals, triplicate tubes were rinsed and stained with crystal violet. The amount of stained cells was then quantified by spectrophotometry (A_{600}) after solubilizing the dye in ethanol. This experiment was repeated twice with essentially the same results. Error bars represent the standard deviation.

We also investigated at the cellular level the composition of a biofilm formed in a continuous-flow cell by the fluorescent *P. aeruginosa* 57RP-gfp and the *rhlA* mutant 57RP-98 grown together (Fig. 5.7) (A.-M. Donetti, E. Déziel and R. Villemur, Abstr. 83. American Society for Microbiology Conference on Biofilms, 2000). Quantitative analysis of cells of each strain at various depths in the biofilm showed that the wild-type strain was more abundant at the surface of the biofilm than the *rhlA* mutant. In contrast, the latter was predominant near the substratum (Table 5.5). Furthermore, enumeration of

bacteria in the effluent of the flow cell chamber showed that more wild-type than *rhlA* mutant cells were released from the biofilm. These results suggest that that *rhlAB* plays a critical role in the distribution of bacteria into, and dispersion away from, the biofilm.

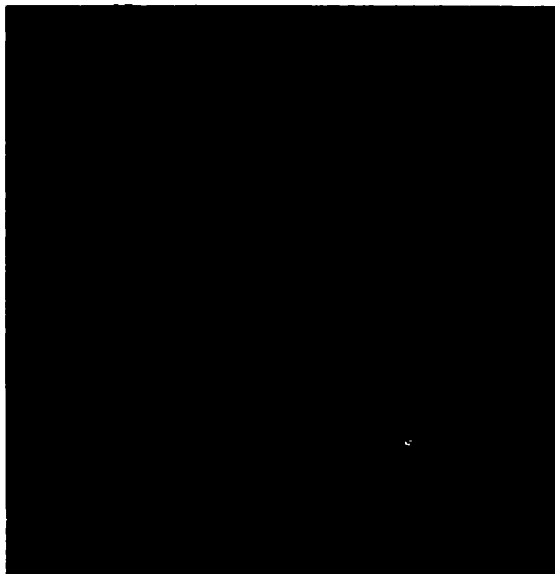


Figure 5.7 Horizontal section obtained by confocal microscopy of a biofilm showing 57RP-gfp cells (wild-type 57RP expressing GFP) and 57RP-98 cells (*rhlA*). All cells are labelled with the fluorescent red dye CY3. 57RP-gfp cells appear yellow and 57RP-98 cells appear red.

Tableau 5.5. Ratios between the number of 57RP-gfp (GFP-tagged wild-type 57RP) and 57RP-98 (*rhlA*) cells in a 8 days-old biofilm formed in a continuous flow chamber.

	Ratio 57RP-gfp : 57RP-98
Base of biofilm	1.0 : 4.0
Middle of biofilm	1.0 : 1.9
Surface of biofilm	2.4 : 1.0
Effluent from the flow-cell	5.0 : 1.0

57RP-gfp and 57RP-98 cells were counted at three different depths: the base (2 μm above the substratum), the middle (16.5 μm) and the surface (21.5 μm) of the 25.5 μm -thick biofilm. In each section, cells were enumerated in three different fields and the average count was determined for each strain. Ratio between 57RP-gfp and 57RP-98 cells was also determined in the effluent of the flow cell by counting colonies of each strain on TSA plates with 100 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin as differential agent.

5.3.5. Discussion

In this study, we investigated the involvement of biosurfactant production on swarming motility of *P. aeruginosa*. We found that rhamnolipid biosynthesis is not required for swarming but that expression of the *rhlA* gene is needed. Analysis by mass spectrometry showed that *P. aeruginosa* produces another class of extracellular amphiphilic lipids displaying tensio-active properties besides rhamnolipids. Moreover, HAHAs are produced in larger amounts in mutants where the rhamnosyltransferase I (RhlB protein) is inactivated and *rhlA* is expressed than in the wild type. *Serratia rubidaea*, which is also capable of swarming motility, similarly produces in parallel two types of surface-active extracellular lipids: rubiwettin RG1, a mixture of glycolipids, and rubiwettin R1, a mixture of its glucose-free fatty acids counterpart (Matsuyama *et al.*, 1990). With the drop-collapsing test, breakdown of the drop was more rapid and spreading slightly more extensive with the supernatant of UO287 than PG201. Accordingly, surface tension measurement of the supernatants showed that the mixture of HAHAs alone can decrease the surface tension lower than the biosurfactants of PG201 (Table 5.3), even if, on a weight basis, they are 20 times less abundant than rhamnolipids (Table 5.4). These

observations, similar to what was reported for rubiwettin R1, indicate that these HAHAs are powerful wetting agents and hence they were named aeruwettin.

The fact that aeruwettin was also observed in cultures of the wild-type strain indicate that its release by the *rhlB* mutant is not simply a result of overproduction, but rather that this biosurfactant is naturally produced by this bacteria. *P. aeruginosa* strain 57RP (Déziel *et al.*, 1999b; Déziel *et al.*, 2000) also releases aeruwettin (F. Lépine, E Déziel, S. Milot and R. Villemur, unpublished results). Our results suggest that *rhlA* is required for swarming motility through its involvement in the production of aeruwettin.

Although it is presumed to be part of the rhamnosyltransferase 1 complex, the exact function of *rhlA* is unknown. A role for the RhlA protein in rhamnolipid precursor biosynthesis had previously been proposed, but not demonstrated (Ochsner *et al.*, 1994a). Our results indicate that *rhlA* is involved in the synthesis of HAHAs, which may be directly released as aeruwettin or coupled to rhamnose by the rhamnosyltransferase encoded by *rhlB* to produce rhamnolipids (E. Déziel, F. Lépine, S. Milot and R. Villemur, unpublished results).

5.3.5.1. Biosurfactant production, swarming motility and biofilm maturation may be related phenomena

Like other virulence/survival factors of *P. aeruginosa*, production of rhamnolipids and apparently, aeruwettin, is controlled by a quorum-sensing regulatory circuitry (Van Delden et Iglewski, 1998). Elevated cellular densities necessarily associated with quorum-sensing are only rarely found in the natural environment, such as in biofilms. In *P. aeruginosa*, flagella and type IV pili are required for both normal biofilm development (O'Toole et Kolter, 1998a) and swarming motility (Köhler *et al.*, 2000). Interestingly, swarming appears to represent an intermediate between swimming and twitching, the latter being also a form of social motility depending on quorum-sensing (Glessner *et al.*, 1999) and requiring cell-to-cell contact (Semmler *et al.*, 1999).

Swarming bacteria usually require two physiological adaptations for swarming to occur : [1] differentiation into elongated and multi-flagellated cells, presumably largely dependent on the viscosity of the environment, and [2] secretion of wetting agents, which is influenced by the nutritional conditions (Fraser et Hughes, 1999; Givskov *et al.*, 1998; Harshey, 1994). A biofilm environment apparently fulfils all requirements for swarming: a specific viscosity resulting from the presence of the exopolysaccharide which forms the matrix of the biofilm, and an elevated cell density allowing induction of the *rhl* quorum-sensing system and expression of *rhlAB*.

This combination of facts prompted us to investigate the effect of biosurfactant production on biofilm formation. Surface attachment was clearly affected by the inactivation of *rhlAB* and the difference, while relatively small for the *rhlB* mutant, was statistically significant and highly reproducible. Results from the flow-cell experiments indicate that biosurfactants influence the location of *P. aeruginosa* cells in a biofilm and that this could be attributed to differences in the ability of cells to disseminate away from the biofilm. This is not surprising since microbially-produced surface-active molecules are largely known to influence interactions of microorganisms with surfaces (Neu, 1996). Examples of inhibition of microbial adhesion by biosurfactants have been reported (Busscher *et al.*, 1997; Velraeds *et al.*, 1996).

5.3.5.2. Biosurfactant production and differentiation into swarming cells are not separate events

It appears from our results that *P. aeruginosa* will only differentiate into swarming cells if the growth medium has an appropriate viscosity and *rhlA* is effectively transcribed. Rescuing of the swarming ability of the *rhlA* mutant required very close presence of cells expressing *rhlA*; biosurfactant-containing supernatant or conditioning of the agar surface was not sufficient. This suggests that direct cell-to-cell contact from *rhlA* expressing cells may be required, maybe because the activity of the RhlA protein modifies the outer

surface of the cell, or its immediate surroundings. This question will require further investigation.

5.3.5.3. The nutritional status regulates swarming

Clearly, biosurfactant synthesis, and thus swarming, are directly influenced by the nutritional environment of the cells. Rhamnolipid production and swarming are inhibited by the presence of NH_4^+ , glutamine, asparagine or arginine as nitrogen source, and promoted by NO_3^- , glutamate or aspartate (Köhler *et al.*, 2000; Mulligan et Gibbs, 1989; Venkata Ramana et Karanth, 1989). This is especially interesting when it is recognised that, among all amino acids, the best chemoattractants carry a nitrogen-containing group on their side chain (Gln, Asn, Arg), whereas their counterparts without nitrogen group (Glu, Asp) elicit the weakest chemotactic response (Kuroda *et al.*, 1995). Since NH_4^+ is preferred over NO_3^- as a source of nitrogen, it appears that less attractive nitrogen sources promote biosurfactant production and swarming. Furthermore, the observation that excess iron prevented swarming suggests that unfavourable nutritional conditions in general may elicit swarming motility as a means to find a new niche with more favourable nutrient supplies. Interestingly, many studies have shown that starvation induces detachment of cells from biofilms (Delaquis *et al.*, 1989; Sawyer et Hermanowicz, 2000).

Mulligan and Gibbs (1989) have found that a direct relationship exists between enhanced rhamnolipid production and increased glutamine synthetase activity. Synthesis of this enzyme, which is upregulated under nitrogen-limiting conditions, is controlled by the RpoN sigma factor (σ^{54} ; (Totten *et al.*, 1990). It is noteworthy that σ^{54} is also required for transcription of the *rhlAB* genes (Ochsner *et al.*, 1994a) and the synthesis of pili (Ishimoto et Lory, 1989) and flagella (Totten *et al.*, 1990), but only a few other virulence factors. These observations offer further evidence that biosurfactant production is closely related to motility and biofilm development, probably reflecting a general role in survival of *P. aeruginosa* in the natural environment and not only as a virulence factor.

5.3.6. Conclusion

Although rhamnolipids have been studied for many decades, their actual physiological function in *P. aeruginosa* is still ambiguous. Activities attributed to these extracellular glycolipids include: [1] promotion of growth on hydrophobic substrates, especially liquid *n*-alkanes (Beal et Betts, 2000; Ochsner *et al.*, 1994a), and it was suggested that this may assist in the utilization of long-chain fatty acids as sources of carbon *in vivo* (e.g. in the lungs of cystic fibrosis patients), [2] solubilisation of the phospholipids of lung surfactant, making them more accessible to cleavage by phospholipase C (Kurioka et Liu, 1967), [3] heat-stable hemolysins (Johnson et Boese-Marrazzo, 1980), [4] antibacterial, mycoplasmacidal and antiviral activities (Lang et Wagner, 1993), [5] inhibition of normal macrophage function (McClure et Schiller, 1996), [6] stimulation of the release of cytokines from airway epithelial cells (Bedard *et al.*, 1993), [7] interference with normal ciliary function, inhibiting functional cilia of rabbit tracheal epithelium and slowing human ciliary beat frequency (Hingley *et al.*, 1986; Read *et al.*, 1992), and [8] mucus glycoconjugate secretagogues (Somerville *et al.*, 1992).

We report here the production of a novel class of biosurfactants in *P. aeruginosa*. Since aeruwettin is concurrently produced with rhamnolipids, and often co-extracted in the purification process, it is likely that many studies about rhamnolipids actually included this other biosurfactant. Although aeruwettin alone seemed sufficient as a wetting agent for conditioning the surface for swarming motility, the wild-type strain always produced larger swarming zones than the *rhIB* mutant (Fig. 5.4), indicating that rhamnolipids assist in the swarming process.

The capacity for surface colonising migration is increasingly recognised as a widespread trait in eubacteria (Fraser et Hughes, 1999; Harshey, 1994). The multicellular and co-operative nature of swarming clearly associates this phenomenon with the natural

propensity of micro-organisms to form biofilms (Eberl *et al.*, 1999). Our results support an involvement of biosurfactant production and swarming motility in biofilm maturation.

5.3.7. Acknowledgements

We are grateful to Sylvain Milot and Marcel Desrosiers for their excellent technical assistance. We thank Urs Ochsner for providing the PG201, UO287 and UO299 strains, Søren Molin for the pJBA28 plasmid, and Barbara H. Iglewski and Luciano Passador for the pECP60 plasmid.

CHAPITRE 6. BIORÉACTEURS À DEUX PHASES LIQUIDES

6.1. MISE EN CONTEXTE

La très faible biodisponibilité de certains polluants hydrophobes comme les HAP représente un obstacle majeur à l'atténuation naturelle, à la mise au point de procédés de biorestauration efficaces et même à l'étude en laboratoire de la biodégradation de ces composés. Dans cet optique, le Groupe de microbiologie de l'environnement de l'INRS-Institut Armand-Frappier, au sein duquel ce travail de doctorat a été effectué, a décidé d'explorer la technique innovatrice des bioréacteurs à deux phases liquides (BDPL). Nous avons publié une revue de la littérature pertinente afin de faire le point sur la question et de favoriser l'optimisation du procédé. Certains des travaux réalisés sur les BDPL par les étudiants candidats à la maîtrise José Marcoux, Amine Benachenhou, Émilie Gauthier et Marco Lainesse, et auxquels j'ai activement participé (voir Annexe), ont été publiés (Marcoux *et al.*, 2000; Villemur *et al.*, 2000).

Cet article a également permis de faire le point sur l'état des connaissances au sujet des stratégies mises de l'avant par les micro-organismes pour accéder aux substrats hydrophobes. Il est apparu évident que les recherches sur cette question avaient énormément diminués dans les années suivants la crise du pétrole (milieu des années '70) pour reprendre graduellement à la fin des années '80 avec la popularité croissante de la biorestauration.

L'article #4 est une synthèse bibliographique publiée en 1999 dans *Biodegradation*, vol. 10 p. 219-233. Elle a été rédigée avec l'objectif principal de faire connaître cette approche innovatrice au gens intéressés par le domaine de la biorestauration, et d'en favoriser l'utilisation par les microbiologistes.

6.2. ARTICLE #4 : TWO-LIQUID-PHASE BIOREACTORS FOR ENHANCED DEGRADATION OF HYDROPHOBIC/TOXIC COMPOUNDS

Eric Déziel^{1,2}, Yves Comeau² and Richard Villemur^{1*}

¹Centre de microbiologie et biotechnologie, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul.
des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

and

²Département des génies civil, géologiques et des mines, École Polytechnique de
Montréal, P.O. box 6079, station Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

(* Corresponding author)

Keywords : Bioavailability; Biodegradation; Bioreactor; Biotreatment; NAPL; Toxicity

6.2.1. Abstract

Two-liquid-phase culture systems involve the addition of a water-immiscible, biocompatible and non-biodegradable solvent to enhance a biocatalytic process. Two-liquid-phase bioreactors have been used since the mid-seventies for the microbial and enzymatic bioconversion of hydrophobic/toxic substrates into products of commercial interest. The increasing popularity of bioremediation technologies suggests a new area of application for this type of bioreactor. The toxicity and the limited bioavailability of many pollutants are important obstacles that must first be overcome in order to improve biodegradation processes. Two-liquid-phase bioreactors have the potential to resolve both limitations of biotreatment technologies by the enhancement of the mass-transfer rate of compounds with low bioavailability, and by the controlled delivery of apolar toxic compounds. This technology can also be useful to accelerate the enrichment of microorganisms degrading problematic pollutants. In this paper, we discuss the application of two-liquid-phase bioreactors to enhance the biodegradation of toxic/poorly bioavailable contaminants. Important microbial mechanisms involved in this type of system are described. Uptake of the substrates can be achieved by microorganisms freely dispersed in the aqueous phase and/or bound at the interface between the aqueous and the immiscible phases. Production of surface-active compounds and adhesion abilities are microbial features involved in the process. General guidelines for the design of two-liquid-phase bioreactors for biodegradation purposes are presented. Solvent selection should be established on specific criteria, which depend on the characteristics of target compound(s) and the microorganism(s) implicated in the biodegradation process. The central importance of maximizing the interfacial surface area is highlighted. The potential of this approach as an alternative to current biotreatment technologies is also discussed.

Abbreviations: NAPL, non-aqueous-phase liquid; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; TLPB, two-liquid-phase bioreactor; TLPS, two-liquid-phase system.

6.2.2. Introduction

Bioremediation, the biodegradative removal or reduction of hazardous pollutants, represents an increasingly popular application and active area of research in biotechnology (Alexander, 1994). A wide variety of bioreactor technologies have been developed for the treatment of solids, liquids and gases contaminated with multiple organic compounds (Cookson, 1995). The main advantage of bioreactors is that physicochemical conditions can be controlled and optimized, in order to enhance the activity of microorganisms. They are mainly used for complex contamination cases, but their associated high costs and limited treatment efficiency for some toxic/hydrophobic compounds sometimes limit their usefulness.

Two-liquid-phase bioreactors have been used since the mid-seventies for the microbial and enzymatic bioconversion of hydrophobic/toxic substrates into products of commercial significance (Furuhashi *et al.*, 1986; Schwartz et McCoy, 1977; Wubbolts *et al.*, 1996). Recently, there has been increasing interest in the application of two-liquid-phase bioreactors to enhance the biodegradation of organic compounds of environmental relevance (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993; Jimenez et Bartha, 1996; Vanneck *et al.*, 1995).

Usually, two-liquid-phase systems consist of an aqueous phase and a water-immiscible liquid phase present in excess of mutual saturation (special situations such as aqueous/aqueous or organic/organic systems will not be considered in this chapter). Although they are often referred to as biphasic cultures, at least four phases are actually present in this type of system: hydrophobic phase, aqueous phase, gas phase, and cells (van der Meer *et al.*, 1992a). The expressions «two-liquid-phase» systems (TLPSs) or bioreactors (TLPBs) are, therefore, used in the text.

TLPBs can be divided in two categories (Erickson *et al.*, 1969). The first category encompasses systems where the water-immiscible liquid is the substrate for the

microorganisms. This includes: [1] industrial processes for the biotransformation of poorly-soluble substrates into products of interest, e.g. petroleum hydrocarbon fermentations for the production of single-cell proteins (Amin *et al.*, 1973; Sheenan, 1984); and [2] biosynthesis of value-added chemicals from compounds like *n*-alkanes (Favre-Bulle *et al.*, 1991; Preusting *et al.*, 1993) or other lipophilic substrates (Harbron *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1990).

In the second category of TLPB, the non-aqueous-phase liquid (NAPL) is not the substrate but is added to the bioreactor to enhance a process. The NAPL acts as a non-biodegradable and biocompatible liquid phase reservoir in which apolar organic substrates are dissolved. Such a system has three different areas of application:

- (i) The NAPL may be added to the bioreactor to continuously remove the end-products of a biotransformation process. This can alleviate a decrease in productivity due to product-induced feedback inhibition or toxicity, and facilitate downstream product recovery. This process is called extractive fermentation (or biocatalysis) (Daugulis, 1994; Freeman *et al.*, 1993);
- (ii) The NAPL may be introduced in the bioreactor to control the aqueous concentration of a toxic, low polarity substrate. In this situation, the hydrophobic phase acts as a reservoir for controlled delivery of the inhibitory compound to the aqueous phase where biocatalysis occurs (e.g. Collins *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1996);
- (iii) Finally, the best known application of TLPBs is the addition of a NAPL to enhance the biotransformation of a water-insoluble substrate by increasing its bioavailability to biocatalysts (Nikolova et Ward, 1993; Van Sonsbeek *et al.*, 1993).

The last two applications of TLPBs (partitioning of toxic and water-insoluble substrates by the addition of an inert NAPL) have been used both in biotransformation processes for

the synthesis of industrial chemicals and for the complete biodegradation of compounds, e.g. organic pollutants.

There are numerous publications concerning research work on TLPBs in the context of biotechnological production processes, and this topic has been extensively reviewed (Brink et Tramper, 1985; Brink *et al.*, 1988; Daugulis, 1997; Laane *et al.*, 1987; Lilly *et al.*, 1987; Nikolova et Ward, 1993; Van Sonsbeek *et al.*, 1993). The purpose of this paper is consequently not to address this area of application but rather to present a review of the literature in which this technique has been used in biodegradation/biotreatment processes. We discuss the following points: [1] the specific microbial mechanisms involved in TLPSs, [2] the use of TLPBs to enhance the biodegradation of toxic/poorly bioavailable compounds, [3] the parameters that should be considered in the design and optimization of TLPBs in biotreatment situations, and [4] the potential of this approach as an alternative to current biotreatment technologies.

6.2.3. Microbial mechanisms involved in TLPBs

Erickson et al. (1969) were the first to describe growth models for TLPSs where the growth substrate is dissolved in an inert dispersed phase. They, and others (e.g. Woodley *et al.*, 1991), have indicated that in this type of system the reaction can take place [1] uniformly throughout the aqueous phase after diffusion or solubilization of the substrate, and [2] at the liquid-liquid interface by direct attachment to the immiscible solvent phase (Figure 6.1). Therefore, understanding and predicting microbial growth behavior on water-insoluble (and toxic) chemicals in TLPBs depends on the location of the reaction. Surface-attached microbial cells may utilize the substrate directly from the water-immiscible phase, while cells that grow only in the aqueous phase take up dissolved or pseudosolubilized substrate from the aqueous medium (Miura *et al.*, 1977; Nakahara *et al.*, 1977). As discussed by Westgate et al. (1995), these two mechanisms are difficult to distinguish experimentally because an increase in interfacial area will increase not only the surface for cell contact but also for diffusional mass-transfer rate.

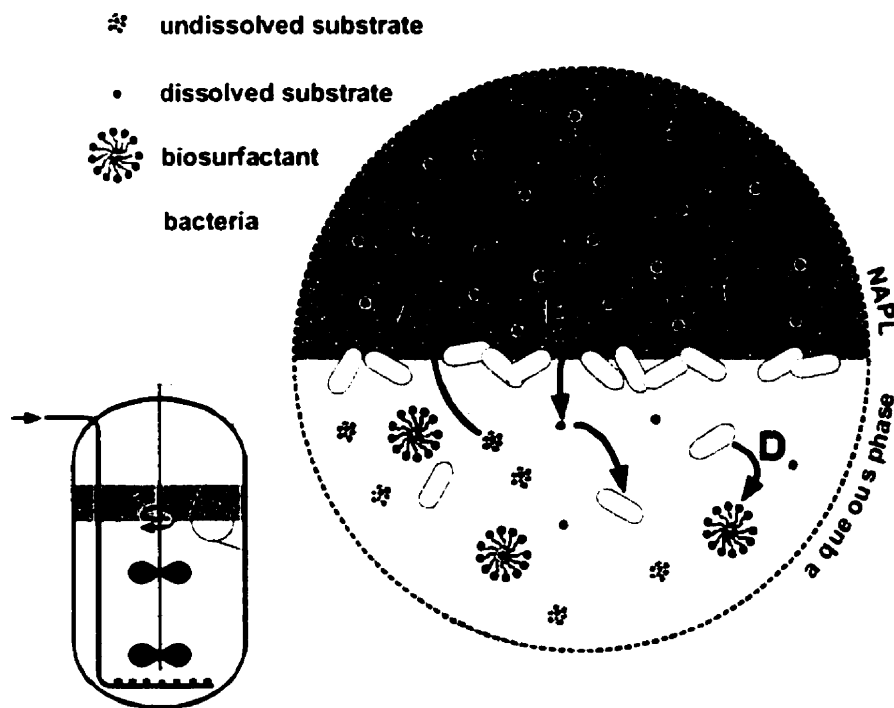


Figure 6.1 Physico-chemical and biological mechanisms implicated in TLPBs.

[A] Dissolution of hydrophobic/toxic compounds in the NAPL. [B] Partitioning of the molecules in the aqueous phase and uptake by microorganisms in suspension. [C] Interfacial uptake of the substrate by adhering microorganisms. [D] Production of surface-active and solubilizing substances.

Three modes of uptake of poorly water-soluble substrates by microorganisms are generally considered (Goswami et Singh, 1991; Huang et Chou, 1990; Nakahara *et al.*, 1977). In the first mode, only the substrate dissolved in the aqueous phase is bioavailable and the degradation rate depends on the mass-transfer rate from the nonaqueous to the aqueous phase. This is the model generally accepted for solid compounds such as low molecular weight polyaromatic hydrocarbons (Volkerling *et al.*, 1992; Wodzinski et Coyle, 1974) but considered not to contribute significantly to growth on insoluble substrates, such as long chain ($\geq C_{12}$) alkanes (Erickson et Nakahara, 1975; Singer et Finnerty, 1984). In TLPBs, biodegradation rates of compounds dissolved in NAPL are often higher than partitioning rates from nonaqueous to aqueous phases (Bouchez *et al.*,

1997b; Efroymson et Alexander, 1991; Efroymson et Alexander, 1994; Labare et Alexander, 1995; Ortega-Calvo *et al.*, 1995; Osswald *et al.*, 1996). This indicates that the maximum biodegradation rate of compounds present in NAPLs cannot be predicted from their dissolution rate. Consequently, growth in TLPSs will be best described by the next two uptake mechanisms where microbial growth and activity increase the bioavailability of the NAPL-dissolved substrate.

