Université du Québec
INRS-Eau

ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET DES INTERACTIONS MICROBIENNES LORS D'UN PROCÉDÉ DE SOLUBILISATION BIOLOGIQUE DES MÉTAUX CONTAMINANT LES BOUES D'ÉPURATION

Par
Diane Fournier
M.Sc. Microbiologie et Immunologie

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctorat (Ph.D.)
en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examinateur externe	Richard Villemur Centre de Recherche en Microbiologie Appliquée Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	André Darveau Département de Biochimie Université Laval
Codirecteur de recherche	Réal Lemieux Département de Recherche Société canadienne de la Croix-Rouge
Examinateur interne	Louis Bernatchez Département de Biologie Université Laval, professeur invité, INRS-Eau
Examinateur interne	Jean-François Blais INRS-Eau

Thèse soutenue le 6/10/97

©droits réservés de Diane Fournier, 1997

REMERCIEMENTS

J'aimerais en toute sincérité témoigner ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

En premier lieu, j'aimerais remercier mon défunt directeur de thèse, M. Denis Couillard, pour m'avoir encouragée et pour m'avoir donné beaucoup de latitude dans la réalisation de mon projet de doctorat. Comme nous en avions discuté ensemble, cette latitude fut souvent source de "vertige" pour la simple étudiante que j'étais, mais je crois qu'elle a fortement contribuée à ma formation de chercheur.

Ce travail m'a donné l'opportunité de tisser des liens avec plusieurs chercheurs compétents. Ainsi, je remercie vivement mon codirecteur Réal Lemieux, qui s'est montré tout au long de cette collaboration, un chercheur critique et très ouvert. Sans son accueil dans le laboratoire de recherche de la Croix-Rouge de Québec, ce travail aurait été impossible à réaliser. Dans la même foulée, j'aimerais remercier les Drs Renée Bazin et André Darveau (maintenant professeur à l'Université Laval), de même que les assistants de recherche du laboratoire, pour leurs précieux conseils et leur amitié. Je remercie particulièrement Réjean Lapointe, Gerry Boucher et Yanick Matteau pour l'aide qu'ils m'ont apportée et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

J'aimerais aussi remercier mes collègues et amis de l'INRS-Eau. L'esprit de camaraderie et les liens qui se sont développés- même à distance- ont largement contribué à rendre agréables ces années de doctorat. J'aimerais aussi remercier le professeur Peter Campbell pour le stage qu'il m'a permis de réaliser à l'Université de Bordeaux. Je tiens aussi à remercier le professeur Louis Bernatchez pour son aide et ses encouragements.

J'aimerais aussi remercier le professeur Jean Bousquet, Alice Roy et les autres membres de l'équipe de recherche du Centre de Recherche en Biologie Forestière de l'Université Laval pour leur aide dans la réalisation des analyses phylogénétiques. Leur accueil a rendu ce travail très agréable.

J'aimerais enfin remercier le programme de bourse Éco-Recherche du Plan Vert (action conjointe du CRSNG, CRM et CRSH) pour leur support financier.

Naturellement, je remercie chaleureusement mes chers parents, qui m'ont sans cesse encouragée tout au long de ces années. Même si ces quelques mots ne sauraient lui exprimer toute ma reconnaissance, j'aimerais enfin dire Merci à Jean-Philippe, pour ses judicieux conseils, son aide et ses encouragements.

RÉSUMÉ

La disposition des boues générées par le traitement des eaux usées est un problème incontournable. L'épandage permet de disposer efficacement des boues et représente une option intéressante, puisqu'elle fait appel à la valorisation de ce déchet. Cependant, la décontamination des boues qui ne respectent pas les normes environnementales est nécessaire. Dans cette optique, un procédé de solubilisation biologique des métaux a été développé. L'inoculation des boues avec *Thiobacillus ferrooxidans* induit une forte acidification du milieu (pH <2,5), de même que l'accroissement du potentiel d'oxydo-réduction, entraînant la solubilisation des métaux.