In the second uptake mode, cells come in direct contact with the NAPL. A biofilm may develop at the interface (Marin *et al.*, 1996; Rosenberg, 1989), and microorganisms acquire the substrate by transfer near the point of contact through their membrane (interfacial uptake). The way by which attached cells acquire their substrate from the NAPL is still obscure. Nevertheless, it may simply be that substrate concentration is higher in the aqueous phase near the interface. Cell adhesion onto surfaces is known to depend on the culture medium, culture conditions and the physiological activity of the cells (Rosenberg, 1991). For some microorganisms, cell attachment is of great significance and even a prerequisite for substrate uptake. Non-adhesive mutants of alkane-degrading bacteria could not grow on hexadecane (Rosenberg et Rosenberg, 1981). Initial adhesion is due to nonspecific hydrophobic interactions (Singer et Finnerty, 1984). Cell surface hydrophobicity correlates well with the ability to adhere to surfaces (Van Loosdrecht *et al.*, 1987a; Vanhaecke *et al.*, 1990). Bell (1973) found that when long chain fatty acids dissolved in pristane were used as carbon source, the growth of *C. tropicalis* having a hydrophobic surface was improved, but that of *Saccharomyces cerevisiae* having a hydrophilic surface was unaffected. It has been demonstrated that cells cultured on hydrocarbon or oil surfaces become more hydrophobic than cells growing on soluble substrates (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b; Gutierrez et Erickson, 1977; Neufeld *et al.*, 1980; Ng et Hu, 1989). Likewise, many studies showed a decrease in the number of cells in the aqueous phase and an accumulation of cells at the interface (Efroymson et Alexander, 1991; Jimenez et Bartha, 1996; Vanneck *et al.*, 1995). In a TLPB where paraffin oil was added to enhance the biodegradation of pyrene, bacteria

collected at the interface mineralized pyrene 8.5 times faster than free cells from the aqueous phase (Jimenez et Bartha, 1996). Under certain circumstances, preventing the adhesion of microorganisms to liquid hydrocarbon substrates by a surfactant suppresses their activity. For example, the nontoxic surfactant Triton X-100 suppressed the adhesion of an *Arthrobacter* strain to heptamethylnonane containing the growth substrate hexadecane, preventing its biodegradation (Efroymson et Alexander, 1991).

Finally, in the third uptake mechanism, microorganisms produce surface-active compounds causing the formation of small (less than 1 μm) droplets (emulsification) or micelles (pseudosolubilisation) that are directly assimilated. The production of surfactants and emulsifiers by microorganisms growing on liquid hydrocarbons is well documented (Desai et Banat, 1997; Hommel, 1990). However, the exact mechanism by which the producing microorganisms take advantage of this ability is poorly understood. Emulsification of the NAPL is sometimes encountered in TLPBs, suggesting that microorganisms are producing surface-active agents. The presence of adherent microbial cells at the surface of oil droplets also stabilises emulsions by preventing coalescence (Erickson et Nakahara, 1975; Rosenberg, 1989). Ascon-Cabrera & Lebeault (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b) attributed the increase in the interfacial area between the two liquid phases during a culture, caused by the formation of an emulsion, to a reduction in the interfacial tension. Osswald et al. (1996) observed that bacterial activity increased the rate of styrene partitioning in a TLPB. From the biodegradation rate that was higher than the partitioning rate and by a similar behavior when a synthetic surfactant was added, they deduced that the bacteria were releasing solubilizing agents. In addition, surface-active compounds retained on the cell surface could be involved in the regulation of microbial surface hydrophobicity, further linking the second and third uptake modes (Neu, 1996).

All three uptake mechanisms may happen consecutively or simultaneously in a culture system, depending on the properties of microorganisms, the type of substrate, and growth

conditions. A growth model can be described by the following sequence of events (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b; Ortega-Calvo et Alexander, 1994; Prokop *et al.*, 1972): [1] at low cell density, growth occurs on the dissolved substrate portion; [2] while biomass and substrate requirements are increasing, cells become more hydrophobic and adherent and/or the more adherent cells are located near the interface where the substrate is more abundant; [3] cells grow as a biofilm covering the available surface on large NAPL droplets, consuming the substrate from the inert reservoir solvent; [4] growth in the continuous phase slows down because of the decreasing mass-transfer rate resulting from the depletion of the content of droplets; [5] the increasing number of cells at the drop surface and the production of surface-active substances give rise to a reduction in interfacial tension, which leads to the emulsification of the NAPL and an increase in the interfacial area for growth and mass-transfer. In some cases, the emulsification and solubilization of the NAPL result in the formation of submicron droplets or pseudosolubilisation into micelles (Chakravarty *et al.*, 1975; Goma *et al.*, 1974; Velankar *et al.*, 1975) that are rapidly consumed; and finally [6] cells come off the depleted NAPL droplets and colonize fresh solvent droplets (Rosenberg, 1989).

A special situation is encountered with toxic apolar substrates, since both emulsification and interfacial contact may have inhibitory effects on microbial activity. Nevertheless, as discussed in the section «Design of TLPBs for biodegradation purposes» (3.3.1.6.2.5), toxicity problems can be avoided with careful selection of the solvent and parameters of bioreactor operations.

In summary, microbial growth and activity in TLPBs increase the interfacial area between the two liquid phases, and this in turn promotes the mass-transfer rate of hydrophobic substrates from the NAPL to the aqueous phase, increases the surface available for attachment and ultimately improves biodegradation rates.

6.2.4. Use of TLPBs to enhance biodegradation of toxic/poorly bioavailable compounds

6.2.4.1. Rationale

Biological treatment of hazardous wastes and polluted effluents is an increasingly popular alternative to traditional physico-chemical and thermal technologies (Head, 1998). Most organic contaminants can be detoxified, and often mineralized, by microorganisms (Allard et Neilson, 1997). A variety of bioremediation processes have been designed for several pollutant classes and sources (Cookson, 1995). However, even if microorganisms with the required degradative capacity are present and adequate environmental conditions for growth and degradation are found, the applicability of bioremediation is sometimes restricted. Two important obstacles, limited bioavailability and toxicity, are emphasized in this section.

Firstly, the pollutant may be insufficiently available to the microflora (Harms et Bosma, 1997; Mihelcic *et al.*, 1993; Providenti *et al.*, 1993). For example, some organic contaminants have very low aqueous solubilities (e.g. polyaromatic hydrocarbons), however only the water-dissolved fraction of chemicals is usually assumed to be available to microorganisms (Stucki et Alexander, 1987; Thomas *et al.*, 1986; Wodzinski et Coyle, 1974). Secondly, some pollutants (e.g. styrene, phenol) are toxic to microorganisms (Sikkeman *et al.*, 1995), and growth inhibition at high substrate concentration prevents the effective biodegradation of these contaminants.

TLPBs have the potential to resolve these two limitations of biotreatment technologies by controlling the mass-transfer rate and aqueous phase concentration of hydrophobic/toxic compounds. This is especially interesting when it is recognized that both problems usually require opposing solutions. Moreover, TLPBs can be used to select and isolate microorganisms that can degrade these types of molecules. Key information from studies that used TLPBs to evaluate the biodegradation of environmentally relevant compounds is presented in Table 6.1.

Tableau 6.1. TLPBs in which the biodegradation of environmentally relevant compounds has been observed

NAPL	Substrates	Microorganisms	References
Pristane	Eicosane, docosane, octacosane	<i>Candida intermedia</i> , <i>C. lipolytica</i>	(Miller et Johnson, 1966)
Pristane	Liquid fraction of <i>n</i> -alkanes	<i>Torulopsis</i> sp.	(McLee et Davies, 1972)
HMN	Naphthalene	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Wodzinski et Larocca, 1977)
Dibutyl phtalate	Benzene	<i>Pseudomonas</i> sp. 50	(Rezessy-Szabo et al., 1987)
Dibutyl phtalate	Styrene	<i>P. putida</i>	(Bestetti et al., 1989)
HMN	Naphthalene, hexadecane	<i>Arthrobacter</i> sp.	(Efroymsen et Alexander, 1991)
Hexadecane	1,2,3-trichlorobenzene (reductive dechlorination)	Anaerobic mixed culture	(Holliger et al., 1992)
Silicone oil	1,2-dichlorobenzene, 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene, ethyl butyrate, 2-ethylbutyraldehyde	Mixed culture	(Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993)
Silicone oil	Styrene	Mixed culture	(El Aalam et al., 1993)
HMN	Phenanthrene	<i>P. aeruginosa</i> AK1	(Köhler et al., 1994)
Decane, dodecane, hexadecane	Naphthalene	<i>Corynebacterium</i> sp.	(Gamerding et al., 1995)
Silicone oil	Naphthalene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]pyrene	Mixed culture	(Vanneck et al., 1995)
Silicone oil	Ethyl butyrate	<i>Candida</i> sp. CF3	(Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b)

Tableau 6.1 (con't). TLPBs in which the biodegradation of environmentally relevant compounds has been observed (continued)

NAPL	Substrates	Microorganisms	References
Silicone oil	2,4,6-trichlorophenol	<i>Pseudomonas</i> sp. SP1 and SP2, <i>Arthrobacter</i> sp. AR2, <i>Alcaligenes</i> sp. AL2	(Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995a)
Decane, octadecane, isooctane, hexane, cyclohexane, toluene, benzene	Naphthalene, biphenyl	<i>Pseudomonas</i> sp. DS-1051, <i>Pseudomonas</i> sp. DS-313, <i>Bacillus</i> sp. DS-1051	(Abe <i>et al.</i> , 1995)
Decane	Polychlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins (reductive dechlorination)	Anaerobic mixed culture	(Barkovskii et Adriaens, 1995)
Silicone oil	Styrene	Mixed culture	(Osswald <i>et al.</i> , 1996)
Diethyl sebacate	Pentachlorophenol	<i>Arthrobacter</i> sp. ATCC 33790	(Munro et Daugulis, 1997)
Paraffin oil, tridecylcyclohexane, cis-9-tricosene, squalane, squalene	Pyrene	<i>Mycobacterium</i> sp.	(Jimenez et Bartha, 1996)
2-Undecanone	Phenol	<i>P. putida</i> ATCC 11172	(Collins et Daugulis, 1996, 1997a; Collins et Daugulis, 1997b)
Silicone oil, HMN	Phenanthrene	<i>Pseudomonas</i> sp. SPheNa1	(Bouchez <i>et al.</i> , 1995)
HMN	Phenanthrene, Fluoranthene, pyrene	<i>Pseudomonas</i> sp. SPheNa1, <i>Rhodococcus</i> sp. SFltNa1 and SPyrNa1	(Bouchez <i>et al.</i> , 1997b)

Pristane: 2,6,10,14-tetramethylpentadecane, HMN: 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane

6.2.4.2. TLPBs for the enhancement of mass-transfer of compounds with limited bioavailability

The bioavailability of a molecule may be characterized by its mass-transfer rate relative to the rate of its uptake, and degradation, by the microorganisms (Bosma *et al.*, 1997). Microbial degradation of sparingly soluble compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), is restricted by their solubilization rate (Volkerling *et al.*, 1992). Consequently, methods to improve the bioavailability and the biodegradation of hydrophobic compounds are required. The principal approach to increase the mass-transfer to the aqueous phase is by enhancing the solubilization or dissolution rates. This can be achieved by increasing the total surface area between the substrate and the aqueous phase. It is often accomplished by homogenization (e.g. mechanical agitation), and/or by the addition of surface-active agents, i.e. surfactants (Edwards *et al.*, 1994). Surfactants are amphipathic molecules with both hydrophobic and hydrophilic moieties that partition preferentially at the interface between fluid phases with different polarities, such as oil-water or air-water interfaces (West et Harwell, 1992). They can reduce surface and interfacial tension and promote the solubilization, emulsification and dispersion of poorly soluble compounds (Rouse *et al.*, 1994). Synthetic surfactants have been extensively used to solubilize, and occasionally increase the biodegradation of, hydrophobic contaminants under both laboratory and field conditions (Aronstein et Alexander, 1992; Tiehm, 1994; Vigon et Rubin, 1989). However, results concerning their effectiveness have been highly contradictory (Liu *et al.*, 1995; Rouse *et al.*, 1994). Many difficulties related to the utilization of synthetic surfactants are recognized. Indeed, they can prevent the biodegradation of contaminants due to their toxicity to microorganisms (Tiehm, 1994) or sequestration of compounds within surfactant micelles (Guha et Jaffé, 1996; Laha et Luthy, 1991). Moreover, they are often costly, poorly specific toward contaminants, difficult to biodegrade and may adsorb onto soil particles.

Water-miscible solvents can also be used to enhance the solubility and dispersion of hydrophobic compounds; however they are usually toxic towards microorganisms (Inoue

et Horikoshi, 1991; Vermuë *et al.*, 1993), thus, preventing their effective utilization to increase the bioavailability of non-polar compounds.

In 1966, Miller & Johnson (Miller et Johnson, 1966) observed that the usefulness of surfactants to disperse and enhance growth of a mixed yeast culture on solid *n*-alkanes was limited. They successfully circumvented this problem by dissolving these insoluble hydrocarbons in pristane [2,6,10,14-tetramethylpentadecane], an immiscible liquid that was not attacked by the microorganisms. A prolonged exponential growth of a *Pseudomonas aeruginosa* strain was achieved with phenanthrene as the substrate, when dissolved in the solvent 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (Köhler *et al.*, 1994). Jimenez & Bartha (Jimenez et Bartha, 1996) tested several NAPLs to enhance pyrene mineralization by a *Mycobacterium* sp. strain. With the ones mentioned in Table 6.1, they reported initial rates of mineralization of pyrene between 116 and 182 µg/mg of protein/h compared to 81 µg/mg/h in the culture without NAPL. Under anaerobic conditions, reductive dechlorination of the extremely insoluble compound octachloro-dibenzo-*p*-dioxin (octaCDD) by a mixed microflora was increased by the addition of decane (Barkovskii et Adriaens, 1995). Higher transfer rates provided by the NAPL/water interfacial area help to overcome bioavailability limitations.

6.2.4.3. TLPBs for the controlled delivery of apolar toxic compounds

Several poorly water-soluble organic compounds are biodegradable but toxic to microorganisms when supplied above a particular inhibitory concentration. The low concentrations tolerated before inhibition of microbial activity limits the efficiency and the performance of biotreatment systems. Various methods have been used to protect cells from toxic substrates, such as membrane reactors, biofilm systems, immobilization, and encapsulation. TLPSs represent an effective and flexible alternative. By careful selection of the NAPL and the operating conditions, the immiscible phase of a TLPB can act as a 'reservoir' providing inhibitory substrates continuously via diffusion into the aqueous phase. The concentration within the aqueous phase is maintained at a non-toxic

level, based on the equilibrium partitioning coefficient of the compound, which partitions preferentially into the hydrophobic phase.

As demonstrated by Collins & Daugulis (1996, 1997a; 1997b), one of the benefits of TLPBs is the self-regulating nature of the process, since the delivery rate of toxic substrates is determined by the metabolic requirements of the microorganisms (uptake rate). Using a strain of *Pseudomonas putida* and 2-undecanone as the NAPL in a TLPB operated in a fed-batch mode, a volumetric consumption rate of 175 mg/l·h of phenol was reached without problems of substrate toxicity (Collins et Daugulis, 1997a). It was favorably compared to the maximum volumetric phenol consumption rate of 37.5 mg/l·h previously reported for a conventional bioreactor (Fugita *et al.*, 1993). In 1987, Rezessy-Szabó *et al.* (1987) cultivated a *Pseudomonas* strain on high concentrations of benzene, circumventing the substrate toxicity by the addition of dibutyl phthalate. The same NAPL was used by Bestetti *et al.* (1989) to grow a *P. putida* strain with styrene as substrate. With a chemostat containing 20% v/v of silicone oil, El Aalam *et al.* (1993) cultivated a *P. aeruginosa* strain on styrene (lethal aqueous concentration, 70 mg/l) up to a very high specific activity of 293 mg g⁻¹ dry cells h⁻¹. The toxic wood-preservative compound pentachlorophenol (PCP), a solid, xenobiotic chemical, is inhibitory at a low concentration (McAllister *et al.*, 1996). *Arthrobacter* sp. ATCC 33790 is able to utilise PCP as sole substrate, but inhibition occurs above a concentration of 130 mg/l in batch cultures (Stanlake et Finn, 1982). Using this strain, Munro & Daugulis (1997) designed a TLPS capable of degrading 7.5 g of PCP in 40 h (187.5 mg/l h). This system was composed of a 2 l fermenter containing 1 l aqueous medium, 10 g of PCP and 500 ml of diethyl sebacate as the specifically selected NAPL.

6.2.4.4. TLPBs for the enrichment of xenobiotic-degrading microorganisms

The selection and the isolation of microorganisms able to degrade compounds that are poorly water-soluble and/or toxic is often one of the first difficulties encountered in biodegradation processes. Addition of a NAPL has the potential to shorten the

acclimation period required for the isolation of adapted microorganisms. Only low concentrations of toxic substrates can be added in classical aqueous enrichment cultures because of substrate inhibition problems. However, these could well be below the threshold concentration required for the creation of a selective advantage (Boethling et Alexander, 1979; Spain et van Veld, 1983).

A TLPB with silicone oil as the NAPL has been used for the rapid selection of microorganisms able to degrade two mixtures of chlorinated and nonchlorinated hydrophobic/toxic compounds (see Table 6.1 Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993). The authors obtained a stable consortium on chlorobenzenes in a relatively short acclimation period (30 days). This was attributed to the high concentrations of toxic substrates they could add to the enrichment culture via the water-immiscible phase. Similarly, Holliger *et al.* (1992) used hexadecane as a NAPL for the enrichment and the maintenance of an anaerobic mixed culture that reductively dechlorinates 1,2,3-trichlorobenzene (1,2,3-TCB) to 1,3-dichlorobenzene. Since TLPBs offer the possibility to circumvent the limitations usually encountered when studying hydrophobic or toxic compounds, they could represent potentially useful research tools for studies on biodegradability testing, catabolic pathways, kinetics of biodegradation, etc. (Bouchez *et al.*, 1997a; Bouchez *et al.*, 1995; Bouchez *et al.*, 1997b; Prokop *et al.*, 1971).

6.2.5. Design of TLPBs for biodegradation purposes

6.2.5.1. Selection of an appropriate NAPL

A variety of water-immiscible organic solvents have been used to facilitate the biodegradation of hydrophobic/toxic pollutants (Table 6.1). As stated by Munro & Daugulis (1997), the criteria to consider for the selection of an appropriate NAPL for biotreatment processes are essentially the same as for extractive fermentation, except that the compound of interest is the substrate rather than the product. Based on a strategy established for the choice of a solvent in extractive biocatalysis (Bruce et Daugulis,

1991), they proposed a systematic approach to simplify the selection of a NAPL for improved biodegradation. The properties that should be considered include: biocompatibility, high solubilization capacity for the substrate, immiscibility, and non-biodegradability (Daugulis, 1997).

The biocompatibility and potential toxicity of solvents to microorganisms have been extensively discussed in the literature (Bruce et Daugulis, 1991; Nikolova et Ward, 1993). It is known that many organic solvents suppress microbial proliferation and metabolism (Lilly *et al.*, 1987). The ability of a microorganism to grow in the presence of an organic solvent is related to the solvent polarity, where higher activity retention correlates with lower polarity (Brink et Tramper, 1985). Many solvent parameters have been studied in order to correlate biocatalytic activity and solvent hydrophobicity. The logarithm of the octanol-water partition coefficient ($\log P_{ow}$) is currently accepted as the best measure of a solvent's biocompatibility (Inoue et Horikoshi, 1991; Laane *et al.*, 1985; Laane *et al.*, 1987). As a general trend, solvents with high values of $\log P_{ow}$ (4.0 or higher) are not toxic to biocatalysts (Laane *et al.*, 1987; Vermuë *et al.*, 1993). However, tolerance to solvents is highly variable between different bacterial species, Gram-negative bacteria usually being more tolerant than Gram-positive ones (Harrop *et al.*, 1989; Inoue et Horikoshi, 1991; Vermuë *et al.*, 1993). For example, bacterial strains able to tolerate and even degrade solvents with $\log P_{ow}$ as low as 2.3 have been isolated (Cruden *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1993), whereas some bacteria are inhibited at a $\log P_{ow}$ below 7 (Inoue et Horikoshi, 1991). Biocompatibility experiments with a range of solvents with different $\log P_{ow}$ should therefore be conducted in order to determine the critical $\log P_{ow}$ for the microorganism(s) to be used (Collins et Daugulis, 1997a). The $\log P_{ow}$ of any solvent can be obtained experimentally, but it can also be calculated accurately from hydrophobic fragmental constants by the procedure described by Rekker (1977).

A high solubility of substrate in the NAPL is beneficial since it will insure a good capacity for the substrate and allow the use of lower volumes of NAPLs. For toxic

substrates, the mass partition coefficient, defined as the ratio of the substrate concentration in the NAPL to the substrate concentration in the aqueous phase (Bruce et Daugulis, 1991), should be as high as required for the aqueous phase concentration to remain below the inhibitory level (Collins et Daugulis, 1997a; Munro et Daugulis, 1997), especially at a high substrate concentration in the system. On the contrary, this coefficient should not be restrictive for hydrophobic substrates (Prichanont *et al.*, 1998); if microbial activity is exclusively located in the aqueous phase, the mass partition coefficient should allow the aqueous concentration of hydrophobic/non-toxic compounds to approach their saturation concentration (as determined under abiotic conditions).

The aqueous solubility of the NAPL will influence the solubility of the substrate in the aqueous phase (co-solvent effect) and the equilibrium concentration. It should also be low enough to minimize solvent loss. Furthermore, the interfacial tension between the NAPL and the aqueous phase will affect the formation of an emulsion. The increased surface area resulting from emulsion formation is beneficial for biodegradation activities (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b); as discussed in the Microbial mechanisms section), but if the emulsion is too stable, this may represent a major problem in sampling of the two phases for analytical purposes (Munro et Daugulis, 1997).

Biodegradability of the added NAPL is rarely a concern when using a single microorganism as biocatalyst since the limits of the carbon source spectrum can be rather easily determined, first by a survey of the literature, then by cultivation tests (Collins et Daugulis, 1996, 1997a; Collins et Daugulis, 1997b; Munro et Daugulis, 1997). However, in the case of mixed microbial cultures, the choice of solvents is greatly reduced because, after an adaptation period, microorganisms will acquire the ability to attack almost any organic molecules (van der Meer *et al.*, 1992b). If the NAPL is eventually used as a growth substrate, then competition with the target compounds to be degraded could arise (Morrison et Alexander, 1997) and, even, an enrichment for solvent-degrading microorganisms is likely.

Higher-molecular-weight compounds, especially those with multiple condensed ring structures and with highly branched or substituted compounds, are relatively resistant to microbial attack (Atlas, 1988). Branched alkanes that are liquid at room temperature are therefore suitable choices. In one of the first investigations conducted to study the bioavailability and degradation of a poorly water-soluble compound (naphthalene) dissolved in a NAPL, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) was chosen because it was not biodegraded by the *Pseudomonas* sp. strain used (Wodzinski et Larocca, 1977). The same NAPL was later selected by others (Table 6.1) and it resisted degradation by mixed microbial cultures (Ghoshal *et al.*, 1996; Morrison et Alexander, 1997). Apparently, HMN can withstand biodegradation because of its terminal methyl groups (Schaeffer *et al.*, 1979).

Ascon-Cabrera & Lebeault (1993, 1995a, b), and subsequently others (Table 6.1), have used silicone oils (polydimethylsiloxanes) because of their hydrophobicity, chemical stability and resistance to hydrolytic and oxidative breakdown. Although this NAPL was apparently not attacked by the microorganisms in several cases (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993; Osswald *et al.*, 1996), some studies suggest that it may under some conditions be degradable via abiotic and biotic reactions (Carpenter *et al.*, 1995; Stevens, 1998).

As mentioned previously, hexadecane was chosen to control the delivery of a toxic substrate (1,2,3-TCB) and decane was used to enhance the bioavailability of an hydrophobic one (octaCDD) to anaerobic mixed cultures (Barkovskii et Adriaens, 1995; Holliger *et al.*, 1992). Although they are easily attacked under aerobic conditions, saturated alkanes were selected because they are generally considered to be non-biodegradable under highly reduced, methanogenic conditions (Zehnder et Svensson, 1986).

Additional characteristics to consider include low viscosity, low volatility, high melting/boiling points, low flammability, availability, and cost (Bruce et Daugulis, 1991; Nikolova et Ward, 1993). We can conclude from these numerous criteria that the selection process for a non-biodegradable NAPL should be systematic and specific to each situation. A lot of information about the microorganisms implicated in the biodegradation and the targeted substrates are required before a sensible choice can be made.