Les conditions d'exploitation du procédé sont bien caractérisées. Par contre, peu de choses sont connues à propos des mécanismes permettant à *T. ferrooxidans* de se développer dans un tel milieu, étant donné son intolérance notoire pour la matière organique. Ce travail a porté sur l'approfondissement des connaissances au niveau de l'écologie de *T. ferrooxidans* dans ce milieu fortement chargé, de même que la caractérisation de la flore microbienne persistant dans le procédé. Nous avons tout d'abord démontré la présence d'un mécanisme synergique entre les populations microbiennes et *T. ferrooxidans*. Cette synergie s'avère essentielle pour le fonctionnement du procédé, car *T. ferrooxidans* ne peut croître seul dans les boues. Comme d'autres populations semblaient être actives, nous avons voulu en évaluer la diversité. La culture nous a permis de mettre en évidence deux espèces de levures, une espèce de champignon mais aucune autre bactérie que *T. ferrooxidans*. Un autre objectif était d'analyser la diversité selon une approche moléculaire. Pour ce faire, des techniques de purification, d'amplification et d'analyse de l'ADNr 16S ont été mises au point.

Ces techniques nous ont permis de révéler une diversité bactérienne étonnante. En effet, l'analyse par DGGE a révélé plus de 20 fragments de gènes lors de la phase logarithmique du procédé. L'analyse phylogénétique d'une partie de ces fragments nous a permis de procéder à l'identification partielle des inconnus. Ceux-ci se sont affiliés à 6 groupes taxonomiques, représentés par des espèces qui pourraient être actives dans le procédé. Les résultats suggèrent la présence de bactéries retrouvées lors du traitement des eaux usées, des espèces impliquées au niveau de l'oxydation biologique du fer et des espèces potentiellement pathogènes. La connaissance de ces affiliations pourrait nous permettre de cultiver certaines espèces.

Dans l'ensemble, ces travaux nous ont permis de démontrer que la diversité génétique dans le procédé de biolixiviation est beaucoup plus importante que la diversité bactérienne cultivable. L'analyse de la diversité génétique devrait être une des premières étapes à entreprendre pour mieux comprendre le rôle que jouent les micro-organismes dans leur environnement.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS iii

RÉSUMÉ v

TABLE DES MATIÈRES vii

LISTE DES TABLEAUX xi

LISTE DES FIGURES xiii

DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS xv

CHAPITRE I: Introduction 1

1.1 REVUE DE LITTÉRATURE 1

1.1.1 Traitement des eaux usées et problématique de la disposition des boues d'épuration 1
1.1.2 Composition microbiologique des boues d'épuration 2
1.1.3 Composition chimique des boues 4
1.1.3.1 Matière organique et valeur fertilisante 4
1.1.3.2 Contaminants organiques 4
1.1.3.3 Métaux 5
1.1.4 Traitements des boues 6
1.1.4.1 Stabilisation et désinfection 6
1.1.4.2 Solubilisation des métaux 7
1.1.5 Caractéristiques des thiobacilles 9
1.1.5.1 Métabolisme et taxonomie 9
1.1.5.2 Écologie 11
1.1.5.3 Classification phylogénétique 13
1.1.5.4 Dénombrement de *T. ferrooxidans* 14
1.1.6 Écologie moléculaire 15
1.1.6.1 Liens évolutifs entre les micro-organismes 15
1.1.6.2 Outils moléculaires pour l'étude de la diversité microbienne 17

1.2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS 20

1.3 PUBLICATION DES RÉSULTATS 21

CHAPITRE II: Importance des interactions microbiennes dans le procédé de biolixiviation 23

2.1 INTRODUCTION 23

2.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES 24
2.2.1 Micro-organismes et milieux de culture 24
2.2.2 Isolement et identification de micro-organismes acidophiles 24
2.2.3 Rôle des micro-organismes hétérotrophes sur la croissance et l'activité de *T. ferrooxidans* 25
2.2.3.1 Formation de colonies sur milieux solides 25
2.2.3.2 Évaluation du taux de croissance 26
2.2.3.3 Performances du procédé de biolixiviation 26
2.2.4 Suivi de la croissance bactérienne et méthodes analytiques 27
2.3 RÉSULTATS 28
2.3.1 Enrichissement, isolement et identification de micro-organismes acidophiles à partir de sédiment 28
2.3.2 Effet des micro-organismes hétérotrophes sur la croissance de *T. ferrooxidans* 29
2.3.3 Effet des micro-organismes hétérotrophes sur l'oxydation du fer et l'acidification du milieu 32
2.3.4 Effet des micro-organismes hétérotrophes lors du procédé de biolixiviation dans les boues d'épuration 36
2.4 DISCUSSION 40

CHAPITRE III: Développement de techniques moléculaires pour l'analyse de la diversité bactérienne dans les boues d'épuration 45

3.1 INTRODUCTION 45

3.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES 49
3.2.1 Micro-organismes et milieux de culture 49
3.2.1.1 Espèces bactériennes 49
3.2.1.2 Espèces de levures 49
3.2.2 Extraction et purification d'ADN 49
3.2.2.1 Bactéries cultivées en milieu synthétique 49
3.2.2.2 Bactéries ajoutées aux boues d'épuration 50
3.2.2.3 Levures cultivées en milieu synthétique et ajoutées aux boues d'épuration 51
3.2.3 Amplification par PCR 51
3.2.3.1 Amplification universelle des bactéries 51
3.2.3.2 Vérification de l'efficacité de détection des espèces Gram positives dans les boues 53
3.2.3.3 Vérification de la limite de détection des bactéries dans les boues 53
3.2.3.4 Essais préliminaires pour la détection des levures 53
3.2.4 Optimisation du DGGE 54
3.2.5 Clonage et séquençage des produits de PCR 55
3.2.6 Analyse des séquences 57

3.3 RÉSULTATS 59
3.3.1 Mise au point des conditions de PCR 59
3.3.2 Extraction d'ADN dans les boues et amplification par PCR 60
3.3.2.1 Efficacité pour les espèces bactériennes Gram positives 60
3.3.2.2 Évaluation de la limite de détection des bactéries dans les boues 61
3.3.3 Adaptation du DGGE à l'étude de la diversité dans les boues 62
3.3.4 Analyse des séquences des produits de PCR 66
3.4 DISCUSSION 69

CHAPITRE IV: Étude de la diversité bactérienne lors du procédé de biolixiviation 75

4.1 INTRODUCTION 75

4.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES 78
4.2.1 Micro-organismes, milieux de culture et essais de biolixiviation 78
4.2.2 Étude de la diversité microbienne dans le procédé de biolixiviation 78
4.2.2.1 Isolement et culture des micro-organismes 78
4.2.2.2 Étude de la diversité génétique 78
4.2.2.2.1 Extraction, purification et amplification de l'ADNr 16S 79
4.2.2.2.2 Séparation et purification des fragments de PCR sur DGGE 79
4.2.2.2.3 Clonage et séquençage des fragments de PCR 80
4.2.2.3 Analyse des séquences et phylogénie 81
4.3 RÉSULTATS 83
4.3.1 Isolement et culture des micro-organismes 83
4.3.2 Diversité bactérienne et purification des fragments de PCR 83
4.3.3 Clonage et séquençage des fragments de gènes 85
4.3.4 Analyses phylogénétiques 87
4.3.4.1 Bactéries Gram positives 88
4.3.4.1.1 Bactéries Gram positives ayant une teneur élevée en G+C 89
4.3.4.1.2 Espèces Gram positives ayant une teneur faible en G+C 89
4.3.4.2 Division *Proteobacteria* 90
4.3.4.3 *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 93
4.3.5 Bilan de la diversité totale 94
4.4 DISCUSSION 96

CHAPITRE V: Conclusion 107

CHAPITRE VI: Bibliographie 111

ANNEXE A: Informations complémentaires au chapitre II 139

A.1 MÉTHODE DE DOSAGE DES IONS FERREUX.....139

A.2 ÉVALUATION DES TAUX DE CROISSANCE MAXIMUM (μ_{MAX}).....140

ANNEXE B: Informations complémentaires au chapitre III 143

B.1 DÉTECTION DES MOLÉCULES CHIMÉRIQUES.....143

ANNEXE C: Informations complémentaires au chapitre IV 147

C.1 ESPÈCES UTILISÉES LORS DES ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES 147

C.2 PRÉSENTATION DES ALIGNEMENTS 150

C.3 DÉTECTION DES MOLÉCULES CHIMÉRIQUES.....155

C.4 ESTIMATION STATISTIQUE DE LA DIVERSITÉ TOTALE 162

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Bactéries pathogènes et virus retrouvés dans les boues d'épuration..... 3