6.2.5.2. Determination of optimal operation parameters

In a TLPB, the most critical factor to optimize is the interfacial area between the two liquid phases (Nakahara *et al.*, 1977; Woodley *et al.*, 1991). Microbial activity, both at the interface and in the aqueous phase, relies upon the mass-transfer rate of substrate molecules from the NAPL to the aqueous phase, which is mainly governed by the size of the interfacial area (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b; Dunn, 1968; Wodzinski et Larocca, 1977). Since higher growth rates are observed at maximal interfacial area, it is essential to maintain the interfacial area high enough not to restrict microbial activity.

The volumetric liquid-liquid interfacial area, a [$\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$], is calculated following (Bailey et Ollis, 1986):

$$a = \frac{6 \cdot \phi}{d_{sm}}$$

where d_{sm} [$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2}$] is the Sauter mean (surface averaged) droplet diameter and ϕ corresponds to the dispersed-phase volume fraction, which is the ratio of the NAPL volume to the total liquid volume (phase ratio). It can be seen that the interfacial area increases with a decrease in the mean drop size. The Sauter mean diameter can be estimated directly from droplet size distribution measurements (Gutierrez et Erickson, 1977; Prokop *et al.*, 1972) and correlated to Calderbank's expression, which takes into account the phase ratio (solvent phase holdup), the turbulence intensity (agitation rate),

and the interfacial tension (Chatzi *et al.*, 1989). Consequently, the interfacial area is principally influenced by these three parameters, plus microbial growth (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b; Nakahara *et al.*, 1977; Wang et Ochoa, 1972).

The optimal phase ratio which will generate the highest interfacial area is a parameter influenced by many determinants, such as the physical conformation of the bioreactor, the properties of the NAPL (density, viscosity, etc.) and the mixing rate. Equation 1 shows that the interfacial area increases with an increased phase ratio. However, it is also known that NAPL drop diameters have a tendency to increase with an increase in the phase ratio (Prokop *et al.*, 1972). Ascon-Cabrera & Lebeault (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993, 1995b) have studied the effect of variations of a NAPL phase fraction (8.3 to 83 % v/v silicone oil) on the interfacial area and observed maximal values between 20 and 40 %. A wide range of phase ratios have been used but few studies have been carried out in order to find the ideal proportions. Other factors influence the choice of a proper phase ratio. For example, if the apolar substrate is toxic, the concentration of the compound in the aqueous phase must be kept under the inhibitory level; this is achieved by knowing the partition coefficient and then adjusting the phase ratio accordingly (Collins *et al.*, 1995).

A direct relationship between intensity of agitation and specific growth rate in TLPB has been frequently reported (e.g. Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993; Velankar *et al.*, 1975; Wang et Ochoa, 1972). Although the formation and the stabilization of an emulsion is facilitated by a decrease in interfacial tension, a mechanical input is required for the initial formation of NAPL droplets. As the agitation intensity is increased, the Sauter mean diameter is decreased and the number of droplets increased (Erickson et Nakahara, 1975). The stable-state distribution of drop sizes, as well as mean diameter of droplets formed by turbulent mixing, are a result of the equilibrium between two simultaneous processes - break-up and coalescence of drops: high mixing rate will produce smaller NAPL drops, e.g. via interaction with the impeller, but also multiply the probability of

drop contact and coalescence. Also, elevated agitation energy might prevent contact of microorganisms with substrate-containing NAPL droplets and shear stress could eventually be detrimental to the microbial cells (McLee et Davies, 1972). With cultures of a *Candida* sp. on 2-ethylbutyraldehyde incubated in a baffled reactor at different agitation speeds (between 200 and 800 rpm) with 20% silicone oil, Ascon-Cabrera & Lebeault (1993) obtained an optimal growth rate at mixing speeds between 500 and 600 rpm.

The Sauter mean diameter is strongly dependant on interfacial tension (Erickson et Nakahara, 1975). Addition of surfactants increases the interfacial area (Wang et Ochoa, 1972) and prevents coalescence of NAPL droplets. In TLPBs, the interfacial tension between NAPL and aqueous phase decreases as cultivation proceeds (Nakahara *et al.*, 1977; Prokop *et al.*, 1971; Prokop *et al.*, 1972; Velankar *et al.*, 1975). Microorganisms using liquid hydrocarbons as substrate secrete emulsifying and tensio-active substances such as glycolipids and lipopeptides to facilitate uptake (Georgiou *et al.*, 1992; Haferburg *et al.*, 1986). The cells themselves also can decrease the interfacial tension in TLPs (Bajpai *et al.*, 1975; Nakahara *et al.*, 1977). Biosurfactant or bioemulsifier production is generally considered beneficial for growth on long-chain liquid aliphatic hydrocarbons (Hommel, 1990). However, it was recently reported that excessive biosurfactant concentrations decreased the growth rate of *P. oleovorans* on decane (Schmid *et al.*, 1998). This was attributed to the reduced mass-transfer rate of the insoluble substrate to the aqueous phase caused by the strong stabilizing film surrounding the NAPL droplets.

In general, microorganisms growing on a NAPL (as reservoir or substrate) have a strong affinity for the immiscible liquid and colonize the surface of droplets (Miura *et al.*, 1977; Rosenberg, 1991). When investigating growth of a *Candida lipolytica* strain on hexadecane dissolved in inert gas oil, Prokop *et al.* (1971; 1972) observed a tendency for the interfacial area to increase with increases in cell mass. They suggested that cells with hydrophobic surfaces may tend to stabilize emulsions when growing at the drop surface

by preventing coalescence. However, not all drops were covered with cells and this could be explained by the exhaustion of substrate contained in the small reservoir droplets (Gutierrez et Erickson, 1977; Prokop *et al.*, 1971).

Most of the design parameters previously discussed apply to TLPSs in which the NAPL is well-mixed with the aqueous phase and for substrates whose biodegradation is principally limited by their bioavailability. However, special attention must be given to substrates also exhibiting a problem of toxicity. Even if the phase ratio has been adjusted to keep the initial concentration of an inhibitory substrate in the aqueous phase under the toxic level, the maximal interfacial area beneficial for optimal mass-transfer rate for hydrophobic substrates may not be ideal for toxic substrates. A distinction between molecular toxicity (caused by dissolved molecules) and phase toxicity (occurring at the liquid-liquid interface) has been proposed (Bar, 1987). It is possible that microorganisms coming into direct contact with the interface may be exposed to elevated, inhibitory, levels of toxic compounds (Hocknull et Lilly, 1988; Lilly *et al.*, 1987) and consequently emulsified systems with high interfacial areas may be detrimental to microbial activity (Prichanont *et al.*, 1998). For example, Collins *et al.* (1995) observed reduced dioxygenase activity of *P. putida* UV4 converting toluene to toluene *cis*-glycol in a TLPB with tetradecane as the NAPL. The phase ratio (30 % v/v) and the toluene concentration in the NAPL (20 % v/v) had been calculated based on the partition coefficient in order to have a sub-inhibitory level of toluene in the aqueous phase. Nevertheless, loss of microbial activity was observed, which was attributed to interfacial toxicity because of the formation of an emulsion. Moreover, when the substrate concentration was reduced to 10 % the activity was maintained for a longer period. They suggested that operational limits of specific TLPSs could be represented in the form of "windows of operation" where the organic phase substrate concentration is shown as a function of the phase ratio. Hence, if the toxic substrate ratio in the NAPL is too low, the mass-transfer rate becomes limiting and if it is too high, phase toxicity occurs. Increasing the phase ratio by operating the TLPB with the solvent phase continuous (two phases not intermixed) was proposed to

prevent formation of an emulsion (Collins *et al.*, 1995). Daugulis (1997) suggested that it may be preferable to select a NAPL and culture conditions not favoring formation of an emulsion, to prevent phase toxicity. However, most publications about the biodegradation of toxic compounds in completely mixed TLPSs have not reported problems of inhibition of microbial activity (El Aalam *et al.*, 1993; Osswald *et al.*, 1996). Collins & Daugulis (1996, 1997a; 1997b) investigated the biodegradation of phenol in a TLPS containing 1 l of medium and 500 ml of 2-undecanone as NAPL. This system was operated without intermixing the two liquid phases. They did not observe inhibitory effects but, unlike others who are using completely dispersed TLPSs (e.g. Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993, 1995b), microbial activity was oxygen-limited in these conditions of elevated phase ratio. Nevertheless, sufficient oxygen supply should generally not be a problem in TLPBs. Oxygen solubilities in hydrocarbons have been shown to be much higher than in pure water (Ju et Ho, 1989). Ho et al. (1990) even added *n*-hexadecane to enhance the oxygen supply to oxygen-limited cultures (solubility of oxygen in *n*-hexadecane is more than 8 times higher than that in pure water). Dispersion of the NAPL in a TLPB enhanced the gas/liquid mass-transfer coefficient of oxygen during growth of *P. oleovorans* on octane (van der Meer *et al.*, 1992a).

To summarize, the main objective to keep in mind when setting up a TLPS for enhanced biodegradation of apolar compounds is to achieve the highest mass-transfer rate, while preventing microbial inhibition when the substrate is also toxic.

6.2.6. Application of TLPBs as a biotreatment process

Many environmental pollutants are sparingly soluble in water and toxic towards microorganisms. In bioremediation research, much work has focused on the optimisation of microbial activity by improving environmental conditions, and occasionally by bioaugmentation. Increased microbial degrading capacities, however, will not lead to higher biotransformation rates if the mass-transfer rate is limiting or the target substrate inhibits the activity and survival of the microorganisms.

New technologies are needed for lowering the costs and time requirements of biotreatment processes. Since TLPBs are effective at controlling the delivery of apolar/inhibitory organic compounds to biocatalysts, they could represent a valuable tool for both fundamental research and applied processes concerning the biodegradation of environmentally problematic compounds. Some authors have proposed that TLPSs could have a great potential for treating water and effluents contaminated with toxic compounds such as styrene (El Aalam *et al.*, 1993), phenol (Collins et Daugulis, 1996, 1997a; Collins et Daugulis, 1997b), and pentachlorophenol (Munro et Daugulis, 1997), by allowing increased toxic charge loads to be treated. Decontamination of styrene-containing waste gas was also suggested (El Aalam *et al.*, 1993). Likewise, it was proposed that this approach could be applied to effluents polluted by poorly water-soluble compounds, such as PAH-containing water (Vanneck *et al.*, 1995) and refinery sludges (Jimenez et Bartha, 1996).

In biotreatment processes using TLPBs, the hydrophobic/toxic substrate would first dissolve into the NAPL, then diffuse to the microorganisms at the interface and in the aqueous phase (Figure 6.1). In all likelihood, the biotreatment of contaminated soils and sediments in slurry-phase bioreactors might also be improved by the addition of an inert NAPL. The bioavailability of molecules is controlled by a number of physical-chemical properties such as aqueous solubility and tendency to sorb to the soil and sediment matrix (Harms et Bosma, 1997; Luthy *et al.*, 1997). Desorption and dissolution rates are the critical limiting steps in the biodegradation of hydrophobic molecules. Since the partitioning of hydrophobic compounds into a NAPL is in many ways comparable to sorption to soil organic matter, the solvent could promote the extraction of the hydrophobic pollutants from the soil. The ensuing increased surface area for microbial contact and mass-transfer would result in enhanced rates of biodegradation. More investigations are required before the actual potential of this procedure is determined. Our research group has performed promising preliminary work in this direction. Using a

PAH-adapted mixed culture, we have observed rapid mass-transfer from an artificially contaminated soil to the NAPL followed by enhanced biodegradation in a slurry TLPB with silicone oil as the NAPL (A. Benachenhou 1998, unpublished results).

Since the important biodegradative microorganisms usually adhere and develop at the interface between the two liquid phases in TLPBs, the recovery of the NAPL with the attached microflora could be used as an enriched inoculum for subsequent biotreatments. Solvents with low costs could be used and minimal environmental hazard is expected since they would be non-toxic and reusable.

6.2.7. Conclusion

The addition of appropriate water-immiscible solvents in biodegradation processes can be beneficial. TLPs offer the possibility to control the bioavailability of NAPL-dissolved compounds by: [1] increasing the interfacial area between the pollutants and the microorganisms, which enhances the mass-transfer rate of hydrophobic compounds; and [2] sequestering toxic molecules into a separate phase, thus keeping their aqueous concentration below inhibitory levels. Difficulties may arise, however, if the NAPL is not carefully selected. It must be inert, innocuous and non-biodegradable. The ratio of NAPL added should allow the largest interfacial area with the aqueous phase, thus promoting the mass-transfer rate and the contact area for the adhering microorganisms. Most biological activity in such culture systems will occur near the interface between the two liquid phases. Microorganisms possess some features helping them to access and metabolize substrates in TLPBs. They benefit from their ability to produce surface-active agents, which emulsify the NAPL and therefore increase the interfacial area. This promotes the partitioning of the target compounds in the aqueous phase and also favors adhering microorganisms. Furthermore, hydrophobicity of the cell surface assists in the attachment of microorganisms at the NAPL surface, which promotes the formation of a biofilm and the uptake of pollutant molecules directly from the NAPL.

There are a large number of publications about applications of TLPBs in commercial bioconversion processes, but until now few studies have focused expressly on biodegradation of water-insoluble/toxic compounds of environmental concern. Future investigations should be conducted on the identification of new solvents with the required characteristics, especially low biodegradability under the conditions of use. A better understanding of microbial substrate uptake mechanisms involved in TLPSs could provide useful information on the design of TLPBs. Moreover, new applications of TLPBs such as improved treatment of contaminated soils deserve attention. In this context, key operational and design parameters require more research, especially in the later steps of a treatment scheme such as enriched microflora recovery, final phase separation and solvent recycling.

The potential benefits of TLPBs justify further exploration of this technology as a novel biotreatment strategy.

Acknowledgments

We sincerely thank Jarek Letowski for drawing the figure and José Marcoux for assistance in preparation of the manuscript. Helpful comments from Nathalie Ross, Réjean Beaudet and Jean-Guy Bisaillon are gratefully acknowledged.

CHAPITRE 7. SYNTHÈSE

7.1. DISCUSSION GÉNÉRALE

P. aeruginosa est reconnue pour sa capacité à s'attacher aux surfaces et à former un biofilm. De plus, les bactéries étudiées dans le cadre de ce projet de recherche demeurent les seules ayant été rapportées capables de produire des biosurfactants autant sur les alcanes linéaires liquides et solides que sur les HAP. Elles constituaient donc un outil idéal pour explorer l'implication de ces deux mécanismes dans la croissance sur les substrats hydrophobes.

Puisque la souche 57RP utilise facilement les *n*-alcanes comme source de carbone et d'énergie, il a été intrigant de constater une longue phase de latence d'une durée imprévisible lors des cultures sur les alcanes liquides uniquement. La découverte que la fin de la phase de latence coïncidait avec l'apparition d'un phénotype spécialisé dans l'initiation de la formation d'un biofilm a donc constitué un avancement majeur. Ceci représente le premier exemple de variation phénotypique rapporté chez cette espèce microbienne. La détermination du mécanisme génétique permettant à la bactérie de créer une population phénotypiquement hétérogène, ainsi que l'importance réelle de ce phénomène nécessiteront de nombreuses études supplémentaires.

La période de latence dans les cultures sur alcanes liquides est donc vraisemblablement attribuable au temps nécessaire pour que les variants S, en faible proportion dans l'inoculum de départ, soient en nombre suffisant pour produire un effet significatif, puisqu'ils seraient les seuls capables de croître directement à la surface du substrat hydrophobe liquide. Notons qu'à la suite du début de la croissance, il y avait aussi augmentation de la population de variants L. Il est probable qu'ils utilisent les intermédiaires de dégradation du substrat hydrophobe produit par la population de variants S. La présence indispensable de ces variants S, et l'avantage des souches naturellement adhérente («Rapides»), ont fait ressortir la nécessité pour les bactéries de

s'attacher pour croître sur les alcanes liquides quand le substrat n'a pas été préalablement émulsionné ou solubilisé.

Nos résultats ont démontré que la capacité de produire des rhamnolipides contribue relativement peu à la croissance de 57RP sur les alcanes liquides. Beal et Betts (2000) ont récemment confirmé ces résultats en comparant la minéralisation de l'hexadécane entre *P. aeruginosa* PG201 et le mutant *rhlA* UO299.

Le lien entre hydrophobicité et potentiel d'adhérence, ainsi que les structures cellulaires intervenant dans ces caractéristiques phénotypiques, sont des sujets mal compris et controversé (Rosenberg, 1991; Stenström, 1989; Van Loosdrecht *et al.*, 1987b). Le test le plus couramment employé pour évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire, le MATH, ne permet évidemment pas de différencier l'hydrophobicité de l'adhérence car il s'agit d'un test d'adhérence à une surface hydrophobe. Plusieurs méthodes existent, chacune donnant des résultats différents (Dillon *et al.*, 1986). Une cellule hydrophobe aura davantage tendance à se retrouver aux interfaces sans nécessairement être adhérente. La préférence des variants S pour une croissance à la surface air/phase aqueuse suggère une plus grande hydrophobicité et puisque la Fig. 3.3B indique que les variants S présentent un caractère plus adhérent que les variants L, on doit conclure qu'ils sont à la fois plus adhérents et plus hydrophobes. Il est très probable que les variants S doivent leur phénotype à la présence d'une abondance de fimbriae de type IV puisque ces derniers sont des structures hautement hydrophobes impliqués dans l'adhésion (Hahn, 1997).

Nous avons établi que, contrairement à ce qui est accepté dans la littérature, la protéine RhlA n'est pas une sous-unité de la rhamnosyltransférase I mais plutôt une enzyme directement impliqué dans la synthèse des dimères lipidiques précurseurs des rhamnolipides. Nous avons aussi découvert que cette mixture de dimère lipidique n'est pas entièrement utilisée pour la synthèse des rhamnolipides et qu'une partie est excrétée

par la bactérie. À notre connaissance, la production de ces dimères lipidiques par *P. aeruginosa* n'a jamais été rapportée auparavant. Nous avons proposé de les nommer «aeruwettine», par analogie avec la serrawettine de *S. marcescens* et pour souligner leur rôle comme agent mouillant nécessaire pour le «swarming» chez *P. aeruginosa*. En effet, nous avons découvert que l'expression du gène *rhlA*, probablement via la production d'aeruwettine, est nécessaire pour coloniser rapidement la surface d'une gélose grâce la motilité par «swarming».

Puisque le mutant *rhlA* manifestait une tendance beaucoup plus prononcée à l'agrégation cellulaire que la souche d'origine, nous avons proposé que les rhamnolipides et/ou l'aeruwettine puissent jouer un rôle dans le détachement et la dispersion des cellules associées à un biofilm. Tout comme le «swarming», la formation d'un biofilm est un processus complexe nécessitant une action concertée et coordonnée d'une population microbienne (O'Toole *et al.*, 1999). La phase de dissémination est l'étape la moins bien caractérisée dans le développement des biofilms. Nous avons observé que le processus de développement d'un biofilm par les mutants *rhlA* et *rhlB* était effectivement différent de la souche d'origine, ce qui appuie l'hypothèse que les biosurfactants soient impliqués dans l'interaction des cellules avec les surfaces et interfaces.

7.2. MODÈLE CONCEPTUEL DE LA FONCTION DES RHAMNOLIPIDES DANS L'ASSIMILATION DES HYDROCARBURES

Plusieurs expériences ont été menées afin d'élucider les modes d'assimilation utilisés par la souche 57RP et le mutant 57RP-98 pour accéder aux hydrocarbures.

7.2.1. Hydrocarbures liquides

Les alcanes linéaires de haut poids moléculaire tels que ceux ayant été étudiés au cours de ce projet sont trop insolubles pour que la portion dissoute permette la croissance microbienne. Nos résultats indiquent que l'adhérence au substrat est un préalable

essentiel à la croissance de la souche 57RP sur les alcanes liquides. En effet, la découverte que l'émergence de variants phénotypique très adhérents était nécessaire avant le début de la croissance, ainsi que l'absence de phase de latence des souches naturellement adhérente («Rapides»), appuient cette conclusion. La littérature prédit que seules la solubilisation ou l'émulsionnement en très fines gouttelettes peuvent suppléer à cette condition. Et en effet, l'addition du surfactant synthétique non-ionique Triton X-100 à des cultures de 57RP et 57RP-98 sur l'hexadécane a éliminé la phase de latence et permis une croissance exponentielle (résultats non-présentés). De plus, aucun variant S n'est apparu, ce qui confirme que la phase de latence est avant tout attribuable au temps nécessaire pour l'émergence des variants adhérents. Notons que le surfactant a été ajouté à une concentration finale inférieure à la CMC, et que par conséquent seule l'émulsionnement a pu contribuer à favoriser la croissance. Le Triton X-100 n'est pas métabolisable par la bactérie.

Les observations macro- et microscopiques ont montré que suite à la phase initiale d'adhésion, les cellules de 57RP se détachaient puis se dispersaient dans le milieu, alors que le mutant *rhlA* présentait une forte tendance à demeurer attaché. Dans les cultures de 57RP, l'hexadécane était généralement retrouvé sous forme d'une fine émulsion alors que 57RP-98 s'agglutinait et formait une enveloppe autour de grosses gouttes d'alcanes (jusqu'à 5 mm diam.). La Fig. 7.1 résume bien la différence dans les modes de croissance. La durée irrégulière de la période de latence est présentée par la courbe de chaque culture du duplicata. La dispersion des cellules de 57RP suivant la phase d'adhésion initiale est mise en évidence par l'accroissement rapide de la DO en comparaison avec les cultures de 57RP-98. Nous avons présenté au Chapitre 4 que l'écart entre les deux souches était en fait minime lors de la croissance sur l'hexadécane (Fig. 4.2 et 4.3).

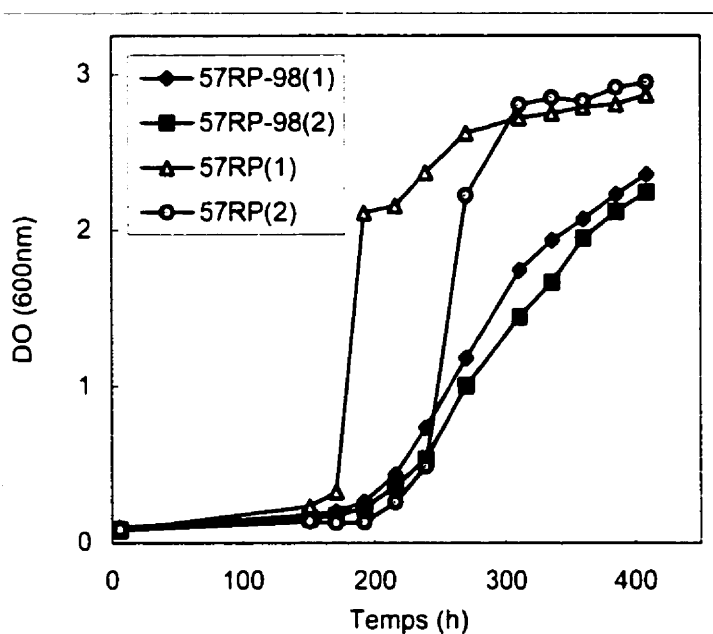


Figure 7.1 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane.

Chaque flacon de 250 ml contenait 40 ml BHf et 0,5% (v/v) d'hexadécane. Incubation à 26°C et 150 rpm. Les duplicatas sont présentés.

Malgré que leurs modes de croissance sur les liquides hydrophobes apparaissent foncièrement différents, les souches productrices et non-productrices de biosurfactants atteignent des biomasses équivalentes. L'agrégation du mutant ne produisant aucun biosurfactant est illustrée à la Fig. 7.2 par une comparaison de la souche d'origine PG201 et des mutants *rhlA* UO299 et *rhlB* UO287. Les souches ont été cultivées sur un autre substrat hydrophobe liquide, l'huile d'olive. On constate qu'à croissance égale, tel que démontré par la concentration totale en protéines cellulaires, la densité optique de la cultureensemencée avec le mutant *rhlA* UO299 est environ 35% plus faible que les cultures avec la souche d'origine ou celle produisant seulement l'aeruwettine.

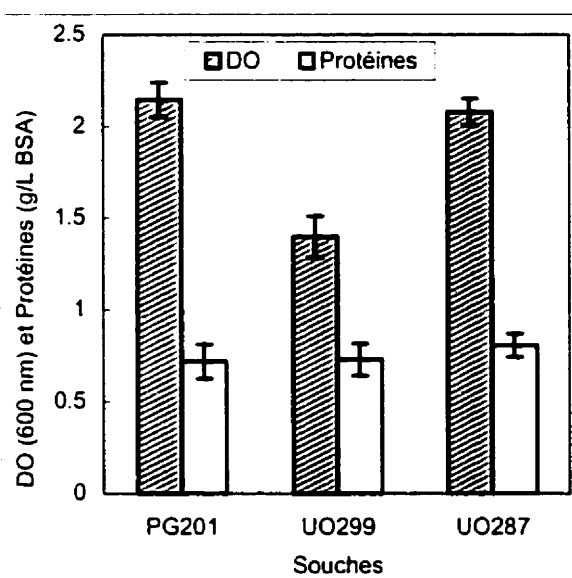


Figure 7.2 Comparaison de la croissance de PG201, UO299 et UO287 en cultures liquides avec l'huile d'olive.