Tableau 1.2 Composés à valeur fertilisante dans les boues d'épuration..... 4

Tableau 1.3 Réduction des bactéries et oeufs de parasites lors du traitement des boues d'épuration..... 7

Tableau 1.4 Liste des thiobacilles acidophiles..... 10

Tableau 2.1 Expériences réalisées pour l'évaluation du rôle des micro-organismes hétérotrophes en co-culture avec *T. ferrooxidans*..... 27

Tableau 2.2 Tests d'assimilation de sucres et d'azote pour l'identification de la souche de levure isolée des sédiments lagunaires..... 29

Tableau 2.3 Effet des conditions de culture sur les paramètres de croissance de *T. ferrooxidans*..... 31

Tableau 2.4 Récapitulation du rôle de *R. rubra* sur l'évolution des paramètres de biolixiviation, lors de la culture de *T. ferrooxidans*..... 36

Tableau 3.1 Souches bactériennes utilisées pour la mise au point des techniques moléculaires..... 50

Tableau 3.2 Composition des solutions pour le DGGE..... 55

Tableau 3.3 Taux de similarité théorique pour les fragments de gène d'ARNr 16S de la région V3 des espèces ayant servi à la mise au point du DGGE..... 63

Tableau 3.4 Taux de similarité entre les séquences des fragments de gènes d'ARNr 16S amplifiés et les séquences publiées..... 66

Tableau 3.5 Taux de similarité entre les 40 premiers nucléotides du produit de PCR de Sed 2 et des Protéobactéries de la subdivision α..... 68

Tableau 4.1 Critères de sélection des espèces bactériennes utilisées comme groupe de référence pour les études phylogénétiques..... 81

Tableau 4.2 Nom des fragments et nombre de clones séquencés pour la caractérisation des bactéries provenant du procédé de biolixiviation..... 86

Tableau 4.3 Meilleurs taux de similarité observés entre les fragments inconnus et les bactéries Gram positives..... 90

Tableau 4.4 Meilleurs taux de similarité observés entre les fragments inconnus avec les Protéobactéries. 93

Tableau 4.5 Meilleurs taux de similarité observés entre les fragments inconnus et le groupe *Cytophaga-Bacteroides-Flexibacter*. 94

Tableau C.1 Liste des espèces Gram positives ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques. 147

Tableau C.2 Liste des Protéobactéries de la subdivision α ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques. 148

Tableau C.3 Liste des Protéobactéries de la subdivision β ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques. 148

Tableau C.4 Liste des Protéobactéries de la subdivision γ ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques. 148

Tableau C.5 Liste des Protéobactéries la subdivision δ ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques. 149

Tableau C.6 Liste des espèces du groupe *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques. 149

Tableau C.7 Liste des autres espèces ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques. 149

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Arbre phylogénétique des êtres vivants..... 17

Figure 1.2 Schéma général pour la caractérisation des populations microbiennes avec des techniques de biologie moléculaire..... 19

Figure 2.1 Évolution du pH lors d'enrichissements de micro-organismes acidophiles provenant de sédiments lagunaires..... 28

Figure 2.2 Effet des micro-organismes hétérotrophes sur l'efficacité de formation de colonies par *T. ferrooxidans*..... 30

Figure 2.3 Effet de la culture mixte de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra* dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu à 25°C sur la concentration de *T. ferrooxidans*..... 32

Figure 2.4a,b Évolution du pH et du fer ferreux lors de cultures pures de *T. ferrooxidans* en milieu synthétique avec et sans extrait de levure..... 33

Figure 2.5a,b Effet de la culture mixte de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra* dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu sur le pH et l'oxydation des ions ferreux..... 35

Figure 2.6 Effet de *T. ferrooxidans* cultivé dans les boues d'épuration sur le ratio Fe^{3+}/Fe_{total} 37

Figure 2.7a,b Effet de *T. ferrooxidans* cultivé dans les boues d'épuration à 20°C sur le pH et le potentiel d'oxydoréduction 38

Figure 3.1 Schéma représentant la portion de la région variable V3 du gène codant pour l'ARNr 16S de *E. coli*, ciblée pour l'amplification universelle des bactéries par PCR. 53