Chaque tube de 50 ml contenait 2 ml SW1/10F et 5% (v/v) huile d'olive. Incubation à 30°C et 200 rpm. Arrêt des cultures après 40 h d'incubation.

L'emploi de modes d'assimilation différents par 57RP et 57RP-98 a été confirmé par une expérience utilisant le principe des bioréacteurs à deux phases liquides. Trois quantités différentes d'hexadécane (5, 10, 15 μ l) ont été diluées avec de l'huile de silicone afin d'obtenir un volume final égal de liquide hydrophobe (20 μ l), puis les taux de minéralisation ont été comparés. Le modèle de Westgate *et al.* (1995) prédit que si les cellules obtiennent le substrat par contact direct avec la phase liquide immiscible (adhésion), un volume égal (donc une surface égale) dans tous les systèmes devrait résulter en des taux de minéralisation égaux, peu importe la concentration du substrat assimilable. D'autre part, si les cellules acquièrent le substrat dissous ou solubilisé dans la phase aqueuse, alors le taux de minéralisation dépendra du taux de transfert de masse, et donc de la concentration du substrat. La Fig. 7.3 montre que les taux de minéralisation maximaux atteints par 57RP ont augmenté parallèlement avec la proportion d'hexadécane, alors qu'ils sont demeurés essentiellement les mêmes pour 57RP-98. Ces résultats appuient l'hypothèse que la croissance de 57RP-98 a surtout lieu à la surface du

substrat liquide hydrophobe, et que par conséquent son taux de croissance est contrôlé par la surface de contact. La souche d'origine, quant à elle, semble croître surtout en suspension. Le taux de minéralisation maximal de la culture 57RP avec 15 μ l d'hexadécane n'est pas aussi élevé qu'attendu, ce qui pourrait s'expliquer par la saturation de la voie catabolique.

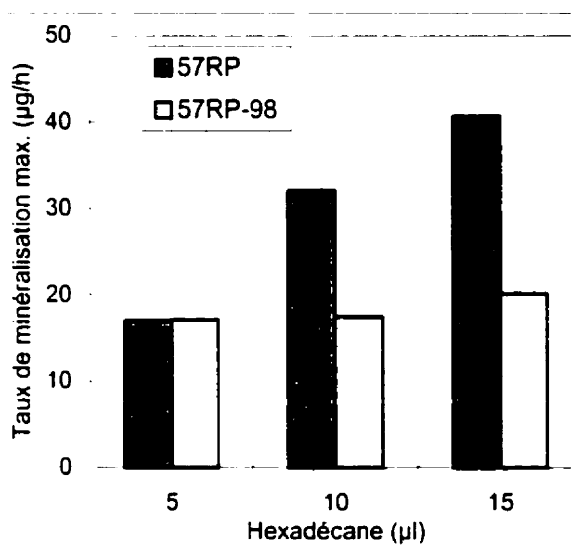


Figure 7.3 Comparaison des taux maximaux de minéralisation de l'hexadécane par 57RP et 57RP-98 en système à deux phases liquides.

Chaque bouteille sérologique de 100 ml contenait 14 ml BHf et 20 μ l d'un mélange d'hexadécane et d'huile de silicone. Incubation à 25°C et 150 rpm.

Si, après la phase d'adhésion initiale, les cellules de 57RP se retrouvent en suspension, elles doivent alors acquérir l'hexadécane par l'assimilation de micro-gouttelettes (émulsion fine) ou de micelles, probablement le produit d'une activité de biosurfactants. L'hexadécane ainsi rendu hautement biodisponible pourrait aussi suppléer à l'incapacité de 57RP-98 à produire des rhamnolipides si les deux souches étaient cultivées ensemble (culture mixte). Nous avons vérifié cette hypothèse en cultivant les souches dans deux bouteilles connectées par un pont séparé par une membrane de Nylon (pores de 0.2 μ m empêchant le passage des bactéries). La Fig. 7.4 montre une croissance équivalente des

deux souches, ce qui suggère que 57RP a aidé 57RP-98. L'hexadécane dans la bouteille ensemencée avec 57RP-98 n'était pas plus émulsionné que dans les cultures séparées habituelles, suggérant que le mutant *rhlA* ait aussi assimilé de l'hexadécane provenant de l'autre bouteille. L'absence d'émulsion dans la bouteille 57RP-98 suggère que l'«accommodation» de l'hexadécane n'était pas le résultat de la formation de micelles par 57RP (nous avons préalablement vérifié dans un système abiotique que les rhamnolipides pouvaient traverser les pores du filtre et produire une émulsion dans la bouteille opposée). Rappelons que nous n'avons pas détecté de rhamnolipides dans les cultures en BHf (par le test colorimétrique), ce qui n'a pas empêché 57RP d'être avantagée (Chapitre 4). Nous postulons que d'autres molécules tels des lipopeptides ou des LPS provenant de la membrane cellulaire sont relâchés par la bactérie pour produire ou stabiliser l'émulsion. La présence de ces molécules est probablement liée à la production des rhamnolipides.

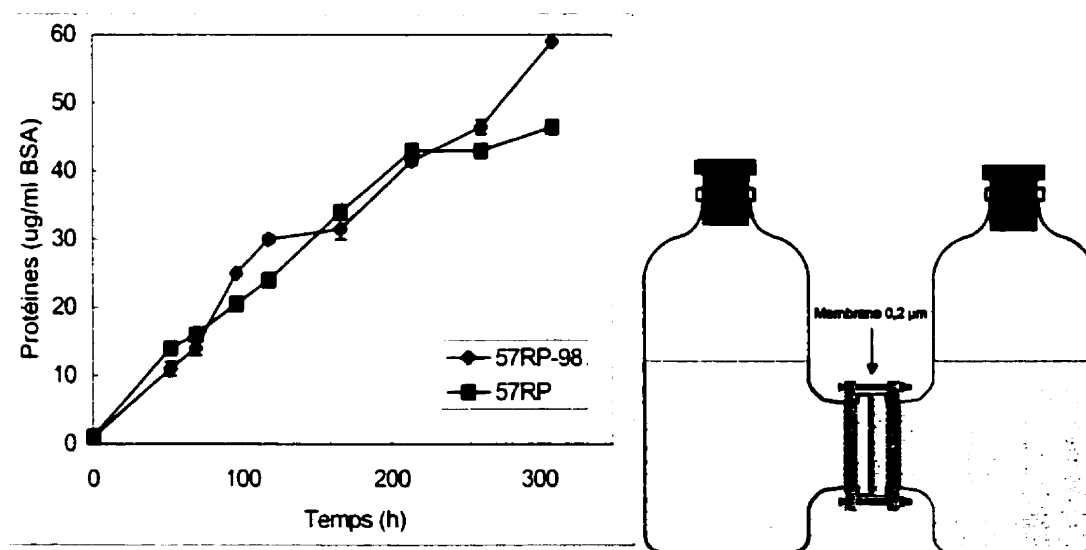


Figure 7.4 Comparaison de la croissance de 57RP et 57RP-98 en cultures liquides avec l'hexadécane.

Chaque bouteille de 250 ml contenait 100 ml SW1/10F, 0,5% (v/v) d'hexadécane et une des deux souches. Incubation à 30°C et 250 rpm.

Les biosurfactants de 57RP favorisent le détachement des cellules adhérentes et associées à un biofilm (section 5.3), ce qui pourrait expliquer que les cellules se retrouvent en suspension dans les cultures sur l'hexadécane. Cependant, les Fig. 4.2 et 4.3 suggèrent que l'avantage de la souche d'origine se situe au début de la croissance, probablement lors de l'adhésion initiale. Nous avons exploré cette hypothèse en comparant l'hydrophobicité de la surface externe de cellules en conditions de production de rhamnolipides avec un substrat soluble. Tel qu'illustré à la Fig. 7.5, les cellules de 57RP sont devenues plus hydrophobes que celles de 57RP-98 au cours de la phase de croissance exponentielle, alors que la libération des rhamnolipides dans le milieu a coïncidé avec une baisse plus importante de l'hydrophobicité. Les variations de l'hydrophobicité de la surface des cellules semble donc liée à la production des rhamnolipides plutôt qu'à la croissance sur un substrat hydrophobe. Le même phénomène a été également observé dans des cultures sur l'hexadécane (résultats non-présentés). Arino *et al.* (1996, 1998) ont proposé que les rhamnolipides s'associent à la membrane externe comme médiateurs de l'hydrophobicité. Nous avons toutefois observé que les rhamnolipides se retrouvaient très rapidement dans le milieu extracellulaire après activation de *rhlA* (Fig. 5.2B).

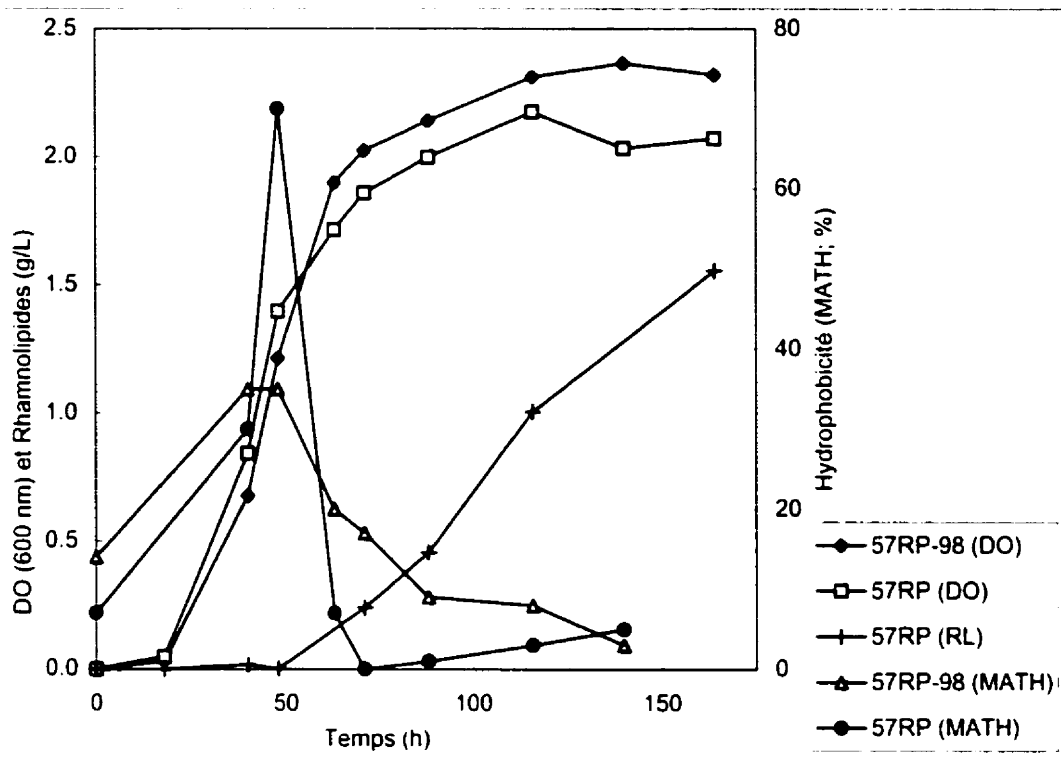


Figure 7.5 Croissance (DO), production de rhamnolipides (RL) et suivi de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (MATH) de 57RP et 57RP-98.

Chaque flacon de 500 ml contenait 100 ml de SW1/10F et 2% (p/v) mannitol. L'hydrophobicité de la paroi externe des bactéries a été déterminée par le test MATH.

Nos observations nous amènent à proposer le modèle suivant pour la croissance de la souche d'origine sur les alcanes liquides: [1] l'adhésion initiale des cellules à l'hydrocarbure liquide nécessite l'émergence de variants S. et peut-être que l'accroissement de l'hydrophobicité de la paroi externe est favorisée par la synthèse des biosurfactants; [2] s'ensuit la colonisation de la surface des gouttes d'hydrocarbures (formation d'un biofilm?); [3] puis se produit une diminution rapide de l'adhérence/hydrophobicité, suivi de la dispersion des cellules (coïncide avec une transformation de la membrane cellulaire liée à l'excrétion des biosurfactants ?), ce qui permet la colonisation d'autres gouttes d'hydrocarbure liquide disponibles; [4] lors du détachement, les cellules abandonnent des morceaux de parois, biosurfactants, etc., qui

favorisent et/ou stabilisent l'émulsion; [5] finalement, la grande surface de contact et d'échange résultant de l'émulsion permet la croissance des cellules en suspension.

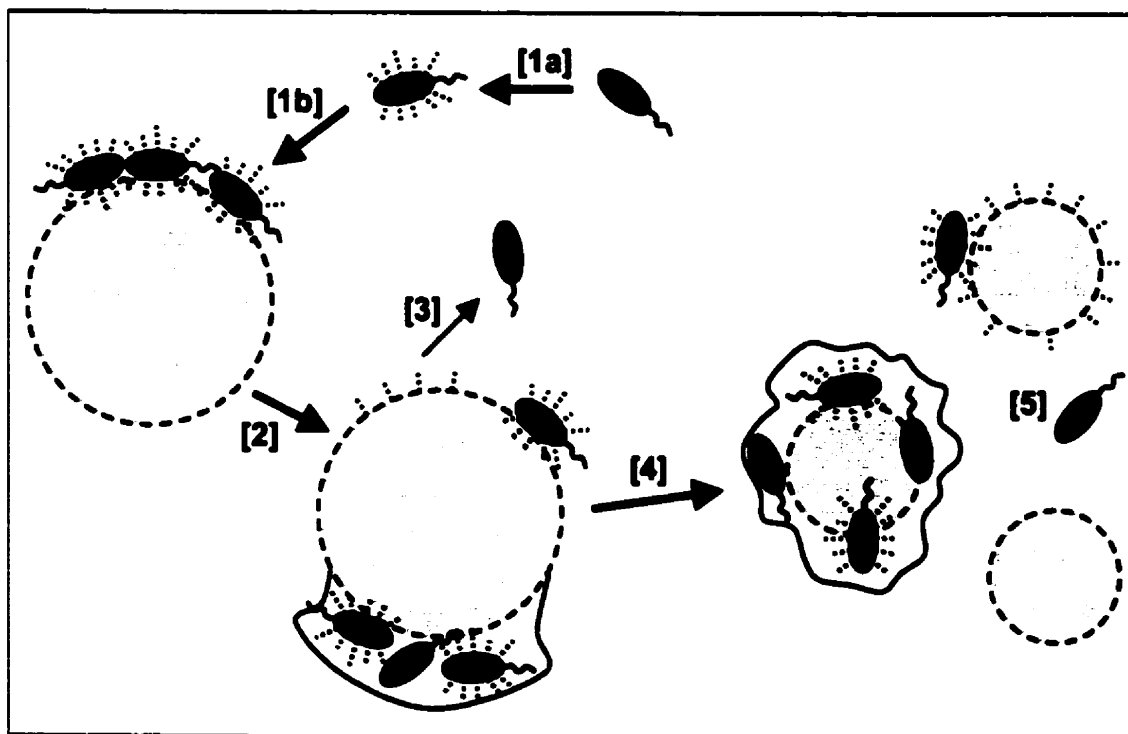


Figure 7.6 Modèle proposé décrivant la croissance de *P. aeruginosa* sur un alcane linéaire liquide.

En se basant sur le postulat que 57RP assimile l'hexadécane sous forme d'une émulsion, nous avons émis l'hypothèse qu'empêcher l'émulsification, par exemple par l'ajout de sol, devrait favoriser le mutant *rhlA*. En effet, la minéralisation de l'hexadécane présent dans du sable saturé de BHf a débuté plus rapidement par 57RP-98 (Fig. 7.7). Ce résultat suggère que la production de rhamnolipides ne soit pas nécessairement bénéfique pour la dégradation des hydrocarbures.

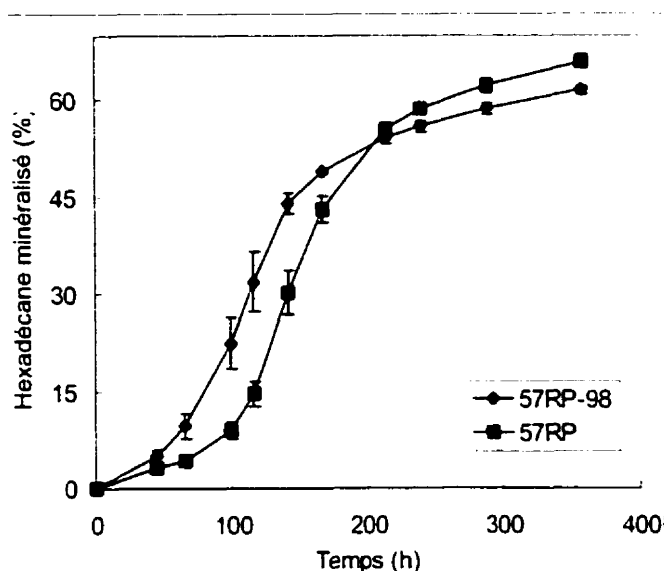


Figure 7.7 Minéralisation de l'hexadécane par les souches 57RP et 57RP-98 dans un «slurry».

Chaque bouteille sérologique de 100 ml contenait 14 ml BHf, 14 g de sable de silice et 0,05% (v/v) d'hexadécane. Incubation à 30°C et 200 rpm.

7.2.1.1. Est-ce que la production des rhamnolipides entraîne la libération de LPS ?

Nous avons postulé que les rhamnolipides affectent la membrane de la cellule. Miguez *et al.* (1986) ont observé que *P. aeruginosa* ATCC 9027 cultivée sur l'hexadécane produisait 75% moins de LPS. De plus, l'ajout de rhamnolipides a favorisé la perte de LPS chez *P. aeruginosa* (Al-Tahhan *et al.*, 2000). Nous avons comparé la concentration de LPS dans les surnageants de PG201, UO287 et UO299 cultivées dans des conditions de production de biosurfactants. Pour ce faire, nous avons dosé l'acide 2-keto-3-deoxyoctonique (KDO), une portion de l'oligosaccharide central des LPS grâce à la méthode standard par l'acide thiobarbiturique, telle que décrite par Al-Tahhan *et al.* (2000). Aucune différence significative dans les concentrations de LPS n'a été détectée. Nous avons aussi demandé au Dr Joseph Lam (Université de Guelph, Ont.) d'analyser la composition des LPS de cellules de la souche d'origine et du mutant *rhlA*. Les souches

ont été cultivées en conditions de production de biosurfactants sur le mannitol et des échantillons de biomasse ont été récupérés avant (40 h), pendant (88 h), et après (164 h) l'excrétion des rhamnolipides. Les profils migratoires des LPS obtenus par électrophorèse sur gel dénaturant (SDS) de polyacrylamide n'ont montrés aucune différence entre les deux souches (résultats non-présentés).

7.2.2. Hydrocarbures solides

Deux conclusions peuvent être tirées des résultats obtenus sur les hydrocarbures solides. Premièrement, la croissance de la souche d'origine sur les *n*-alcanes à l'état solide, et apparemment le phénanthrène, est favorisée uniquement lors de l'excrétion des rhamnolipides. Deuxièmement, l'adhérence semble faciliter l'assimilation car les souches dites «Rapides», qui sont plus adhérentes/hydrophobes, ont été avantagées (Fig. 4.15). Cependant, l'absence d'une phase de latence et d'apparition de variants S suggère un mode d'attachement différent que celui sur les hydrocarbures liquides. De plus, les observations ont montré que la plus grande partie de la biomasse se retrouvait dispersée dans la phase aqueuse. Nous pouvons réconcilier ces résultats en proposant que la croissance s'effectue essentiellement à la surface de l'hydrocarbure mais que les cellules attachées sont en équilibre dynamique avec les cellules en suspension. Ce mécanisme a été démontré lors de la croissance d'une souche de *Pseudomonas* sp. cultivée sur le tétracosane solide (Kirshner Zilber *et al.*, 1980). Puisque la surface de contact pour les cellules reste plutôt constant pour une longue période, la croissance résultante sera linéaire, ce qui a été observé (Fig. 4.9 et 4.13). Finalement, la différence de taux de croissance entre les deux souches quand des rhamnolipides sont excrétés pourrait s'expliquer par une fragmentation des cristaux, ce qui résulterait en un accroissement de la surface d'échange et de contact disponible.

7.3. IMPLICATIONS PRATIQUES

Certains contaminants ne sont probablement biodisponibles qu'aux micro-organismes associés aux surfaces. Dans le cadre de projets de biorestauration, il pourrait donc s'avérer bénéfique de favoriser et sélectionner les bactéries adaptées aux substrats hydrophobes et sorbés. Ceci implique de ne pas considérer uniquement le potentiel catabolique des bactéries mais également leur capacité d'accéder aux substrats peu biodisponibles.

L'impact considérable de la croissance des bactéries sous forme de communautés multicellulaires adhérentes dans l'environnement a été pendant longtemps sous-estimé autant par les microbiologistes que par les ingénieurs. La découverte d'un nouveau mécanisme employé par *P. aeruginosa* afin d'initier la formation d'un biofilm est donc très intéressante car elle offre une nouvelle approche à l'étude des biofilms chez cette espèce. Ceci permet également d'interpréter de façon de tout à fait originale de nombreuses observations inexplicables au sujet des biofilms de *P. aeruginosa*. Le fait que des phénomènes de variation phénotypique similaires soient impliqués dans le développement des biofilms chez de nombreuses autres genres microbiens suggère l'universalité de tels mécanismes.

Nos résultats indiquent que l'adhérence aux surfaces et la formation d'un biofilm constitue un mécanisme important d'accession aux substrats hydrophobes. De plus, les biosurfactants semblent avoir un rôle à jouer dans le développement des biofilms. Par conséquent, l'emploi de surfactants synthétiques ou biologiques pourrait interférer avec les mécanismes microbiens naturels d'adhérence aux surfaces et formation de biofilms. Ceci pourrait contribuer à expliquer les nombreux problèmes rencontrés lors de l'emploi de surfactants pour favoriser la biodisponibilité et la biodégradation des composés organiques hydrophobes (Efroymson et Alexander, 1991; Harms, 1999; Stelmack *et al.*,

1999). Nous déduisons qu'il pourrait être préférable de limiter l'utilisation des surfactants tant que leur impact sur la flore microbienne n'est pas mieux compris.

L'impact divergent de la production des rhamnolipides sur la croissance avec les substrats hydrophobes solides ou liquides s'explique vraisemblablement par les modes de croissance différents utilisés par *P. aeruginosa* 57RP. La reconnaissance que l'état physique des polluants-cibles influence radicalement le mécanisme d'assimilation employé par les micro-organismes est une observation fondamentale qui devra être considérée lors de l'élaboration de procédés de biorestauration.

CHAPITRE 8. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

8.1. CONCLUSION

L'objectif de ce projet de recherche consistait à préciser le mode d'accession utilisé par *P. aeruginosa* afin d'assimiler les hydrocarbures aliphatiques et polyaromatiques. Deux mécanismes physiologiques ont été étudiés : [1] l'hydrophobicité de la surface cellulaire et adhérence aux substrats et [2] la production de biosurfactants, en particulier les rhamnolipides. Plus spécifiquement, nos objectifs visaient à confirmer que la production de rhamnolipides facilite la croissance de cette bactérie sur les alcanes liquides et vérifier s'ils favorisent aussi l'accession aux hydrocarbures à l'état solide. De plus, nous voulions investiguer l'implication potentielle des biosurfactants dans les changements d'hydrophobicité de la surface cellulaire.

Nous avons trouvé que *P. aeruginosa* produit une autre classe de biosurfactant en plus des rhamnolipides, l'aeruwettine. Nos résultats démontrent clairement que *P. aeruginosa* ne produit pas les biosurfactants dans le but précis de faciliter l'assimilation des substrats hydrophobes. Ces biosurfactants apparaissent plutôt impliqués dans l'interaction de la bactérie avec les surfaces. En effet, nous avons observé que *P. aeruginosa* nécessite la production de l'aeruwettine et des rhamnolipides afin de coloniser les surfaces par la motilité de type «swarming». Nos résultats indiquent également que ces biosurfactants sont impliqués dans le détachement et/ou la dispersion des cellules associées à une surface sous forme d'un biofilm.

De nombreux rôles ont été attribués aux rhamnolipides mais une fonction comme modulateurs de l'adhérence n'a jamais été rapportée auparavant. Il est cependant de plus en plus évident que les bactéries produisent des molécules extracellulaires amphiphiles afin de réguler leur adhésion/désadhésion aux surfaces (Neu, 1996) et que ces molécules sont aussi impliquées dans la motilité de type «swarming». Ce type de motilité est mal compris mais la possibilité qu'elle participe au développement des biofilms est plausible.

Nous proposons que la production de biosurfactants, la motilité de type «swarming» et le développement d'un biofilm soient des phénomènes interdépendants chez *P. aeruginosa*.

La régulation de la synthèse des rhamnolipides par le système de signalisation intercellulaire suggère l'implication des biosurfactants dans un processus multicellulaire. Des bactéries dont les systèmes de communication intercellulaire ont été inactivés croissent normalement dans des conditions de laboratoire standard mais sont désavantagés dès qu'une action concertée est nécessaire. L'importance d'une telle coopération pour l'assimilation d'un substrat hydrophobe est démontrée par le ralentissement de la croissance sur l'hexadécane beaucoup plus prononcé d'un mutant *rhlR* que d'un mutant *rhlA* (Beal et Betts, 2000; Ochsner *et al.*, 1994b; Shreve *et al.*, 1995).

Nous concluons que le principal mécanisme physiologique utilisé par *P. aeruginosa* 57RP pour initier la croissance sur les substrats hydrophobes, comme chez la plupart des autres micro-organismes, consiste à s'attacher à la surface et, vraisemblablement, assimiler la source de carbone directement à l'interface. La bactérie favorise ce mode de croissance en facilitant la formation d'une émulsion, et probablement la dispersion des substrats solides.

8.2. RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVE

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet de recherche ont élargi notre compréhension de plusieurs phénomènes, certaines questions restent en suspens. Ainsi, d'autres expériences seront nécessaires avant de pouvoir conclure sur le rôle des rhamnolipides dans l'assimilation des hydrocarbures solides et sorbés. La comparaison avec un mutant *rhlA* semble l'outil idéal afin d'élucider le mécanisme d'acquisition des hydrocarbures et comprendre comment agissent les biosurfactants pour moduler l'adhérence, l'hydrophobicité de la cellule, etc. De plus, l'importance de l'aeruwettine pourra être établie avec un mutant *rhlB*.

Évidemment, plusieurs nouvelles questions se posent :

- Quelle est l'importance réelle des biofilms formés *in situ* dans la biodégradation des polluants peu biodisponibles ?
- Quel est la fonction de la motilité «swarming» et quel rôle jouent les biosurfactants dans ce mode de motilité ?
- Quelle est la différence dans les mécanismes employés par *P. aeruginosa* afin d'assimiler les substrats hydrophobes liquides et solides ?
- Est-ce que toutes les souches de *P. aeruginosa* forment des variants S ou uniquement celles naturellement peu adhérentes ? Quel est le mécanisme contrôlant la formation des variants S ?
- Comment s'explique la différence phénotypique entre les souches Rapides et les souches Lentes ?
- Est-ce que l'inactivation du gène *rhlA* aura le même effet sur une souche naturellement adhérente («Rapide») ?

Une meilleure compréhension des processus naturels en jeu dans un site contaminé, en particulier les facteurs limitant la biodisponibilité ainsi que les modes d'accession microbiens, permettront de rendre la biorestauration plus largement applicable. Nos travaux indiquent que la conviction largement répandue d'une fonction des biosurfactants comme agents de solubilisation des substrats hydrophobes devra être reconsidérée. D'autre part, la pleine reconnaissance de l'importance prépondérante du développement des micro-organismes sous forme de biofilms dans le milieu naturel constitue un avancement majeur qui devrait toujours être intégré à la conception des procédés de biorestauration.

RÉFÉRENCES

- ABE, A., INOUE, A., USAMI, R., MORIYA, K. et HORIKOSHI, K. (1995). Degradation of polyaromatic hydrocarbons by organic solvent-tolerant bacteria from deep sea. Biosci. Biotechnol. Biochem., **59**, 1154-1156.
- ADACHI, K., IWABUCHI, T., SANO, H. et HARAYAMA, S. (1999). Structure of the ring cleavage product of 1-hydroxy-2-naphthoate, an intermediate of the phenanthrene-degradative pathway of *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol., **181**, 757-63.
- ALBUS, A.M., PESCI, E.C., RUNYEN-JANECKY, L.J., WEST, S.E.H. et IGLEWSKI, B.H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., **179**, 3928-3935.
- ALEXANDER, M. (1991). Research needs. Environ. Sci. Technol., **25**, 1972-1973.
- ALEXANDER, M. (1994). Biodegradation and bioremediation. San Diego, Academic Press, Inc.
- ALEXANDER, M. (1995). How toxic are toxic chemicals in soil ? Environ. Sci. Technol., **29**, 2713-2717.
- ALEXANDER, M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. Environ. Sci. Technol., **34**, 4259-4265.
- ALLARD, A.-S. et NEILSON, A.H. (1997). Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. Internat. Biodeter. Biodegr., **39**, 253-285.
- ALLEN, C.C., BOYD, D.R., HEMPENSTALL, F., LARKIN, M.J. et SHARMA, N.D. (1999). Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons to cis-dihydrodiols by soil bacteria. Appl Environ Microbiol., **65**, 1335-9.
- ALM, R.A. et MATTICK, J.S. (1997). Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene, **192**, 89-98.
- AL-TAHHAN, R.A., SANDRIN, T.R., BODOUR, A.A. et MAIER, R.M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas*

- aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl. Environ. Microbiol., **66**, 3262-3268.
- AMIN, P.M., NIGAM, J.N., LONSANE, B.K., BARUAH, B., SINGH, H.D., BARUAH, J.N. et IYENGAR, M.S. (1973). Microbial biomass production on solid hydrocarbons. Folia Microbiol., **18**, 49-55.
- ANDERSEN, J.B., STERNBERG, C., POULSEN, L.K., BJORN, S.P., GIVSKOV, M. et MOLIN, S. (1998). New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. Appl Environ Microbiol., **64**, 2240-6.
- ARINO, S., MARCHAL, R. et VANDECASTEELE, J.-P. (1996). Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Appl. Microbiol. Biotechnol., **45**, 162-168.
- ARINO, S., MARCHAL, R. et VANDECASTEELE, J.-P. (1998). Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. J. Appl. Microbiol., **84**, 769-776.
- ARONSTEIN, B.N. et ALEXANDER, M. (1992). Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sands and soil slurries. Environ. Toxicol. Chem., **11**, 1227-1233.
- ARONSTEIN, B.N. et ALEXANDER, M. (1993). Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. Appl. Microbiol. Biotechnol., **39**, 386-390.
- ARPIGNY, J.-L. et JAEGER, K.-E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem. J., **343**, 177-183.
- ASCON-CABRERA, M. et LEBEAULT, J.-M. (1993). Selection of xenobiotic-degrading microorganisms in a biphasic aqueous-organic system. Appl. Environ. Microbiol., **59**, 1717-1724.
- ASCON-CABRERA, M. et LEBEAULT, J.-M. (1995a). Cell hydrophobicity influencing the activity/stability of xenobiotic-degrading microorganisms in a continuous biphasic aqueous-organic system. J. Ferment. Technol., **80**, 270-275.

- ASCON-CABRERA, M. et LEBEAULT, J.-M. (1995b). Interfacial area effects of a biphasic aqueous/organic system on growth kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol., **43**, 1136-1141.
- ATLAS, R.M. (1988). Biodegradation of hydrocarbons in the environment. Basic Life Sci., **45**, 211-222.
- BAI, G., BRUSSEAU, M.L. et MILLER, R.M. (1997). Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. J. Contam. Hydrol., **25**, 157-170.
- BAILEY, J.E. et OLLIS, D.F. (1986). Biochemical engineering fundamentals. New York, McGraw-Hill Publishing Co.
- BAJPAI, R.K., PROKOP, A. et RAMKRISHNA, D. (1975). Dispersion in hydrocarbon fermentation. A retrospective study. Biotechnol. Bioeng., **17**, 541-556.
- BANAT, I.M. (1995). Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal - state of the art (review). Acta Biotechnol., **15**, 251-267.
- BANERJEE, S., DUTTAGUPTA, S. et CHAKRABARTY, A.M. (1983). Production of emulsifying agent during growth of *Pseudomonas cepacia* with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. Arch. Microbiol., **135**, 110-114.
- BAR, R. (1987). Phase toxicity in water-solvent two-liquid phase microbial system. Biocatalysis in Organic media. C. Laane, J. Tramper et M.D. Lilly. Amsterdam, Elsevier: 147-153.
- BARKOVSKII, A. et ADRIAENS, P. (1995). Biological and abiotic dechlorination of highly chlorinated dioxins in biphasic microcosms. Bioremediation of recalcitrant organics. R.E. Hinchee, D.B. Anderson et R.E. Hoeppe, Battelle Press. **7**: 73-82.
- BARNESLEY, E.A. (1975). The bacterial degradation of fluoranthene and benzo[a]pyrene. Can. J. Microbiol., **21**, 1004-1008.
- BASSLER, B.L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Curr Opin Microbiol., **2**, 582-7.
- BASTIAENS, L., SPRINGAEL, D., WATTIAU, P., HARMS, H., DEWACHTER, R., VERACHTERT, H. et DIELS, L. (2000). Isolation of adherent polycyclic

- aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. Appl Environ Microbiol, **66**, 1834-43.
- BATEMAN, J.N., SPEER, B., FEDUIK, L. et HARTLINE, R.A. (1986). Naphthalene association and uptake in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol., **166**, 155-161.
- BAVEYE, P. et BLADON, R. (1999). Bioavailability of organic xenobiotics in the environment: a critical perspective. Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. P. Baveye, Kluwer Academic Publishers: 227-248.
- BEAL, R. et BETTS, W.B. (2000). Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Microbiol., **89**, 158-168.
- BEDARD, M., MCCLURE, C.D., SCHILLER, N.L., FRANCOEUR, C., CANTIN, A. et DENIS, M. (1993). Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implication for cystic fibrosis. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., **9**, 455-462.
- BELL, G.H. (1973). The metabolism of long-chain fatty acids and alcohols by *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek, **39**, 137-149.
- BERG, G., SEECH, A.G., LEE, H. et TREVORS, J.T. (1990). Identification and characterisation of a soil bacterium with extracellular emulsifying activity. J. Environ. Sci. Health, **25**, 753-764.
- BERG, J.D., NESGARD, B., GUNDERSEN, R., LORENTSEN, A. et BENNETT, T.E. (1994). Washing and slurry-phase biotreatment of creosote-contaminated soil. Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. R.E. Hinchee, A. Leeson, L. Semprini et S.K. Ong. Boca Raton, Lewis: 489-495.
- BERTRAND, J.-C., BONIN, P., GOUTX, M., GAUTHIER, M. et MILLE, G. (1994). The potential application of biosurfactants in combatting hydrocarbon pollution in marine environments. Res. Microbiol., **145**, 53-55.

- BESTETTI, G., GALLI, E., BENIGNI, C., ORSINI, F. et PELIZZONI, F. (1989). Biotransformation of styrenes by a *Pseudomonas putida*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **30**, 252-256.
- BEVERIDGE, T.J., MAKIN, S.A., KADURUGAMUWA, J.L. et LI, Z. (1997). Interactions between biofilms and the environment. FEMS Microbiol. Rev., **20**, 291-303.
- BLACKBURN, J.W. et HAFKER, W.R. (1993). The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. TIBTECH, **11**, 328-333.
- BOETHLING, R.S. et ALEXANDER, M. (1979). Effect of concentration of organic chemicals on their biodegradation by natural microbial communities. Appl. Environ. Microbiol., **37**, 1211-1216.
- BOLDRIN, B., TIEHM, A. et FRITZSCHE, C. (1993). Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol., **59**, 1927-1930.
- BOONCHAN, S., BRITZ, M.L. et STANLEY, G.A. (1998). Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. Biotechnol Bioeng, **59**, 482-94.
- BOSMA, T.N.P., MIDDELDORP, P.J.M., SCHRAA, G. et ZEHNDER, A.J.B. (1997). Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. Environ. Sci. Technol., **31**, 248-252.
- BOSSERT, I., KACHEL, W. et BARTHA, R. (1984). Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. Appl. Environ. Microbiol., **47**, 763-767.
- BOSSERT, I.D. et BARTHA, R. (1986). Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **37**, 490-495.
- BOUCHEZ, M., BLANCHET, D., BESNAINOU, B., LEVEAU, J.-Y. et VANDECASTEELE, J.-P. (1997a). Kinetic studies of biodegradation of insoluble

- compounds by continuous determination of oxygen consumption. J. Appl. Microbiol., **82**, 310-316.
- BOUCHEZ, M., BLANCHET, D., HAESELER, F. et VANDECASTEELE, J.-P. (1996). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Première partie: propriétés, origines, devenir. Revue de l'Institut français du pétrole, **51**, 407-419.
- BOUCHEZ, M., BLANCHET, D. et VANDECASTEELE, J.-P. (1995). Substrate availability in phenanthrene biodegradation: transfer mechanism and influence on metabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol., **43**, 952-960.
- BOUCHEZ, M., BLANCHET, D. et VANDECASTEELE, J.-P. (1997b). An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain. Microbiology, **143**, 1087-1093.
- BOUCHEZ-NAÏTALI, M., RAKATOZAFY, H., MARCHAL, R., LEVEAU, J.-Y. et VANDECASTEELE, J.-P. (1999). Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. J. Appl. Microbiol., **86**, 421-428.
- BOYD, A. et CHAKRABARTY, A.M. (1994). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol., **60**, 2355-2359.
- BOYD, A. et CHAKRABARTY, A.M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. J. Ind. Microbiol., **15**, 162-168.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**, 248-254.
- BRADLEY, D.E. (1974). The adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophages to a host mutant with nonretractile pili. Virology, **58**, 149-163.
- BRANDL, H., GROSS, R.A., LENZ, R.W. et FULLER, R.C. (1988). *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(α -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. Appl Environ Microbiol., **54**, 1977-1982.

- BRANNY, P., PEARSON, J.P., PESCI, E.C., KÖHLER, T., IGLEWSKI, B.H. et VAN DELDEN, C. (2001). Inhibition of quorum sensing by a *Pseudomonas aeruginosa* *dks* homologue.
- BRINK, L.E.S. et TRAMPER, J. (1985). Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. Biotechnol. Bioeng., 27, 1258-1269.
- BRINK, L.E.S., TRAMPER, J., LUYBEN, K.C.A.M. et VAN TRIET, K. (1988). Biocatalysis in organic media. Enzyme Microb. Technol., 10, 736-743.
- BRÖZEL, V.S., STRYDOM, G.M. et CLOETE, T.E. (1995). A method for the study of *de novo* protein synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* after attachment. Biofouling, 8, 195-210.
- BRUCE, L.J. et DAUGULIS, A.J. (1991). Solvent selection strategies for extractive biocatalysis. Biotechnol. Prog., 7, 116-124.
- BUGG, T., FOGHT, J.M., PICKARD, M.A. et GRAY, M.R. (2000). Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. Appl Environ Microbiol., 66, 5387-92.
- BURGER, M.M., GLASER, L. et BURTON, R.M. (1963). The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem., 238, 2595-2602.
- BURGER, M.M., GLASER, L. et BURTON, R.M. (1966). Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. Methods Enzymol., 8, 441-445.
- BURKART, M., TOGUCHI, A. et HARSHEY, R.M. (1998). The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 2568-2573.
- BURY, S.J. et MILLER, C.A. (1993). Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. Environ. Sci. Technol., 27, 104-110.
- BUSHNELL, L.D. et HAAS, H.F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bacteriol., 41, 653-673.
- BUSSCHER, H.J., VAN HOOGMOED, C.G., GEERTSEMA-DOORNBUSH, G.I., VAN DER KUIJL-BOOIJ, M. et VAN DER MEI, H.C. (1997). *Streptococcus*

- thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 3810-3817.
- BYERS, D. et MEIGHEN, E. (1985). Purification and characterization of a bioluminescence-related fatty acyl esterase from *Vibrio harveyi*. J. Biol. Chem., **260**, 6938-6944.
- CALDWELL, M.E., GARRETT, R.M., PRINCE, R.C. et SUFLITA, J.M. (1998). Anaerobic biodegradation of long-chain *n*-alkanes under sulfate-reducing conditions. Environ. Sci. Technol., **32**, 2191-2195.
- CALVILLO, Y.M. et ALEXANDER, M. (1996). Mechanism of microbial utilization of biphenyl sorbed to polyacrylic beads. Appl. Microbiol. Biotechnol., **45**, 383-390.
- CAMEOTRA, S.S., SINGH, H.D., HAZARIKA, A.K. et BARUAH, J.N. (1983). Mode of uptake of insoluble solid substrates by microorganisms. II: Uptake of solid *n*-alkanes by yeast and bacterial species. Biotechnol. Bioeng., **25**, 2945-2956.
- CAMPOS-GARCÍA, J., CARO, A.D., NÁJERA, R., MILLER-MAIER, R.M., AL-TAHHAN, R.A. et SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. J. Bacteriol., **180**, 4442-4451.
- CARMICHAEL, L.M., CHRISTMAN, R.F. et PFAENDER, F.K. (1997). Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. Environ. Sci. Technol., **31**, 126-132.
- CARPENTER, J.C., CELLA, J.A. et DORN, S.B. (1995). Study of the degradation of polydimethylsiloxanes. Environ. Sci. Technol., **29**, 864-868.
- CERNIGLIA, C.E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. Advances in applied microbiology. Academic Press, Inc. **30**, 31-69.
- CERNIGLIA, C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol., **4**, 331-338.
- CERNIGLIA, C.E. et HEITKAMP, M.A. (1989). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. Metabolism of

- polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. U. Varanassi. Boca Raton, Fla., CRC Press: 41-68.
- CHAKRAVARTY, M., SINGH, H.D. et BARUAH, J.N. (1975). A kinetic model for microbial growth on liquid hydrocarbons. Biotechnol. Bioeng., 17, 399-412.
- CHANDRA, S.D., WARD, C.H. et HUGUES, J.B. (1996). Biodegradation of sorbed fluorene in sediment slurries. Hazardous Waste & Hazardous Materials, 13, 375-385.
- CHANDRASEKARAN, E.V. et BEMILLER, J.N. (1980). Constituent analysis of glucosaminoglycans. New York, Academic Press, Inc.
- CHATZI, E.G., GAVRIELIDES, A.D. et KIPARISSIDES, C. (1989). Generalized model for prediction of the steady-state drop size distribution in batch stirred vessels. Ind. Eng. Chem. Res., 28, 1704-1711.
- CHAYABUTRA, C. et JU, L.-K. (2001). Polyhydroxyalkanoic acids and rhamnolipids are synthesized sequentially in hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* 10145. Biotechnol. Prog., 17, 419-423.
- CHO, H. et CRONAN, J.E. (1993). *Escherichia coli* thioesterase I, molecular cloning and sequencing of the structural gene and identification as a periplasmic enzyme. J. Biol. Chem., 268, 9238-9245.
- CHRISTENSEN, B.B., STERNBERG, C., ANDERSEN, J.B., PALMER, R.J., NIELSEN, A.T., GIVSKOV, M. et MOLIN, S. (1999). Molecular tools for study of biofilm physiology. Methods Enzymol, 310, 20-42.
- CHUGANI, S.A., WHITELEY, M., LEE, K.M., D'ARGENIO, D., MANOIL, C. et GREENBERG, E.P. (2001). QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 2752-2757.
- CHURCHILL, P.F. et CHURCHILL, S.A. (1997). Surfactant-enhanced biodegradation of solid alkanes. J. Env. Sci. Health, A32, 293-306.

- CHURCHILL, S.A., GRIFFIN, R.A., JONES, L.P. et CHURCHILL, P.F. (1995). Biodegradation rate enhancement of hydrocarbons by an oleophilic fertilizer and a rhamnolipid biosurfactant. J. Environ. Qual., 24, 19-28.
- CHURCHILL, S.A., HARPER, J.P. et CHURCHILL, P.F. (1999). Isolation and Characterization of a *Mycobacterium* Species Capable of Degrading Three- and Four-Ring Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol., 65, 549-552.
- COATES, J.D., ANDERSON, R.T. et LOVLEY, D.R. (1996). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. Appl. Environ. Microbiol., 62, 1099-1101.
- COATES, J.D., WOODWARD, J., ALLEN, J., PHILP, P. et LOVLEY, D.R. (1997). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. Appl. Environ. Microbiol., 63, 3589-3593.
- COCHRAN, W.L., SUH, S.-J., MCFETERS, G.A. et STEWART, P.S. (2000). Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. J. Appl. Microbiol., 88, 546-553.
- COLLINS, A.M., WOODLEY, J.M. et LIDDELL, J.M. (1995). Determination of reactor operation for the microbial hydroxylation of toluene in a two-liquid phase process. J. Ind. Microbiol., 14, 382-388.
- COLLINS, L.D. et DAUGULIS, A.J. (1996). Use of two phase partitioning bioreactors for the biodegradation of phenol. Biotechnol. Tech., 10, 643-648.
- COLLINS, L.D. et DAUGULIS, A.J. (1997a). Biodegradation of phenol at high initial concentrations in two-phase partitioning batch and fed-batch bioreactors. Biotechnol. Bioeng., 55, 155-162.
- COLLINS, L.D. et DAUGULIS, A.J. (1997b). Characterization and optimisation of a two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of phenol. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48, 18-22.

- COLORES, G.M., MACUR, R.E., WARD, D.M. et INSKEEP, W.P. (2000). Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. Appl Environ Microbiol, **66**, 2959-64.
- COOKSON, J.T. (1995). Bioremediation engineering: design and application. New York, N. Y., McGraw-Hill.
- COOPER, D.G., LISS, S.N., LONGAY, R. et ZAJIC, J.E. (1981). Surface activity of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*. J. Ferment. Technol., **59**, 97-101.
- COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R. et LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995). Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol., **49**, 711-745.
- COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., DEBEER, D., CALDWELL, D., KORBER, D. et JAMES, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. J. Bacteriol., **176**, 2137-2142.
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S. et GREENBERG, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, **284**, 1318-1322.
- CRAVEN, R. et MONTIE, T.C. (1985). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis by the nitrogen source. J. Bacteriol., **164**, 544-549.
- CROCKER, F.H., GUERIN, W.F. et BOYD, S.A. (1995). Bioavailability of naphthalene sorbed to cationic surfactant-modified smectite clay. Environ. Sci. Technol., **29**, 2953-2958.
- CRUDEN, D.L., WOLFRAM, J.H., ROGERS, R.D. et GIBSON, D.T. (1992). Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. Appl. Environ. Microbiol., **58**, 2723-2729.
- CUTRIGHT, T.J. et LEE, S. (1994). Microorganisms & metabolic pathways for remediation of PAH contaminated soil. Fresenius Envir. Bull., **3**, 413-421.
- DAGHER, F., DÉZIEL, E., LIRETTE, P., PAQUETTE, G., BISAILLON, J.-G. et VILLEMUR, R. (1997). Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. Can. J. Microbiol., **43**, 368-377.

- DARZINS, A. (1993). The *pilG* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* pilus production and twitching motility, is homologous to the enteric single-domain response regulator CheY. J. Bacteriol., 175, 5934-5944.
- DARZINS, A. (1994). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. Mol. Microbiol., 11, 137-153.
- DARZINS, A. et RUSSELL, M.A. (1997). Molecular genetic analysis of type-4 pilus biogenesis and twitching motility using *Pseudomonas aeruginosa* as a model system - a review. Gene, 192, 109-115.
- DAUGULIS, A. (1997). Partitioning bioreactors. Curr. Opin. Biotechnol., 8, 169-174.
- DAUGULIS, A.J. (1994). Integrated fermentation and recovery processes. Curr. Opin. Biotechnol., 5, 192-195.
- DAVEY, M.E. et O'TOOLE, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64, 847-867.
- DAVIES, D.G., CHAKRABARTY, A.M. et GEESEY, G.G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol., 59, 1181-1186.
- DAVIES, D.G., PARSEK, M.R., PEARSON, J.P., IGLEWSKI, B.H., COSTERTON, J.W. et GREENBERG, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science, 280, 295-298.
- DE KIEVIT, T. et IGLEWSKI, B.H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect. Immun., 68, 4839-4849.
- DE KIEVIT, T., SEED, P.C., NEZEZON, J., PASSADOR, L. et IGLEWSKI, B.H. (1999). *RsaL*, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 181, 2175-84.
- DE KIEVIT, T.R., GILLIS, R., MARX, S., BROWN, C. et IGLEWSKI, B.H. (2001). Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. Appl. Environ. Microbiol., 67, 1865-1873.