Figure 3.2 Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% de fragments de gène d'ARNr 16S amplifiés par PCR 59

Figure 3.3 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% de fragments de gène d'ARNr 16S provenant d'espèces Gram positives et Gram négatives ajoutées à des boues d'épuration stérilisées. 60

Figure 3.4 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification du fragment de gène de l'ARNr 16S obtenu à partir de boues ensemencées avec différentes concentrations de bactéries. 61

Figure 3.5 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification du fragment de gène de l'ARNr 18S obtenu à partir de boues ensemencées avec des levures..... 62

Figure 3.6 Séparation sur DGGE de fragments de gène d'ARNr 16S provenant d'espèces de *Thiobacillus* et d'*Acidiphilium*.....63

Figure 3.7a,b Séparation électrophorétique de fragments de gène d'ARNr 16S provenant d'espèces bactériennes ajoutées à des boues d'épuration stérilisées.....65

Figure 4.1 Stratégie globale utilisée pour l'analyse de la diversité génétique. 79

Figure 4.2 Séparation par DGGE des fragments de PCR amplifiés à partir d'ADN isolé du procédé de biolixiviation des boues d'épuration.....84

Figure 4.3 Séparation par DGGE des fragments de PCR amplifiés à partir d'ADN isolé durant le procédé de biolixiviation des boues d'épuration 85

Figure 4.4 Relations phylogénétiques entre les espèces Gram positives et les fragments obtenus à partir du procédé de biolixiviation.....88

Figure 4.5 Relations phylogénétiques entre les Protéobactéries et les fragments obtenus à partir du procédé de biolixiviation.....91

Figure 4.6 Relations phylogénétiques entre le groupe *Cytophaga-Bacteroides-Flexibacter* et les fragments obtenus à partir du procédé de biolixiviation 94

Figure A.1 Droite de calibration lors du dosage selon la méthode de l'*o*-phénanthroline.....139

Figure A.2a,b Calcul du taux de croissance maximal de *T. ferrooxidans* dans le milieux MS-Fe-Glu en culture pure et en culture mixte 140

Figure A.3a,b Calcul du taux de croissance maximal de *T. ferrooxidans* en culture pure dans les milieux MS-Fe et MS-Fe-Ye 142

Figure C.1 Alignement des séquences partielles de l'ADNr 16S provenant des bactéries Gram+ ayant servi aux calculs des distances et à la reconstruction d'arbres.....151

Figure C.2 Alignement des séquences partielles de l'ADNr 16S provenant autres espèces ayant servi aux calculs des distances et à la reconstruction d'arbres.....154

Figure C.3 Distribution de probabilités pour le nombre d'espèces totales dans le procédé de biolixiviation.....162

DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS[1]

16S: sous-unité de l'ARN ribosomal dont le coefficient de sédimentation est d'environ 16 Svedberg. Terme général pour désigner la petite sous-unité des ribosomes bactériens.

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNr 16S: gène codant pour l'ARN ribosomal 16S.

ARN: acide ribonucléique

Autotrophe: organisme qui utilise la matière inorganique comme source de nutriments, le CO_2 étant la seule source de carbone.

Biolixiviation: procédé de solubilisation biologique des métaux.

Boues activées: procédé aérobie de traitement des eaux usées, dans lequel une biomasse microbienne se développe pour métaboliser la matière organique dissoute.

Boues d'épuration: boues résultant de la décantation effectuée après le traitement des eaux usées.

Chémolithotrophe: organisme qui obtient son énergie de l'oxydation de composés inorganiques, et qui est capable d'élaborer ses propres substances organiques à partir de CO_2, d'eau et de sels minéraux.

Clonage: réplication *in vitro* d'un fragment d'ADN avec un vecteur pouvant se répliquer dans une cellule de manière autonome.

Compétente: se dit d'une bactérie ayant subi un traitement lui permettant d'incorporer de l'ADN exogène.

DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis- gel d'électrophorèse en présence d'un gradient de dénaturant. Technique d'électrophorèse en présence d'un gradient de dénaturant, qui permet de discriminer des fragments d'ADN double-brin de même taille en fonction de leur composition.

Électroporation: procédé créant, à l'aide de chocs électriques, des pores dans la membrane cytoplasmique permettant l'introduction d'ADN à l'intérieur de cellules.