- DE KIEVIT, T.R. et IGLEWSKI, B.H. (1999). Quorum sensing, gene expression, and *Pseudomonas* biofilms. Biofilms. R.J. Doyle. San Diego, Academic Press. **310**: 117-128.
- DEAN-ROSS, D. et CERNIGLIA, C.E. (1996). Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **46**, 307-312.
- DELAQUIS, P.J., CALDWELL, D.E., LAWRENCE, J.R. et MCCURDY, A.R. (1989). Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. Microb. Ecol., **18**, 199-210.
- DENOME, S.A., STANLEY, D.C., OLSON, E.S. et YOUNG, K.D. (1993). Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol., **175**, 6890-6901.
- DESAI, J.D. et BANAT, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **61**, 47-64.
- DESCHÊNES, L., LAFRANCE, P., VILLENEUVE, J.P. et SAMSON, R. (1995). The effect of an anionic surfactant on the mobilization and biodegradation of PAHs in a creosote-contaminated soil. Hydrol. Sci. J., **40**, 471-484.
- DESCHÊNES, L., LAFRANCE, P., VILLENEUVE, J.-P. et SAMSON, R. (1996). Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. Appl. Microbiol. Biotechnol., **46**, 638-646.
- DÉZIEL, E. (1996). Étude de la production de biosurfactants par des souches bactériennes métabolisant les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier. Laval, Université du Québec: 248p.
- DÉZIEL, E., COMEAU, Y. et VILLEMUR, R. (1999a). Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. Biodegradation, **10**, 219-233.
- DÉZIEL, E., COMEAU, Y. et VILLEMUR, R. (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with the emergence of hyperpiliated

- and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities. J. Bacteriol., **183**, 1195-1204.
- DÉZIEL, E., LÉPINE, F., DENNIE, D., BOISMENU, D., MAMER, O.A. et VILLEMUR, R. (1999b). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. Biochim. Biophys. Acta, **1440**, 244-252.
- DÉZIEL, E., LÉPINE, F., MILOT, S. et VILLEMUR, R. (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. Biochim. Biophys. Acta, **1485**, 145-152.
- DÉZIEL, É., PAQUETTE, G., VILLEMUR, R., LÉPINE, F. et BISAILLON, J.-G. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 1908-1912.
- DILLON, J.K., FUERST, J.A., HAYWARD, A.C. et DAVIS, G.H.G. (1986). A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity. J. Microbiol. Meth., **6**, 13-19.
- DIPPLE, A., CHENG, S.C. et BIGGER, C.A.H. (1989). Polycyclic aromatic hydrocarbons carcinogens. New York, Wiley-Liss.
- DONETTI, A.-M. (2000). Implication des rhamnolipides produits par la souche *Pseudomonas aeruginosa* 57RP durant l'évolution d'un biofilm. Centre de microbiologie et biotechnologie. Laval, INRS-Institut Armand-Frappier: 125.
- DUNN, I.J. (1968). An interfacial kinetics model for hydrocarbon oxidation. Biotechnol. Bioeng., **10**, 891-894.
- DYBVIG, K. (1993). DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. Mol. Microbiol., **10**, 465-471.
- DZOMBAK, D.A. et LUTHY, R.G. (1984). Estimating adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils. Soil Science, **137**, 292-308.
- EATON, R.W. et CHAPMAN, P.J. (1992). Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. J. Bacteriol., **174**, 7542-7554.

- EBERL, L. (1999). N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. Syst Appl Microbiol, 22, 493-506.
- EBERL, L., MOLIN, S. et GIVSKOV, M. (1999). Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. J. Bacteriol., 181, 1703-1712.
- EDWARDS, D.A., LIU, Z. et LUTHY, R.G. (1994). Surfactant solubilization of organic compounds in soil/aqueous systems. J. Environ. Eng. ASCE, 120, 5-22.
- EDWARDS, D.A., LUTHY, R.G. et LIU, Z. (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. Environ. Sci. Technol., 25, 127-133.
- EDWARDS, J.R. et HAYASHI, J.A. (1965). Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. Arch. Biochem. Biophys., 111, 415-421.
- EFROYMSON, R.A. et ALEXANDER, M. (1991). Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1441-1447.
- EFROYMSON, R.A. et ALEXANDER, M. (1994). Role of partitioning in biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. Environ. Sci. Technol., 28, 1172-1179.
- EFROYMSON, R.A. et ALEXANDER, M. (1995). Reduced mineralization of low concentrations of phenanthrene because of sequestering in nonaqueous-phase liquids. Environ. Sci. Technol., 29, 515-521.
- EHRENREICH, P., BEHREND, A., HARDER, J. et WIDDEL, F. (2000). Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. Arch Microbiol, 173, 58-64.
- EL AALAM, S., PAUSS, A. et LEBEAULT, J.-M. (1993). High efficiency styrene biodegradation in a biphasic organic/water continuous reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 696-699.
- ENSLEY, B.D., RATZKIN, B.J., OSSLUND, T.D., SIMON, M.J., WACKETT, L.P. et GIBSON, D.T. (1983). Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. Science, 222, 167-169.

- ERICKSON, D.C., LOEHR, R.C. et NEUHAUSER, E.F. (1993). PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. Wat. Res., 27, 911-919.
- ERICKSON, L.E., HUMPHREY, A.E. et PROKOP, A. (1969). Growth models of cultures with two liquid phases. I. Substrate dissolved in dispersed phase. Biotechnol. Bioeng., 11, 449-466.
- ERICKSON, L.E. et NAKAHARA, T. (1975). Growth in cultures with two liquid phases: hydrocarbon uptake and transport. Process Biochem., 9-13.
- FAVRE-BULLE, O., SCHOUTEN, T., KINGMA, J. et WITHOLT, B. (1991). Bioconversion of *n*-octane to octanoic acid by a recombinant *Escherichia coli* cultured in a two-liquid phase bioreactor. Bio/Technol., 9, 367-371.
- FELSENSTEIN, J. (1989). PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics, 5, 164-166.
- FIEBIG, R., SCHULZE, D., CHUNG, J.-C. et LEE, S.-T. (1997). Biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the presence of a bioemulsifier produced on sunflower oil. Biodegradation, 8, 67-75.
- FIECHTER, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends Biotechnol., 10, 208-217.
- FINNERTY, W. (1994). Biosurfactants in environmental biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol., 5, 291-295.
- FOGHT, J.M., GUTNICK, D.L. et WESTLAKE, D.W.S. (1989). Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. Appl. Environ. Microbiol., 55, 36-42.
- FOGHT, J.M., WESTLAKE, D.W.S., JOHNSON, W.M. et RIDGWAY, H.F. (1996). Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. Microbiology, 142, 2333-2340.
- FRASER, G.M. et HUGHES, C. (1999). Swarming motility. Curr. Opin. Microbiol., 2, 630-635.

- FREEMAN, A., WOODLEY, J.M. et LILLY, M.D. (1993). *In situ* product removal as a tool for bioprocessing. Bio/Technology, 11, 1007-1012.
- FRIEDRICH, M., GROSSER, R.J., KERN, E.A., INSKEEP, W.P. et WARD, D.M. (2000). Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. Appl Environ Microbiol, 66, 2703-10.
- FUGITA, M., IKE, M. et KAMIYA, T. (1993). Accelerated phenol removal by amplifying the gene expression with recombinant plasmid encoding catechol-2,3-oxygenase. Water Res., 1, 9-13.
- FUJITA, K., AKINO, T. et YOSHIOKA, H. (1988). Characteristics of the heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun., 56, 1385-1387.
- FUQUA, C. et GREENBERG, E.P. (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. Curr Opin Microbiol, 1, 183-9.
- FUQUA, W.C., WINANS, S.C. et GREENBERG, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol., 176, 269-275.
- FURUHASHI, K., SHINTANI, M. et TAGAKI, M. (1986). Effects of solvents on the production of epoxides by *Nocardia corallina* B-276. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 218-223.
- GAMERDINGER, A.P., ACHIN, R.S. et TRAXLER, R.W. (1995). Effect of aliphatic nonaqueous phase liquids on naphthalene biodegradation in multiphase systems. J. Environ. Qual., 24, 1150-1156.
- GARRETT, E.S., PERLEGAS, D. et WOZNIAK, D.J. (1999). Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). J. Bacteriol., 181, 7401-7404.
- GEORGIU, G., LIN, S.-C. et SHARMA, M.M. (1992). Surface-active compounds from microorganisms. Bio/Technology, 10, 60-65.

- GHOSHAL, S., RAMASWAMI, A. et LUTHY, R.G. (1996). Biodegradation of naphthalene from coal tar and heptamethylnonane in mixed batch systems. Environ. Sci. Technol., **30**, 1282-1291.
- GIBBONS, J.A. et ALEXANDER, M. (1989). Microbial degradation of sparingly soluble organic chemicals: phthalate esters. Environ. Toxicol. Chem., **8**, 283-291.
- GIBSON, D.T., MAHADEVAN, V., JERINA, D.M., YAGI, H. et YEH, H.J.C. (1975). Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. Science, **189**, 295-297.
- GIVSKOV, M., ÖSTLING, J., EBERL, L., LINDUM, P.W., CHRISTENSEN, A.B., CHRISTIANSEN, G., MOLIN, S. et KJELLEBERG, S. (1998). Two separate regulatory systems participate in control of swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. J. Bacteriol., **180**, 742-745.
- GLESSNER, A., SMITH, R.S., IGLEWSKI, B.H. et ROBINSON, J.B. (1999). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of twitching motility. J. Bacteriol., **181**, 1623-1629.
- GOMA, G., PAREILLEUX, A. et DURAND, G. (1974). Aspects physico-chimiques de l'assimilation des hydrocarbures par *Candida lipolytica*. Agr. Biol. Chem., **38**, 1273-1280.
- GOSWAMI, P. et SINGH, H.D. (1991). Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. Biotechnol. Bioeng., **37**, 1-11.
- GOVAN, J.R.W. et DERETIC, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol. Rev., **60**, 539-574.
- GOYER, S., JAOUICH, A., MORENCY, M. et COUILLARD, D. (1995). Techniques de restauration de sites contaminés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques [HAP]. I - Fondements et procédés biologiques. Vecteur Environ., **28**, 43-53.
- GRAY, K.M. (1997). Intercellular communication and group behavior in bacteria. Trends Microbiol., **5**, 184-8.

- GRAY, M.R., BANERJEE, D.K., FEDORAK, P.M., HASHIMOTO, A., MASLIYAH, J.H. et PICKARD, M.A. (1994). Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol., **40**, 933-940.
- GRIMM, A.C. et HARWOOD, C.S. (1997). Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 4111-4115.
- GRIMM, A.C. et HARWOOD, C.S. (1999). NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. J Bacteriol., **181**, 3310-6.
- GROSSER, R.J., FRIEDRICH, M., WARD, D.M. et INSKEEP, W.P. (2000). Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: different enrichment conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolates. Appl Environ Microbiol., **66**, 2695-702.
- GROSSER, R.J., WARSHAWSKY, D. et VESTAL, J.R. (1991). Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[*a*]pyrene, and carbazole in soils. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 3462-3469.
- GUERIN, W.F. et BOYD, S.A. (1992). Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. Appl. Environ. Microbiol., **58**, 1142-1152.
- GUERIN, W.F. et BOYD, S.A. (1997). Bioavailability of naphthalene associated with natural and synthetic sorbents. Wat. Res., **31**, 1504-1512.
- GUERRA-SANTOS, L.H., KÄPPELI, O. et FIECHTER, A. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol., **24**, 443-448.
- GUERRA-SANTOS, L.H., KÄPPELI, O. et FIECHTER, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Environ. Microbiol., **48**, 301-305.

- GUHA, S. et JAFFÉ, P.R. (1996). Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. Environ. Sci. Technol., **30**, 1382-1391.
- GUTIERREZ, J.R. et ERICKSON, L.E. (1977). Hydrocarbon uptake in hydrocarbon fermentations. Biotechnol Bioeng, **43**, 1136-1141.
- HAASE, E.M., ZMUDA, J.L. et SCANNAPIECO, F.A. (1999). Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun, **67**, 2901-8.
- HAFERBURG, D., HOMMEL, R., CLAUS, R. et KLEBER, H.-P. (1986). Extracellular microbial lipids as biosurfactants. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., **33**, 53-93.
- HAHN, H.P. (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* - a review. Gene, **192**, 99-108.
- HAMBY, D. (1996). Site remediation techniques supporting environmental restoration activities: a review. Sci. Total Environ., **191**, 203-224.
- HAN, B., PAIN, A. et JOHNSTONE, K. (1997). Spontaneous duplication of a 661 bp element within a two-component sensor regulator causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. Mol. Microbiol., **25**, 211-218.
- HARBRON, S., SMITH, B.W. et LILLY, M.D. (1986). Two-liquid phase biocatalysis: epoxydation of 1,7-octadiene by *Pseudomonas putida*. Enzyme Microb. Technol., **8**, 85-88.
- HARMS, H. (1999). The use of laboratory model systems to elucidate the mechanisms of bioavailability of hydrophobic organic compounds. Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. P. Baveye. Kluwer Academics Publishers: 121-134.
- HARMS, H. et BOSMA, T.N.P. (1997). Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **18**, 97-105.
- HARMS, H. et ZEHNDER, A.J.B. (1995). Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 27-33.

- HARROP, A.J., HOCKNULL, M.D. et LILLY, M.D. (1989). Biotransformation in organic solvents: a difference between Gram-positive and Gram-negative bacteria. Biotechnol. Lett., 11, 807-810.
- HARSHEY, R.M. (1994). Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. Mol. Microbiol., 13, 389-394.
- HARVEY, S., ELASHVILI, I., VALDES, J.J., KAMELY, D. et CHAKRABARTY, A.M. (1990). Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. Bio/Technology, 8, 228-230.
- HASMAN, H., SCHEMBRI, M.A. et KLEMM, P. (2000). Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., 182, 1089-1095.
- HASSETT, D.J., SCHWEIZER, H.P. et OHMAN, D.E. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. J. Bacteriol., 177, 6330-6337.
- HASTINGS, J.W. et GREENBERG, E.P. (1999). Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. J Bacteriol., 181, 2667-8.
- HATZINGER, P.B. et ALEXANDER, M. (1995). Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. Environ. Sci. Technol., 29, 537-545.
- HATZINGER, P.B. et ALEXANDER, M. (1997). Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles. Environ. Toxicol. Chem., 16, 2215-2221.
- HAUSER, G. et KARNOVSKY, M.L. (1954). Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 68, 645-654.
- HAUSER, G. et KARNOVSKY, M.L. (1957). Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem., 224, 91-105.
- HEAD, I.M. (1998). Bioremediation: towards a credible technology. Microbiology, 144, 599-608.

- HEATH, R.J. et ROCK, C.O. (1998). A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. J. Bacteriol., 180, 1425-1430.
- HEITKAMP, M.A., FRANKLIN, W. et CERNIGLIA, C.E. (1988). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol., 54, 2549-2555.
- HENDERSON, I.R., OWEN, P. et NATARO, J.P. (1999). Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. Mol. Microbiol., 33, 919-932.
- HERBES, S.E. et SCHWALL, L.R. (1978). Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments. Appl. Environ. Microbiol., 35, 306-316.
- HERMAN, D.C., LENHARD, R.J. et MILLER, R.M. (1997). Formation and removal of hydrocarbon residual in porous media: effects of attached bacteria and biosurfactants. Environ. Sci. Technol., 31, 1290-1294.
- HINGLEY, S.T., HASTIE, A., KUEPPERS, F., HIGGINS, M.L., WEINBAUM, G. et SHRYOCK, T. (1986). Effect of ciliostatic factors from *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. Infect. Immun., 51, 254-262.
- HISATSUKA, K.-I., NAKAHARA, T., SANO, N. et YAMADA, K. (1971). Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. Agr. Biol. Chem., 35, 686-692.
- HO, C.S., JU, L.-K. et BADDOUR, R.F. (1990). Enhancing penicillin fermentation by increased oxygen solubility through the addition of *n*-hexadecane. Biotechnol. Bioeng., 36, 1110-1118.
- HOCKNULL, M.D. et LILLY, M.D. (1988). The stability of the Δ^1 -dehydrogenation system of *Arthrobacter simplex* in organic solvent/aqueous two-liquid phase environments. Enzyme Microb. Technol., 10, 669-674.
- HOLLIGER, C., SCHRAA, G., STAMS, A.J.M. et ZEHNDER, A.J.B. (1992). Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. Appl. Environ. Microbiol., 58, 1636-1644.

- HOMMEL, R. (1994). Formation and function of biosurfactants for degradation of water-insoluble substrates. Biochemistry of microbial degradation. C. Ratledge, Kluwer Academic Publishers: 63-87.
- HOMMEL, R.K. (1990). Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. Biodegradation, 1, 107-119.
- HUANG, S.-Y. et CHOU, M. (1990). Kinetic model for microbial uptake on insoluble solid-state substrate. Biotechnol Bioeng, 35, 547-558.
- HUESEMANN, M.H. (1994). Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils. J. Soil Contam., 3, 1-20.
- HUGHES, J.B., BECKLES, D.M., CHANDRA, S.D. et WARD, C.H. (1997). Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 18, 152-160.
- HUISMAN, G.W., DE LEEUW, O., EGGINK, G. et WITHOLT, B. (1989). Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol., 55, 1949-1954.
- HUNT, W.P., ROBINSON, K.G. et GHOSH, M.M. (1994). The role of biosurfactants in biotic degradation of hydrophobic organic compounds. Boca Raton, Lewis Publishers: 318-322.
- INOUE, A. et HORIKOSHI, K. (1991). Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log P. J. Ferment. Bioeng., 71, 194-196.
- IQBAL, S., KHALID, Z.M. et MALIK, K.A. (1995). Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. Lett. Appl. Microbiol., 21, 176-179.
- ISHIMOTO, K.S. et LORY, S. (1989). Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative σ factor (RpoN) subunit of RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1954-1957.
- ITO, S. et INOUE, S. (1982). Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. Appl Environ Microbiol, 43, 1278-1283.

- ITOH, S., HONDA, H., TOMITA, F. et SUZUKI, T. (1971). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). J. Antibiot., 24, 855-859.
- ITOH, S. et SUZUKI, T. (1972). Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in *n*-paraffin-utilizing ability. Agr. Biol. Chem., 36, 2233-2235.
- IWABUCHI, T. et HARAYAMA, S. (1997). Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol., 179, 6488-6494.
- IWABUCHI, T. et HARAYAMA, S. (1998). Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. J Biol Chem, 273, 8332-6.
- JAIN, D.K., COLLINS-THOMPSON, D.L., LEE, H. et TREVORS, J.T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. J. Microbiol. Methods, 13, 271-279.
- JARVIS, F.G. et JOHNSON, M.J. (1949). A glycolipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc., 71, 4124-4126.
- JIMENEZ, I. et BARTHA, R. (1996). Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol., 62, 2311-2316.
- JOHNSON, M.K. et BOESE-MARRAZZO, D. (1980). Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun., 29, 1028-1033.
- JORDAN, R.N. et CUNNINGHAM, A.B. (1999). Surfactant-enhanced bioremediation: A review of the effects of surfactants on the bioavailability of hydrophobic organic chemicals in soils. Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. P. Baveye, Kluwer Academic Publishers: 463-496.
- JU, L.K. et HO, C.S. (1989). Oxygen diffusion coefficient and solubility in *n*-hexadecane. Biotechnol. Bioeng., 34, 1221-1224.

- JUHASZ, A.L., BRITZ, M.L. et STANLEY, G.A. (1996). Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. Biotechnol. Lett., **18**, 577-582.
- JUHASZ, A.L., BRITZ, M.L. et STANLEY, G.A. (1997a). Degradation of benzo[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene and coronene by *Burkholderia cepacia*. Wat. Sci. Tech., **36**, 45-51.
- JUHASZ, A.L., BRITZ, M.L. et STANLEY, G.A. (1997b). Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. J. Appl. Microbiol., **83**, 189-198.
- KAMOUN, S. et KADO, C.I. (1990). Phenotypic switching affecting chemotaxis, xanthan production, and virulence in *Xanthomonas campestris*. Appl. Environ. Microbiol., **56**, 3855-3860.
- KANALY, R.A., BARTHA, R., WATANABE, K. et HARAYAMA, S. (2000). Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. Appl Environ Microbiol., **66**, 4205-11.
- KANGA, S.A., BONNER, J.S., PAGE, C.A., MILLS, M.A. et AUTENRIETH, R.L. (1997). Solubilization of naphthalene and methyl-substituted naphthalenes from crude oil using biosurfactants. Environ. Sci. Technol., **31**, 556-561.
- KARICKHOFF, S.W., BROWN, D.S. et SCOTT, T.A. (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. Wat. Res., **13**, 241-248.
- KÄSTNER, M., BREUER-JAMMALI, M. et MAHRO, B. (1994). Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Appl. Microbiol. Biotechnol., **41**, 267-273.
- KEITH, L.H. et TELLIARD, W.A. (1979). Priority pollutants. I-a perspective view. Environ. Sci. Technol., **13**, 416-423.
- KELLEY, I., FREEMAN, J.P., EVANS, F.E. et CERNIGLIA, C.E. (1991). Identification of a carboxylic acid metabolite from the catabolism of fluoranthene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 636-641.

- KELMAN, A. et HRUSCHKA, J. (1973). The role of motility and aerotaxis in the selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of *Pseudomonas solanacearum*. J. Gen. Microbiol., 76, 177-188.
- KELSEY, J.W. et ALEXANDER, M. (1997). Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. Environ. Toxicol. Chem., 16, 582-585.
- KEUTH, S. et REHM, H.-J. (1991). Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil. Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 804-808.
- KHAN, A.A., WANG, R.-F., CAO, W.-W., FRANKLIN, W. et CERNIGLIA, C.E. (1996). Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. Int. J. Syst. bacteriol., 46, 466-469.
- KING, E.O., WARD, M.K. et RANEY, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med., 44, 301.
- KIRSHNER ZILBER, I., ROSENBERG, E. et GUTNICK, D. (1980). Incorporation of ^{32}P and growth of *Pseudomonas* UP-2 on *n*-tetracosane. Appl. Environ. Microbiol., 40, 1086-1093.
- KIYOHARA, H., TORIGOE, S., KAIDA, N., ASAKI, T., IIDA, T., HAYASHI, H. et TAKIZAWA, N. (1994). Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *puh*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol., 176, 2439-2443.
- KNUTSON, C.A. et JEANES, A. (1968). A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. Anal. Biochem., 24, 470-481.
- KOCH, A.K., KÄPPELI, O., FIECHTER, A. et REISER, J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J. Bacteriol., 173, 4212-4219.

- KÖHLER, A., SCHÜTTOFF, M., BRYNIOK, D. et KNACKMUSS, H.-J. (1994). Enhanced biodegradation of phenanthrene in a biphasic culture system. Biodegradation, 5, 93-103.
- KÖHLER, T., CURTY, L.K., BARJA, F., VAN DELDEN, C. et PECHÈRE, J.-C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J. Bacteriol., 182, 5990-5996.
- KOWNATZKI, R., TUMMLER, B. et DORING, G. (1987). Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. Lancet, 1, 1026-7.
- KROPINSKI, A.M., CHAN, L.C. et MILAZZO, F.H. (1979). The extraction and analysis of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO, and three rough mutants. Can J Microbiol., 25, 390-8.
- KUCHMA, S.L. et O'TOOLE, G.A. (2000). Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. Curr Opin Biotechnol., 11, 429-33.
- KURIOKA, S. et LIU, P.V. (1967). Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase c activity. J. Bacteriol., 93, 670-674.
- KURODA, A., KUMANO, T., TAGUCHI, K., NIKATA, T., KATO, J. et OHTAKE, H. (1995). Molecular cloning and characterization of a chemotactic transducer gene in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 177, 7019-7025.
- LAANE, C., BOEREN, S. et VOS, K. (1985). On optimizing organic solvents in multi-liquid phase biocatalysis. Trends Biotechnol., 3, 251-252.
- LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K. et VEEGER, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng., 30, 81-87.
- LABARE, M.P. et ALEXANDER, M. (1995). Enhanced mineralization of organic compounds in nonaqueous-phase liquids. Environ. Toxicol. Chem., 14, 257-265.
- LAFRANCE, P. et LAPOINTE, M. (1998). Mobilization and co-transport of pyrene in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants in sandy soil columns. Ground Water Monitoring and Remediation, 18, 139-147.
- LAHA, S. et LUTHY, R.G. (1991). Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. Environ. Sci. Technol., 25, 1920-1930.

- LAM, J.S., CHAN, R., LAM, K. et COSTERTON, J.W. (1980). Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. Infect. Immun., 28, 546-556.
- LAM, M.Y.C., MCGROARTY, E.J., KROPINSKI, A.M., MACDONALD, L.A., PEDERSEN, S.S., HOIBY, N. et LAM, J.S. (1989). Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol., 27, 962-967.
- LANG, S. et WAGNER, F. (1993). Biological activities of biosurfactants. Biosurfactants: production, properties, applications. N. Kosaric. New York, Marcel Dekker, Inc. **48**: 251-268.
- LANG, S. et WULLBRANDT, D. (1999). Rhamnolipids - biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 22-32.
- LAOR, Y., STROM, P.F. et FARMER, W.J. (1996). The effect of sorption on phenanthrene bioavailability. J. Biotechnol., 51, 227-234.
- LAROSE, Y. (1993). Des microbes qui nettoient les sols contaminés. Québec Science, 31, 42-43.
- LATIFI, A., FOGLINO, M., TANAKA, K., WILLIAMS, P. et LAZDUNSKI, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. Mol. Microbiol., 21, 1137-1146.
- LAZAZZERA, B.A., SOLOMON, J.M. et GROSSMAN, A.D. (1997). An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. Cell, 89, 917-925.
- LEAHY, J.G. et COLWELL, R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev., 54, 305-315.
- LEDUC, R., SAMSON, R., AL-BASHIR, B., AL-HAWARI, J. et CSEH, T. (1992). Biotic and abiotic disappearance of four PAH compounds from flooded soil under various redox conditions. Wat. Sci. Tech., 26, 51-60.

- LÉPINE, F., DÉZIEL, E., MILOT, S. et VILLEMUR, R. (2001). LC/MS detection of the 3-(3-hydroxy-alkanoyloxy)-alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. J. Mass Spectr., Soumis.
- LILLY, M.D., BRAZIER, A.J., HOCKNULL, M.D., WILLIAMS, A.C. et WOODLEY, J.M. (1987). Biological conversion involving water-insoluble organic compounds. Biocatalysis in organic media. C. Laane, J. Tramper et M.D. Lilly. Amsterdam, Elsevier Science Publishers: 3-17.
- LIN, S.-C. (1996). Biosurfactants: recent advances. J. Chem. Tech. Biotechnol., **66**, 109-120.
- LINDUM, P.W., ANTHONI, U., CHRISTOPHERSEN, C., EBERL, L., MOLIN, S. et GIVSKOV, M. (1998). N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MGL. J. Bacteriol., **180**, 6384-6388.
- LIU, Z., JACOBSON, A.M. et LUTHY, R.G. (1995). Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 145-151.
- LIU, Z., LAHA, S. et LUTHY, R.G. (1991). Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil-water systems. Water Sci. Technol., **23**, 475-485.
- LOEWEN, P.C. et HENGGE-ARONIS, R. (1994). The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. Annu Rev Microbiol., **48**, 53-80.
- LONG, C.D., MADRASWALA, R.N. et SEIFERT, H.S. (1998). Comparisons between colony phase variation of *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 and pilus, pilin, and S-pilin expression. Infect. Immun., **66**, 1918-1927.
- LUTHY, R.G., AIKEN, G.R., BRUSSEAU, M.L., CUNNINGHAM, S.D., GSCHWEND, P.M., PIGNATELLO, J.J., REINHARD, M., TRAINA, S.J., WEBER, W.J., JR. et WESTALL, J.C. (1997). Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. Environ. Sci. Technol., **31**, 3341-3347.
- LUZAR, M.A., THOMASSEN, M.J. et MONTIE, T.C. (1985). Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical conditions. Infect. Immun., **50**, 577-582.

- MACRAE, J.D. et HALL, K.J. (1998). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in marine sediment under denitrifying condtions. Wat. Sci. Tech., 38, 177-185.
- MADSEN, E.L., SINCLAIR, J.L. et GHIORSE, W.C. (1991). In situ biodegradation: microbiological patterns in a contaminated aquifer. Science, 252, 830-833.
- MAENG, J.H., SAKAI, Y., TANI, Y. et KATO, N. (1996). Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of *n*-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. J Bacteriol, 178, 3695-700.
- MAHAFFEY, W.R., GIBSON, D.T. et CERNIGLIA, C.E. (1988). bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[*a*]anthracene. Appl. Environ. Microbiol., 54, 2415-2423.
- MAIER, R.M. et SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 54, 625-633.
- MAKIN, S.A. et BEVERIDGE, T.J. (1996). The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. Microbiology, 142, 299-307.
- MANILAL, V.B. et ALEXANDER, M. (1991). Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 401-405.
- MARCOUX, J., DEZIEL, E., VILLEMUR, R., LEPINE, F., BISAILLON, J.G. et BEAUDET, R. (2000). Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons' degradation in a two-liquid-phase bioreactor. J Appl Microbiol, 88, 655-62.
- MARIN, M., PEDREGOSA, A. et LABORDA, F. (1996). Emulsifier production and microscopical study of emulsions and biofilms formed by the hydrocarbon-utilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 660-667.
- MARTIN, D.W., SCHURR, M.J., MUDD, M.H., GOVAN, J.R.W., HOLLOWAY, B.H. et DERETIC, V. (1993). Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas*

- aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 8377-8381.
- MARX, R.B. et AITKEN, M.D. (1999). Quantification of chemotaxis to naphthalene by *Pseudomonas putida* G7. Appl Environ Microbiol, **65**, 2847-52.
- MASDUKI, A., NAKAMURA, J., OHGA, T., UMEZAKI, R., KATO, J. et OHTAKE, H. (1995). Isolation and characterization of chemotaxis mutants and genes of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., **177**, 948-952.
- MATHEE, K., CIOFU, O., STERNBERG, C., LINDUM, P.W., CAMPBELL, J.I.A., JENSEN, P., JOHNSEN, A.H., GIVSKOV, M., OHMAN, D.E., MOLIN, S., HOIBY, N. et KHARAZMI, A. (1999). Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. Microbiology, **145**, 1349-1357.
- MATHEE, K., MCPHERSON, C.J. et OHMAN, D.E. (1997). Posttranslational control of the *algT* (*algL*)-encoded sigma22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN). J. Bacteriol., **179**, 3711-3720.
- MATSUYAMA, T., BHASIN, A. et HARSHEY, R.M. (1995). Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol., **177**, 987-991.
- MATSUYAMA, T., KANEDA, K., ISHIZUKA, I., TOIDA, T. et YANO, I. (1990). Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxy fatty acids produced by *Serratia rubidaea*. J. Bacteriol., **172**, 3015-3022.
- MATSUYAMA, T., KANEDA, K., NAKAGAWA, Y., ISA, K., HARA-HOTTA, H. et YANO, I. (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol., **174**, 1769-1776.
- MATSUYAMA, T., MURAKAMI, T., FUJITA, M., FUJITA, S. et YANO, I. (1986). Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. J. Gen. Microbiol., **132**, 865-875.

- MATSUYAMA, T. et NAKAGAWA, Y. (1996). Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. J. Microbiol. Methods, 25, 165-175.
- MAZUMDER, R., PHELPS, T.J., KRIEG, N.R. et BENOIT, R.E. (1999). Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. J. Microbiol. Meth., 37, 255-263.
- MCALLISTER, K.A., LEE, H. et TREVORS, J.T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. Biodegradation, 7, 1-40.
- MCCLURE, C.D. et SCHILLER, N.L. (1996). Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo. Curr. Microbiol., 33, 109-117.
- MCKNIGHT, S.L., IGLEWSKI, B.H. et PESCI, E.C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 182, 2702-2708.
- MCLEE, A.G. et DAVIES, S.L. (1972). Linear growth of a *Torulopsis* sp. on *n*-alkanes. Can. J. Microbiol., 18, 315-319.
- MCNALLY, D.L., MIHELICIC, J.R. et LUEKING, D.R. (1998). Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. Environ. Sci. Technol., 32, 2633-2639.
- MCNALLY, D.L., MIHELICIC, J.R. et LUEKING, D.R. (1999). Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. Chemosphere, 38, 1313-1321.
- MEANS, J.C., WOOD, S.G., HASSETT, J.J. et BANWART, W.L. (1980). Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by sediment and soils. Environ. Sci. Technol., 14, 1524-1528.
- MENDELSON, N.H. et SALHI, B. (1996). Patterns of reporter gene expression in the phase diagram of *Bacillus subtilis* colony forms. J. Bacteriol., 178, 1980-1989.

- MIGUEZ, C., BEVERIDGE, T.J. et INGRAM, J.M. (1986). Lipopolysaccharide changes and cytoplasmic polyphosphate granule accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* during growth on hexadecane. Can. J. Microbiol., **32**, 248-253.
- MIHELICIC, J.R., LUEKING, D.R., MITZELL, R.J. et STAPLETON, J.M. (1993). Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. Biodegradation, **4**, 141-153.
- MIHELICIC, J.R. et LUTHY, R.G. (1988). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1182-1187.
- MILLER, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory: 352-355.
- MILLER, R.M. et BARTHA, R. (1989). Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 269-274.
- MILLER, T.L. et JOHNSON, M.J. (1966). Utilization of normal alkanes by yeasts. Biotechnol. Bioeng., **8**, 549-565.
- MIURA, Y., OKAZAKI, M., HAMADA, S.-I., MURAKAWA, S.-I. et YUGEN, R. (1977). Assimilation of liquid hydrocarbon by microorganisms. I. Mechanism of hydrocarbon uptake. Biotechnol. Bioeng., **19**, 701-714.
- MORÁN, A.C., OLIVERA, N., COMMENDATORE, M., ESTEVES, J.L. et SINERIZ, F. (2000). Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. Biodegradation, **11**, 65-71.
- MORGAN, P. et WATKINSON, R.J. (1989). Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. CRC Crit. Rev. Biotechnol., **8**, 305-333.
- MORRIS, N.S., STICKLER, D.J. et MCLEAN, R.J.C. (1999). The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. World J. Urol., **17**, 345-350.
- MORRISON, D.E. et ALEXANDER, M. (1997). Biodegradability of nonaqueous-phase liquids affects the mineralization of phenanthrene in soil because of microbial competition. Environ. Toxicol. Chem., **16**, 1561-1567.

- MOULTON, R.C. et MONTIE, T.C. (1979). Chemotaxis by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 137, 274-280.
- MUELLER, J.G., CHAPMAN, P.J., BLATTMAN, B.O. et PRITCHARD, P.H. (1990). Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. Appl. Environ. Microbiol., 56, 1079-1086.
- MUELLER, J.G., CHAPMAN, P.J. et PRITCHARD, P.H. (1989). Creosote-contaminated sites: their potential for bioremediation. Environ. Sci. Technol., 23, 1197-1201.
- MUELLER, J.G., LANTZ, S.E., ROSS, D., COLVIN, R.J., MIDDAUGH, D.P. et PRITCHARD, P.H. (1993). Strategy using bioreactors and specially selected microorganisms for bioremediation of groundwater contaminated with creosote and pentachlorophenol. Environ. Sci. Technol., 27, 691-698.
- MULDER, H., BREURE, A.M., VAN HOOSCHOOTEN, D., GROTENHUIS, J.T.C., VAN ANDEL, J.G. et RULKENS, W.H. (1998). Effect of biofilm formation by *Pseudomonas* 8909N on the bioavailability of solid naphthalene. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 277-283.
- MULLIGAN, C.N. et GIBBS, B.F. (1989). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol., 55, 3016-3019.
- MUNRO, D.R. et DAUGULIS, A.J. (1997). The use of an organic solvent and integrated fermentation for improved xenobiotic degradation. Res. Environ. Biotechnol., 1, 207-225.
- NAKAHARA, T., ERICKSON, L.E. et GUTIERREZ, J.R. (1977). Characteristics of hydrocarbon uptake in cultures with two liquid phases. Biotechnol. Bioeng., 19, 9-25.
- NEU, T.R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. Microbiol. Rev., 60, 151-166.

- NEUFELD, R.J., ZAJIC, J.E. et GERSON, D.F. (1980). Cell surface measurements in hydrocarbon and carbohydrate fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 39, 511-517.
- NG, T.K. et HU, W.S. (1989). Adherence of emulsan-producing *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrophobic liquids. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 480-485.
- NIKOLOVA, P. et WARD, O.P. (1993). Whole cell biocatalysis in nonconventional media. J. Ind. Microbiol., 12, 76-86.
- NOORDMAN, W.H., JI, W., BRUSSEAU, M.L. et JANSSEN, D.B. (1998). Effects of rhamnolipid biosurfactants on removal of phenanthrene from soil. Environ. Sci. Technol., 32, 1806-1812.
- OBERBREMER, A. et MÜLLER-HURTIG, R. (1989). Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 582-586.
- OBERBREMER, A., MÜLLER-HURTIG, R. et WAGNER, F. (1990). Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 485-489.
- OCHSNER, U.A., FIECHTER, A. et REISER, J. (1994a). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. J. Biol. Chem., 269, 19787-19795.
- OCHSNER, U.A., HEMBACH, T. et FIECHTER, A. (1995). Production of rhamnolipid biosurfactants. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 53, 89-118.
- OCHSNER, U.A., KOCH, A.K., FIECHTER, A. et REISER, J. (1994b). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 176, 2044-2054.
- OCHSNER, U.A. et REISER, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6424-6428.

- OGRAM, A.V., JESSUP, R.E., OU, L.T. et RAO, P.S.C. (1985). Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in soils. Appl. Environ. Microbiol., **49**, 582-587.
- OLD, D.C. et DUGUID, J.P. (1970). Selective outgrowth of fimbriate bacteria in static liquid medium. J. Bacteriol., **103**, 447-456.
- ORTEGA-CALVO, J.-J. et ALEXANDER, M. (1994). Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 2643-2646.
- ORTEGA-CALVO, J.-J., BIRMAN, I. et ALEXANDER, M. (1995). Effects of varying the rate of partitioning of phenanthrene in nonaqueous-phase liquids on biodegradation in soil slurries. Environ. Sci. Technol., **29**, 2222-2225.
- OSSWALD, P., BAVEYE, P. et BLOCK, J.C. (1996). Bacterial influence on partitioning rate during the biodegradation of styrene in a biphasic aqueous-organic system. Biodegradation, **7**, 297-302.
- O'TOOLE, G.A., GIBBS, K.A., HAGER, P.W., PHIBBS, P.V. et KOLTER, R. (2000a). The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, **182**, 425-31.
- O'TOOLE, G.A., KAPLAN, H.B. et KOLTER, R. (2000b). Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol., **54**, 49-79.
- O'TOOLE, G.A. et KOLTER, R. (1998a). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol, **30**, 295-304.
- O'TOOLE, G.A. et KOLTER, R. (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol., **28**, 449-461.
- O'TOOLE, G.A., PRATT, L.A., WATNICK, P.I., NEWMAN, D.K., WEAVER, V.B. et KOLTER, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. Methods in enzymology. **310**: 91-109.

- PAGE, C.A., BONNER, J.S., KANGA, S.A., MILLS, M.A. et AUTENRIETH, R.L. (1999). Biosurfactant solubilization of PAHs. Environ. Eng. Sci., **16**, 465-474.
- PARK, K.S., SIMS, R.C., DUPONT, R.R., DOUCETTE, W.J. et MATTHEWS, J.E. (1990). Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. Environ. Toxicol. Chem., **9**, 187-195.
- PARRA, J.L., GUINEA, J., MANRESA, M.A., ROBERT, M., MERCADÉ, M.E., COMELLES, F. et BOSCH, M.P. (1989). Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. J. Am. Chem. Soc., **66**, 141-145.
- PARSEK, M.R. et GREEBERG, E.P. (1999). Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Biofilms. R.J. Doyle. San Diego, Academic Press. **310**: 43-55.
- PASSADOR, L., COOK, J.M., GAMBELLO, M.J., RUST, L. et IGLEWSKI, B.H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. Science, **260**, 1127-30.
- PEARSON, J.P., PASSADOR, L., IGLEWSKI, B.H. et GREENBERG, E.P. (1995). A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 1490-1494.
- PEARSON, J.P., PESCI, E.C. et IGLEWSKI, B.H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol., **179**, 5756-5767.
- PESCI, E.C., MILBANK, J.B.J., PEARSON, J.P., MCKNIGHT, S., KENDE, A.S., GREENBERG, E.P. et IGLEWSKI, B.H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 11229-11234.
- PESCI, E.C., PEARSON, J.P., SEED, P.C. et IGLEWSKI, B.H. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., **179**, 3127-3132.
- PIGNATELLO, J.J. et XING, B. (1996). Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. Environ. Sci. Technol., **30**, 1-11.

- PINELLI, D., FAVA, F., NOCENTINI, M. et PASQUALI, G. (1997). Bioremediation of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by using different aerobic batch bioreactor systems. J. Soil Contam., 6, 243-256.
- PLESIAT, P., AIRES, J.R., GODARD, C. et KÖHLER, T. (1997). Use of steroids to monitor alterations in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 179, 7004-7010.
- PRATT, L.A. et KOLTER, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol. Microbiol., 30, 285-293.
- PRATT, L.A. et KOLTER, R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. Curr. Opin. Microbiol., 2, 598-603.
- PREUSTING, H., HAZENBERG, W. et WITHOLT, B. (1993). Continuous production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans* in a high-cell-density, two-liquid phase chemostat. Enzyme Microb. Technol., 15, 311-316.
- PRICHANONT, S., LEAK, D.J. et STUCKEY, D.C. (1998). Alkene monooxygenase-catalysed whole cell epoxidation in a two-liquid phase system. Enzyme Microb. Technol., 22, 471-479.
- PRIGENT-COMBARET, C., VIDAL, O., DOREL, C. et LEJEUNE, P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 181, 5993-6002.
- PROKOP, A., ERICKSON, L.E. et PARADES-LOPEZ, O. (1971). Growth models of cultures with two liquid phases. V. Substrate dissolved in dispersed phase-Experimental observations. Biotechnol. Bioeng., 13, 241-256.
- PROKOP, A., LUDVIK, M. et ERICKSON, L.E. (1972). Growth models of cultures with two liquid phases. VIII. Experimental observations on droplet size and interfacial area. Biotechnol. Bioeng., 14, 587-608.
- PROVIDENTI, M.A., LEE, H. et TREVORS, J.T. (1993). Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. J. Ind. Microbiol., 12, 379-395.

- PRUTHI, V. et CAMEOTRA, S.S. (1997). Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. Biotechnol. Tech., 11, 671-674.
- RABUS, R., WILKES, H., SCHRAMM, A., HARMS, G., BEHREND, A., AMANN, R. et WIDDEL, F. (1999). Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of Proteobacteria. Environ Microbiol., 1, 145-57.
- RAHIM, R., OCHSNER, U.A., OLVERA, C., GRANINGER, M., MESSNER, P., LAM, J.S. et SOBERON-CHÁVEZ, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. Mol. Microbiol., 40, 708-718.
- RAMBELOARISOA, E., RONTANI, J.F., GIUSTI, G., DUVNJAK, Z. et BERTRAND, J.-C. (1984). Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. Marine Biology, 83, 69-81.
- RASHID, M.H. et KORNBERG, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 4885-4890.
- READ, R.C., ROBERTS, P., MUNRO, N., RUTMAN, A., HASTIE, A., SHRYOCK, T., HALL, R., MCDONALD-GIBSON, W., LUND, V. et TAYLOR, G. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. J. Appl. Physiol., 72, 2271-2277.
- REDDY, P.G., SINGH, H.D., PATHAK, M.G., BHAGAT, S.D. et BARUAH, J.N. (1983). Isolation and functional characterization of hydrocarbon emulsifying and solubilizing factors produced by a *Pseudomonas* species. Biotechnol. Bioeng., 25, 387-401.
- REHM, B.H.A., KRÜGER, N. et STEINBÜCHEL, A. (1998). A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The

- phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme A transferase. J. Biol. Chem., **273**, 22044-24051.
- REHM, B.H., MITSKY, T.A. et STEINBUCHER, A. (2001). Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by Pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **67**, 3102-9.
- REIMMANN, C., BEYELER, M., LATIFI, A., WINTELER, H., FOGLINO, M., LAZDUNSKI, A. et HAAS, D. (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. Mol. Microbiol., **24**, 309-319.
- REKKER, R.F. (1977). The hydrophobic fragmental constant. W.T. Nauta et R.F. Rekker. Amsterdam, Elsevier.
- RENNER, R. (1998). Growing acceptance of soil contaminant bioavailability kicks off national meeting. Environ. Sci. Technol., **32**, 528A-529A.
- REZESSY-SZABO, J.M., HUIJBERTS, G.N.M. et DE BONT, J.A.M. (1987). Potential of organic solvents in cultivating micro-organisms on toxic water-insoluble compounds. Biocatalysis in organic media. C. Laane, J. Tramper et M.D. Lilly. Amsterdam, Elsevier Science: 295-302.
- RIVERA, M. et MCGROARTY, E.J. (1989). Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., **171**, 2244-2248.
- ROBINSON, K.G., GHOSH, M.M. et SHI, Z. (1996). Mineralization enhancement of non-aqueous phase and soil-bound PCB using biosurfactant. Wat. Sci. Tech., **7-8**, 303-309.
- ROCKNE, K.J. et STRAND, S.E. (1998). Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. Environ. Sci. Technol., **32**, 3962-3967.

- RÖMLING, U., SIERRALTA, W.D., ERIKSSON, K. et NORMARK, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. Mol. Microbiol., 28, 249-264.
- ROSENBERG, E. (1989). Biofilms on water-insoluble substrates. Structure and function of biofilms. W.G. Characklis et P.A. Wilderer. New York, John Wiley & Sons. Ltd: 59-71.
- ROSENBERG, E. (1993). Exploiting microbial growth on hydrocarbons-new markets. TIBTECH, 11, 419-424.
- ROSENBERG, E. et RON, E.Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 154-162.
- ROSENBERG, M. (1991). Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon:water interface. Crit. Rev. Microbiol., 18, 159-173.
- ROSENBERG, M., GUTNICK, D. et ROSENBERG, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol. Lett., 9, 29-33.
- ROSENBERG, M. et ROSENBERG, E. (1981). Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. J. Bacteriol., 148, 51-57.
- ROUSE, J.D., SABATINI, D.A., SUFLITA, J.M. et HARWELL, J.H. (1994). Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 24, 325-370.
- SAITO, A., IWABUCHI, T. et HARAYAMA, S. (1999). Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. Chemosphere, 38, 1331-7.
- SAITO, A., IWABUCHI, T. et HARAYAMA, S. (2000). A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. Strain KP7: expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 182, 2134-41.
- SAMANTA, S.K. et JAIN, R.K. (2000). Evidence for plasmid-mediated chemotaxis of *Pseudomonas putida* towards naphthalene and salicylate. Can J Microbiol., 46, 1-6.

- SAMBROOK, J. et RUSSELL, D.W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANSEVERINO, J., APPLGATE, B.M., KING, J.M.H. et SAYLER, G.S. (1993). Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. Appl. Environ. Microbiol., 59, 1931-1937.
- SAWYER, L.K. et HERMANOWICZ, S.W. (2000). Detachment of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa* due to variations in nutrient supply. Wat. Sci. Tech., 41, 139-145.
- SCHAEFFER, T.L., CANTWELL, S.G., BROWN, J.L., WATT, D.S. et FALL, R.R. (1979). Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. Appl Environ Microbiol. 38, 742-746.
- SCHEIBENBOGEN, K., ZYTNER, R.G., LEE, H. et TREVORS, J.T. (1994). Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. J. Chem. Tech. Biotechnol., 59, 53-59.
- SCHMID, A., KOLLMER, A. et WITHOLT, B. (1998). Effect of biosurfactant and emulsification on two-liquid phase *Pseudomonas oleovorans* cultures and free-cell emulsions containing n-decane. Enzyme Microb. Technol., 22, 487-493.
- SCHNEIDER, J., GROSSER, R., JAYASIMHULU, K., XUE, W. et WARSHAWSKY, D. (1996). Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. Appl. Environ. Microbiol., 62, 13-19.
- SCHURR, M.J., YU, H., MARTINEZ-SALAZAR, J.M., BOUCHER, J.C. et DERETIC, V. (1996). Control of AlgU, a member of the sigmaE-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. J. Bacteriol., 178, 4997-5004.

- SCHWARTZ, R.D. et MCCOY, C.J. (1977). Epoxidation of 1,7-octadiene by *Pseudomonas oleovorans*: fermentation in the presence of cyclohexane. Appl. Environ. Microbiol., **34**, 47-49.
- SEED, P.C., PASSADOR, L. et IGLEWSKI, B.H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. J. Bacteriol., **177**, 654-659.
- SEKELSKY, A.M. et SHREVE, G.S. (1999). Kinetic model of biosurfactant-enhanced hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechnol. Bioeng., **63**, 401-409.
- SEMMLER, A.B.T., WHITCHURCH, C.B. et MATTICK, J.S. (1999). A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, **145**, 2863-2873.
- SHAFEEQ, M., KOKUB, D., KHALID, Z.M., KHAN, A.M. et MALIK, K.A. (1989). Degradation of different hydrocarbons and production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from coastal waters. MIRCEN J., **5**, 505-510.
- SHAPIRO, J.A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu. Rev. Microbiol., **52**, 81-104.
- SHEENAN, J.L. (1984). Hydrocarbons as substrates in industrial fermentation. Petroleum Microbiology. R.M. Atlas. New York. N. Y., Macmillan Publishing Company: 643-683.
- SHREVE, G.S., INGUVA, S. et GUNNAM, S. (1995). Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Marine Biol. Biotechnol., **4**, 331-337.
- SHUTTLEWORTH, K.L. et CERNIGLIA, C.E. (1995). Environmental aspects of PAH biodegradation. Appl. Biochem. Biotech., **54**, 291-302.
- SIEGMUND, I. et WAGNER, F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. Biotechnol. Tech., **5**, 265-268.
- SIKKEMAN, J., DE BONT, J.A.M. et POOLMAN, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev., **59**, 201-222.

- SINGER, M.E. et FINNERTY, W.R. (1984). Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. Petroleum Microbiology. R.M. Atlas. New York, NY. Macmillan Publishing Company: 1-59.
- SINGH, P.K., SCHAEFER, A.L., PARSEK, M.R., MONINGER, T.O., WELSH, M.J. et GREENBERG, E.P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature, **407**, 762-4.
- SINGLETON, I. (1994). Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. J. Chem. Tech. Biotechnol., **59**, 9-23.
- SMITH, A.W. et IGLEWSKI, B.H. (1989). Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. Nuc. Acids Res., **17**, 10509.
- SNELLINGS, N.J., TALL, B.D. et VENKATESAN, M.M. (1997). Characterization of *Shigella* type 1 fimbriae: expression, FimA sequence, and phase variation. Infect. Immun., **65**, 2462-2467.
- SOLOMON, J.M., LAZAZZERA, B.A. et GROSSMAN, A.D. (1996). Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. Genes Dev., **10**, 2014-2024.
- SOMERVILLE, M., TAYLOR, G., WATSON, D., RENDELL, N.B., RUTMAN, A., TODD, H., DAVIES, J.R., WILSON, R., COLE, P. et RICHARDSON, P.S. (1992). Release of mucus glycoconjugates by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid into feline trachea in vivo and human bronchus in vitro. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., **6**, 116-122.
- SPAIN, J.C. et VAN VELD, P.A. (1983). Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. Appl Environ Microbiol., **45**, 428-435.
- STANLAKE, G.J. et FINN, R.K. (1982). Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium. Appl Environ Microbiol., **44**, 1421-1427.
- STELMACK, P.L., GRAY, M.R. et PICKARD, M.A. (1999). Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. Appl. Environ. Microbiol., **65**, 163-168.

- STENSTRÖM, T.A. (1989). Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 142-147.
- STEVENS, C. (1998). Environmental degradation pathways for the breakdown of polydimethylsiloxanes. J. Inorg. Biochem., **69**, 203-207.
- STICKLER, D. (1999). Biofilms. Curr. Opin. Microbiol., **2**, 270-275.
- STRINGFELLOW, W.T. et AITKEN, M.D. (1994). Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar pseudomonads isolated from a creosote-contaminated soil. Can. J. Microbiol., **40**, 432-438.
- STUCKI, G. et ALEXANDER, M. (1987). Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 292-297.
- SUH, S.-J., SILO-SUH, L., WOODS, D.E., HASSETT, D.J., WEST, S.E.H. et OHMAN, D.E. (1999). Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., **181**, 3890-3897.
- SWANSON, J., KRAUS, S.J. et GOTSCHLICH, E.C. (1971). Studies on gonococcus infection. I. Pili and zones of adhesion: their relation to gonococcal growth patterns. J. Exp. Med., **134**, 886-906.
- SYLDATK, C., LANG, S., WAGNER, F., WRAY, V. et WITTE, L. (1985). Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on *n*-alkanes. Z. Naturforsch., **40c**, 51-60.
- TAGUCHI, K., FUKUTOMI, H., KURODA, A., KATO, J. et OHTAKE, H. (1997). Genetic identification of chemotactic transducers for amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, **143**, 3223-3229.
- TAKIZAWA, N., KAIDA, N., TORIGOE, S., MORITANI, T., SAWADA, T., SATOH, S. et KIYOHARA, H. (1994). Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol., **176**, 2444-2449.

- TANG, W.-C., WHITE, J.C. et ALEXANDER, M. (1998). Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. Appl. Microbiol. Biotechnol., 49, 117-121.
- TANI, A., ISHIGE, T., SAKAI, Y. et KATO, N. (2001). Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. J. Bacteriol., 183, 1819-23.
- THOMAS, J.M., YORDY, J.R., AMADOR, J.A. et ALEXANDER, M. (1986). Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. Appl. Environ. Microbiol., 52, 290-296.
- TIEHM, A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. Appl. Environ. Microbiol., 60, 258-263.
- TIEHM, A., STIEBER, M., WERNER, P. et FRIMMEL, F.H. (1997). Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. Environ. Sci. Technol., 31, 2570-2576.
- TIMM, A. et STEINBÜCHEL (1990). Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent Pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol., 56, 3360-3367.
- TIMM, A. et STEINBÜCHEL, A. (1992). Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Eur. J. Biochem., 209, 15-30.
- TOGUCHI, A., SIANO, M., BURKART, M. et HARSHEY, R.M. (2000). Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. J. Bacteriol., 182, 6308-6321.
- TOLKER-NIELSEN, T., BRINCH, U.C., RAGAS, P.C., ANDERSEN, J.B., JACOBSEN, C.S. et MOLIN, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. J. Bacteriol., 182, 6482-6489.
- TONGPIM, S. et PICKARD, M.A. (1996). Growth of *Rhodococcus* S1 on anthracene. Can J Microbiol., 42, 289-94.

- TOTTEN, P.A., LARA, J.C. et LORY, S. (1990). The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. J. Bacteriol., 172, 389-396.
- TSAI, J.T., WAHBI, L.P., DERVAKOS, G.A. et STEPHENS, G.M. (1996). Production of toluene cis-glycol by a recombinant *Escherichia coli* strain in a two-liquid phase culture system. Biotechnol. Lett., 18, 241-244.
- TSOMIDES, H.J., HUGHES, J.B., THOMAS, J.M. et WARD, C.H. (1995). Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments. Environ. Toxicol. Chem., 14, 953-959.
- VAN BEILEN, J.B., WUBBOLTS, M.G. et WITHOLT, B. (1994). Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. Biodegradation, 5, 161-74.
- VAN DELDEN, C. et IGLEWSKI, B.H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerg. Infect. Dis., 4, 551-560.
- VAN DER MEER, A.B., BEENACKERS, A.A.C.M., BURGHARD, R., MULDER, N.H. et FOK, J.J. (1992a). Gas/liquid mass transfer in a four-phase fermentor: effects of organic phase hold-up and surfactant concentration. Chem. Engng. Sci., 47, 2369-2374.
- VAN DER MEER, J.R., DE VOS, W.M., HARAYAMA, S. et ZEHNDER, A.J.B. (1992b). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol. Rev., 56, 677-694.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LYKLEMA, J., NORDE, W., SCHRAA, G. et ZEHNDER, A.J.B. (1987a). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1898-1901.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LYKLEMA, J., NORDE, W., SCHRAA, G. et ZEHNDER, A.J.B. (1987b). The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1893-1897.
- VAN SONSBECK, H.M., BEEFTINK, H.H. et TRAMPER, J. (1993). Two-liquid-phase bioreactors. Enzyme Microb. Technol., 15, 722-729.

- VANHAECKE, E., REMON, J.-P., MOORS, M., RAES, F., DE RUDDER, D. et VAN PETEGHEM, A. (1990). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. Appl. Environ. Microbiol., 56, 788-795.
- VANNECK, P., BEECKMAN, M., DE SAEYER, N., D'HAENE, S. et VERSTRAETE, W. (1995). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid-phase system. Bioremediation of recalcitrant organics. R.E. Hinchee, D.B. Anderson et R.E. Hoepfel. Battelle Press. 7: 55-62.
- VELANKAR, S.K., BARNETT, S.M., HOUSTON, C.W. et THOMPSON, A.R. (1975). Microbial growth on hydrocarbons-Some experimental results. Biotechnol. Bioeng., 17, 241-251.
- VELRAEDS, M.M.C., VAN DER MEI, H.C., REID, G. et BUSSCHER, H.J. (1996). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. Appl. Environ. Microbiol., 62, 1958-1963.
- VENKATA RAMANA, K. et KARANTH, N.G. (1989). Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J. Chem. Tech. Biotechnol., 45, 249-257.
- VERMUE, M., SIKKEMA, J., VERHEUL, A., BAKKER, R. et TRAMPER, J. (1993). Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp. Biotechnol. Bioeng., 42, 747-758.
- VIGON, B.W. et RUBIN, A.J. (1989). Practical considerations in the surfactant-aided mobilization of contaminants in aquifers. J. Water Pollut. Control Fed., 61, 1233-1240.
- VILLEMUR, R., DÉZIEL, E., BENACHENHOU, A., MARCOUX, J., GAUTHIER, É., LÉPINE, F., BEAUDET, R. et COMEAU, Y. (2000). Two-liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Biotechnol. Prog., 16, 966-972.

- VIPULANANDAN, C. et REN, X. (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. J. Environ. Eng., 126, 629-634.
- VOLKERING, F., BREURE, A.M., STERKENBURG, A. et VAN ANDEL, J.G. (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 548-552.
- VOLKERING, F., BREURE, A.M. et VAN ANDEL, J.G. (1993). Effect of microorganisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 535-540.
- VOLKERING, F., BREURE, A.M., VAN ANDEL, J.G. et RULKENS, W.H. (1995). Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol., 61, 1699-1705.
- VOMBERG, A. et KLINNER, U. (2000). Distribution of *alkB* genes within *n*-alkane-degrading bacteria. J Appl Microbiol., 89, 339-48.
- WALL, D. et KAISER, D. (1999). Type IV pili and cell motility. Mol. Microbiol., 32, 1-10.
- WALTER, U., BEYER, M., KLEIN, J. et REHM, H.-J. (1991). Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 671-676.
- WANG, D.I.C. et OCHOA, A. (1972). Measurements on the interfacial areas of hydrocarbon in yeast fermentations and relationship to specific growth rates. Biotechnol. Bioeng., 14, 345-360.
- WATNICK, P. et KOLTER, R. (2000). Biofilm, city of microbes. J. Bacteriol., 182, 2675-2679.
- WEBER, F.J., OOIKAAS, L.P., SCHEMEN, R.M.W., HARTMANS, S. et DE BONT, J.A.M. (1993). Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. Appl. Environ. Microbiol., 59, 3502-3504.
- WEISSENFELS, W.D., BEYER, M. et KLEIN, J.R. (1990). Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 479-484.

- WEISSENFELS, W.D., KLEWER, H.-J.R. et LANGHOFF, J. (1992). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol., **36**, 689-696.
- WEST, C.C. et HARWELL, J.H. (1992). Surfactants and subsurface remediation. Environ. Sci. Technol., **26**, 2324-2330.
- WESTGATE, S., BELL, G. et HALLING, P.J. (1995). Kinetics of uptake of organic liquid substrates by microbial cells: a method to distinguish interfacial contact and mass-transfer mechanisms. Biotechnol. Lett., **17**, 1013-1018.
- WHITCHURCH, C.B., HOBBS, M., LIVINGSTON, S.P., KRISHNAPILLAI, V. et MATTICK, J.S. (1991). Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. Gene, **101**, 33-44.
- WHITCHURCH, C.B. et MATTICK, J.S. (1994). Characterization of a gene, *pilU*, required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol., **13**, 1079-91.
- WHITE, J.C. et ALEXANDER, M. (1996). Reduced biodegradability of desorption-resistant fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and aquifer solids. Environ. Toxicol. Chem., **15**, 1973-1978.
- WHITE, K.L. (1986). An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ. Carcinogen. Rev., **C4**, 163-202.
- WHITELEY, M., LEE, K.M. et GREENBERG, E.P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 13904-18909.
- WHITMAN, B.E., LUEKING, D.R. et MIHELICIC, J.R. (1998). Naphthalene uptake by a *Pseudomonas fluorescens* isolate. Can. J. Microbiol., **44**, 1086-1093.
- WHYTE, L.G., BOURBONNIÈRE, L. et GREER, C.W. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathways. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 3719-3723.

- WHYTE, L.G., GREER, C.W. et INNIS, W.E. (1996). Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. Can. J. Microbiol., 42, 99-106.
- WHYTE, L.G., HAWARI, J., ZHOU, E., BOURBONNIERE, L., INNIS, W.E. et GREER, C.W. (1998). Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. Appl Environ Microbiol, 64, 2578-84.
- WHYTE, L.G., SLAGMAN, S.J., PIETRANTONIO, F., BOURBONNIERE, L., KOVAL, S.F., LAWRENCE, J.R., INNIS, W.E. et GREER, C.W. (1999). Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15. Appl Environ Microbiol, 65, 2961-8.
- WILLIAMS, A.C., WOODLEY, J.M., ELLIS, P.A., NARENDRANATHAN, T.J. et LILLY, M.D. (1990). A comparison of pig liver esterase and *Bacillus subtilis* as catalysts for the hydrolysis of menthyl acetate in stirred two-liquid phase reactors. Enzyme Microb. Technol., 12, 260-265.
- WILSON, N.G. et BRADLEY, G. (1996). The effect of immobilization on rhamnolipid production by *Pseudomonas fluorescens*. J. Appl. Bacteriol., 81, 525-530.
- WILSON, S.C. et JONES, K.C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environ. Pollut., 81, 229-249.
- WODZINSKI, R.S. et COYLE, J.E. (1974). Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. Appl. Microbiol., 27, 1081-1084.
- WODZINSKI, R.S. et LAROCCA, D. (1977). Bacterial growth kinetics on diphenylmethane and naphthalene-heptamethylnonane mixtures. Appl. Environ. Microbiol., 33, 660-665.
- WOODLEY, J.M., BRAZIER, A.J. et LILLY, M.D. (1991). Lewis cell studies to determine reactor design data for two-liquid-phase bacterial and enzymatic reactions. Biotechnol. Bioeng., 37, 133-140.

- WU, S.S. et KAISER, D. (1995). Genetic and functional evidence that Type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. Mol Microbiol, 18, 547-58.
- WUBBOLTS, M.G., FAVRE-BULLE, O. et WITHOLT, B. (1996). Biosynthesis of synthons in two-liquid-phase media. Biotechnol. Bioeng., 52, 301-308.
- YANG, Y., CHEN, R.F. et SHIARIS, M.P. (1994). Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. J. Bacteriol., 176, 2158-2164.
- YE, D., SIDDIQI, A., MACCUBIN, A.E., KUMAR, S. et SIKKA, H.C. (1996). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. Environ. Sci. Technol., 30, 136-142.
- YEN, K.-M. et SERDAR, C.M. (1988). Genetics of naphthalene catabolism in Pseudomonads. CRC Crit. Rev. Microbiol., 15, 247-268.
- YILDIZ, F.H. et SCHOOLNIK, G.K. (1999). Vibrio cholerae O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 4028-33.
- YOSHIDA, F. et YAMANE, T. (1971). Hydrocarbon uptake - a supplementary study. Biotechnol. Bioeng., 13, 691-695.
- ZAJIC, J.E. et SEFFENS, W. (1984). Biosurfactants. CRC Crit. Rev. Biotechnol., 1, 87-107.
- ZEHNDER, A.J. et SVENSSON, B.H. (1986). Life without oxygen: what can and what cannot? Experientia, 42, 1197-1205.
- ZHANG, X. et YOUNG, L.Y. (1997). Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. Appl. Environ. Microbiol., 63, 4759-4764.
- ZHANG, Y., MAIER, W.J. et MILLER, R.M. (1997). Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. Environ. Sci. Technol., 31, 2211-2217.

- ZHANG, Y. et MILLER, R.M. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl. Environ. Microbiol., 58, 3276-3282.
- ZHANG, Y. et MILLER, R.M. (1994). Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. Appl. Environ. Microbiol., 60, 2101-2106.
- ZHANG, Y. et MILLER, R.M. (1995). Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation on *n*-alkanes. Appl. Environ. Microbiol., 61, 2247-2251.
- ZIEBUHR, W., KRIMMER, V., RACHID, S., LOSSNER, I., GOTZ, F. et HACKER, J. (1999). A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. Mol Microbiol., 32, 345-56.

ANNEXE I. AUTRES ARTICLES PUBLIÉS OU SOUMIS POUR PUBLICATION

TRAVAUX EN COLLABORATION SUR LES BIORÉACTEURS À DEUX PHASES LIQUIDES

Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons' degradation in a two-liquid-phase bioreactor.

Marcoux, J., Déziel, E., Villemur, R., Lépine, F., Bisailon, J.G. et Beaudet, R. (2000). J. Appl. Microbiol., **88**, 655-62.

Abstract

A microbial consortium degrading the high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons (HMW PAHs) pyrene, chrysene, benzo[a]pyrene and perylene in a two-liquid-phase reactor was studied. The highest PAH-degrading activity was observed with silicone oil as the water-immiscible phase. 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane, paraffin oil, hexadecane and corn oil were much less or not efficient in improving PAH degradation by the consortium. Addition of surfactants (Triton X-100, Witconol SN70, Brij 35 and rhamnolipids) or Inipol EAP22 did not promote PAH biodegradation. Rhamnolipids had an inhibitory effect. Addition of salicylate, benzoate, 1-hydroxy-2-naphtic acid or catechol did not increase the PAH-degrading activity of the consortium, but the addition of low-molecular-weight (LMW) PAHs such as naphthalene and phenanthrene did. In these conditions, the degradation rates were 27 mg L⁻¹ d⁻¹ for pyrene, 8.9 mg L⁻¹ d⁻¹ for chrysene, 1.8 mg L⁻¹ d⁻¹ for benzo[a]pyrene and 0.37 mg L⁻¹ d⁻¹ for perylene. Microorganisms from the interface were slightly more effective in degrading PAHs than those from the aqueous phase.

Two-liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil.

Villemur, R., Déziel, E., Benachenhou, A., Marcoux, J., Gauthier, É., Lépine, F., Beaudet, R. et Comeau, Y. (2000). *Biotechnol. Prog.*, **16**, 966-972.

Abstract

High-molecular-weight (HMW) polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are pollutants that persist in the environment due to their low solubility in water and their sequestration by soil and sediments. The addition of a water-immiscible, nonbiodegradable, and biocompatible liquid, silicone oil, to a soil slurry was studied to promote the desorption of PAHs from soil and to increase their bioavailability. First, the transfer into silicone oil of phenanthrene, pyrene, chrysene, and benzo[*a*]pyrene added to a sterilized soil (sandy soil with 0.65% total volatile solids) was measured for 4 days in three two-liquid-phase (TLP) slurry systems each containing 30% (w/v) soil but different volumes of silicone oil (2.5%, 7.5%, and 15% [v/v]). Except for chrysene, a high percentage of these PAHs was transferred from soil to silicone oil in the TLP slurry system containing 15% silicone oil. Rapid PAH transfer occurred during the first 8 h, probably resulting from the extraction of nonsolubilized and of poorly sorbed PAHs. This was followed by a period in which a slower but constant transfer occurred, suggesting extraction of more tightly bound PAHs. Second, a HMW PAH-degrading consortium was enriched in a TLP slurry system with a microbial population isolated from a creosote-contaminated soil. This consortium was then added to three other TLP slurry systems each containing 30% (w/v) sterilized soil that had been artificially contaminated with pyrene, chrysene, and benzo[*a*]pyrene, but different volumes of silicone oil (10%, 20%, and 30% [v/v]). The resulting TLP slurry bioreactors were much more efficient than the control slurry bioreactor containing the same contaminated soil but no oil phase. In the TLP slurry bioreactor containing 30% silicone oil, the rate of pyrene degradation was $19 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and no pyrene was detected after 4 days. The degradation rates of chrysene and benzo[*a*]pyrene in the 30% TLP slurry bioreactor were, respectively, 3.5 and $0.94 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$. Low degradation of

pyrene and no significant degradation of chrysene and benzo[*a*]pyrene occurred in the slurry bioreactor. This is the first report in which a TLP system was combined with a slurry.

TRAVAUX EN COLLABORATION SUR L'ANALYSE DES BIOSURFACTANTS
PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene.

Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A. et Villemur, R. (1999). Biochim. Biophys. Acta, 1440, 244-252.

Abstract

Liquid chromatography/mass spectrometry using electrospray ionisation was used to analyse rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* strain with mannitol or naphthalene as carbon source. Identification and quantification of 28 different rhamnolipid congeners was accomplished using a reverse-phase C₁₈ column and a 30 min chromatographic run. Isomeric rhamnolipids that were not chromatographically resolved could be identified by interpretation of their mass spectra and their relative proportions estimated. The most abundant rhamnolipid produced on mannitol contained two rhamnoses and two 3-hydroxydecanoic acid groups. The most abundant rhamnolipid produced from naphthalene contained two rhamnoses and one 3-hydroxydecanoic acid group.

Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S. et Villemur, R. (2000). Biochim. Biophys. Acta, **1485**, 145-152.

Abstract

We developed a rapid and simple procedure permitting to characterise and quantify rhamnolipids in liquid cultures. The various rhamnolipids produced by growing cultures of *Pseudomonas aeruginosa* were measured using liquid chromatography/mass spectrometry. The culture supernatant was injected directly, without prior purification, in a HPLC equipped with C₁₈ reverse-phase column. This method has allowed us to precisely monitor the complete profile of rhamnolipid congeners produced by a *Pseudomonas aeruginosa* strain during a two weeks cultivation period. In order to shorten the analysis time, another method was developed which did not require chromatographic separation of the rhamnolipids prior to their detection. Total quantification of rhamnolipids using the direct infusion method gave results in good agreement with those obtained with prior chromatographic separation. These two methods were very well correlated with the standard colorimetric orcinol method. The data indicated that the various rhamnolipid congeners are secreted at the same time, and that their relative proportions remain unchanged during growth.

LC/MS detection of the 3-(3-hydroxy-alkanoyloxy)-alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures

Lépine, F., Déziel, E., Milot, S. et Villemur, R. (2001). J. Mass Spectr., Soumis pour publication.

Summary

A series of pseudomolecular and fragment ions attributed to 3-(3-hydroxy-alkanoyloxy)-alkanoic acids (HAAs) were detected by liquid chromatography/mass spectrometry among the rhamnolipids observed in a *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP supernatant. The fragmentation mechanism leading to the formation of the fragment ions was determined by a deuterium exchange experiment and by using a standard HAA mixture obtained from the mild acidic hydrolysis of rhamnolipids of known composition. The structure and the response factor of these free HAAs were determined. The HAAs relative composition differs between free HAAs and those present in rhamnolipids, the former being enriched in lower molecular weight congeners and depleted in the heavier ones. Within an isomeric pair, the isomer with the shortest 3-hydroxyalkaloyl residue at the hydroxyl end was more abundant than the one with the heavier 3-hydroxyalkaloyl acid at this position, and the ratios of their relative abundances were similar for free HAAs and those in rhamnolipids. Experiments with deuterium labelled rhamnolipids demonstrated that free HAAs are part of a pool used for rhamnolipid biosynthesis and are not rhamnolipid degradation products.

ANNEXE II. SOMMAIRE DU MÉMOIRE DE MAÎTRISE

ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS PAR DES SOUCHES BACTÉRIENNES MÉTABOLISANT LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

Mémoire de maîtrise en microbiologie appliquée présenté par Éric Déziel à l'Institut Armand-Frappier, Université du Québec (mai 1996).

SOMMAIRE

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants organiques largement distribués dans l'environnement. Ils représentent un risque élevé pour la santé et il est donc nécessaire de restaurer les nombreux sites contaminés. Les technologies de traitements biologiques utilisant le potentiel des micro-organismes à dégrader une grande variété de substances organiques présentent plusieurs avantages sur les technologies physico-chimiques traditionnelles. Cependant, la restauration d'un site contaminé par des HAP est limitée par la faible biodisponibilité de ces polluants hydrophobes et non-polaires. L'addition de surfactants permettrait d'augmenter la solubilisation, la mobilisation et possiblement la biodégradation des polluants. Cependant, les surfactants synthétiques possèdent plusieurs désavantages qui rendent leur utilisation problématique. Les surfactants produits par des micro-organismes pourraient alors constituer une alternative nouvelle et intéressante.

Le but de ce projet consistait à isoler des micro-organismes dégradant des HAP et à déterminer s'ils pouvaient produire des biosurfactants en utilisant des HAP comme substrat. Pour ce faire, des bactéries isolées de sols contaminés par des hydrocarbures ont premièrement été criblées pour leur capacité à former des zones d'éclaircissement sur des géloses recouvertes d'un mince film de HAP pulvérisés. Des 84 souches bactériennes obtenues de la Sablière Thouin, un site ayant reçu des quantités importantes de résidus

pétroliers au cours des années '60, 34 dégradaient ou transformaient au moins un HAP. L'étude du profil catabolique de ces souches nous a permis de déterminer que 23 d'entre elles, identifiées comme des *Pseudomonas* fluorescents, pouvaient croître avec un HAP de deux ou trois cycles aromatiques comme seul substrat. Elles pouvaient également transformer l'indole en indigo, une indication de la présence d'une activité de la naphthalène dioxygénase. L'addition de salicylate n'induisait la biodégradation des HAP que chez les souches de *P. aeruginosa*. Aucune des bactéries isolées de la Sablière Thouin n'ont pu dégrader les HAP comportant plus de trois anneaux aromatiques. Afin d'isoler des micro-organismes pouvant dégrader des HAP de plus haut poids moléculaire, des bactéries provenant d'un sol prélevé à la base de poteaux de bois traités à la créosote ont été criblées selon la méthode par pulvérisation. Des isolats bactériens obtenus, deux souches identifiées comme des *Sphingomonas* sp. ont démontré la capacité de dégrader le fluoranthène, le pyrène et le benz[a]anthracène, des HAP de quatre cycles aromatiques. Ces deux *Sphingomonas* cultivées avec le dextrose ou une mixture de HAP produisaient un bioémulsifiant, mais pas de biosurfactant.

Parmi les 23 souches de Thouin capables de croître sur les HAP, les neuf *P. aeruginosa* et un *P. putida* pouvaient produire des biosurfactants en utilisant des substrats solubles comme le dextrose et le mannitol, ou un HAP comme le naphthalène. Nos observations suggèrent qu'il s'agisse de rhamnolipides, le biosurfactant anionique habituellement sécrété par *P. aeruginosa*. Un milieu de culture pauvre en fer favorisait la production de biosurfactants. Nous avons observé qu'une activité émulsifiante, possiblement indépendante des rhamnolipides, se manifestait lors des cultures effectuées pour la production de biosurfactants. L'étude détaillée de la croissance et de la production de biosurfactants à partir du naphthalène a également permis de constater que l'hydrophobicité de la paroi cellulaire variait dans le temps.

Des micro-organismes croissant sur les hydrocarbures aliphatiques sécrètent des biosurfactants et des bioémulsifiants, ce qui facilite l'utilisation des substrats

hydrophobes. Cependant, l'isolement de bactéries produisant des biosurfactants lors de la croissance sur des HAP représente un aspect nouveau par rapport aux travaux déjà publiés. Une meilleure compréhension des mécanismes microbiens responsables de la dégradation des HAP étant essentielle à l'amélioration des bio-traitements, les résultats obtenus contribuent à faire avancer les connaissances dans le domaine.