Hétérotrophe: organisme qui catabolise de la matière organique comme source d'énergie et de carbone.

Insert: terme consacré dérivé de l'anglais désignant le fragment d'ADN exogène dans un vecteur recombiné.

---

[1] Les définitions des termes de biologie moléculaires furent adaptées à partir de Kaplan et Delpech 1993.

Ligation: union par une liaison 3'-5' phosphodiester de deux nucléotides adjacents déjà incorporés dans une chaîne polynucléotidique

Phylogénie: étude des liens évolutifs entre les être vivants.

Saprophyte: organisme se nourissant à partir de la matière en décomposition; micro-organisme qui vit sur un hôte, sans y provoquer de maladie (par opposition à pathogène).

SSCP: single strand conformation polymorphism- analyse des polymorphismes de conformation du DNA simple-brin. Technique d'électrophorèse en condition non dénaturante qui permet la séparation de l'ADN simple-brin en fonction de sa conformation spécifique.

Taxonomie: discipline portant sur la classification des être vivants; un taxon correspond à une unité systématique dans un système de classification.

Température de fusion (Tm): point d'inflexion de la courbe de fusion d'un segment d'ADN, correspondant à une dénaturation de la moitié de la séquence.

Transformation: technique consistant à faire pénétrer un fragment d'ADN dans une bactérie

Transition: mutation ponctuelle entraînant la substitution d'une base purique par une autre base purique (A vers G ou vice-versa), ou d'une base pyrimidique par une autre base pyrimidique (T vers C ou vice-versa).

Transversion: mutation ponctuelle entraînant la subtitution d'une base purique par une base pyrimidique, ou vice-versa.

Vecteur: séquence nucléotidique capable de s'auto-répliquer, utilisée pour la recombinaison *in vitro* de l'ADN et son amplification extra-chromosomique, comme par exemple lors du clonage (ex: plasmide).

CHAPITRE I: INTRODUCTION

1.1 Revue de littérature

1.1.1 Traitement des eaux usées et problématique de la disposition des boues d'épuration

Parmi les préoccupations sociales actuelles, la protection de l'environnement et l'assainissement des eaux occupent une place importante. Le traitement des eaux usées se pratique dans la plupart des pays industrialisés et actuellement, les pays en voie de développement et les pays de l'Europe de l'est emboîtent le pas, car la nécessité d'adopter une stratégie de développement durable s'impose avec la mondialisation des marchés. Plus près de nous, l'achèvement récent du volet urbain du Programme d'Assainissement des Eaux du Québec (PAEQ) appliqué depuis 1978, aura permis à plus de 90% des municipalités de rejeter des effluents acceptables pour le milieu aquatique récepteur. Les procédés de traitement biologique des eaux usées (boues activées, étangs aérés, réacteurs biologiques, etc.) sont basés sur le développement d'une biomasse microbienne responsable de la minéralisation de la matière organique dissoute. Cette biomasse doit avoir la capacité de s'agréger en particules assez denses pour décanter et ainsi mener à l'obtention d'une eau traitée contenant un minimum de solides en suspension. En contre-partie, les procédés biologiques génèrent d'importantes quantités de boues d'épuration. Le Canada produit environ un million de tonnes de boues (matière sèche) par année et on prévoit que la production américaine et européenne atteindra les 20 millions de tonnes par année d'ici l'an 2000 (Webber 1986; Scheltinga 1987).

La disposition finale des boues d'épuration est un problème qu'il faut aussi gérer avec le souci de protéger l'environnement. Mais comme les coûts de traitement et de disposition des boues peuvent atteindre 50% des coûts liés au traitement des eaux, le mode de disposition devra être le plus économique possible (Vesilind 1980). Les divers modes de disposition consistent en l'enfouissement, l'incinération, le rejet en mer et l'utilisation comme fertilisant agricole et sylvicole. Comme les boues peuvent contenir des composés toxiques et des agents pathogènes, ces modes de disposition ne sont pas tous exempts de risques pour l'environnement.

L'enfouissement des boues est une méthode de plus en plus coûteuse étant donné la restriction du nombre de sites et la nécessité de déshydrater les boues afin de minimiser les risques de contamination des eaux souterraines (Webber 1986). L'incinération est une pratique très efficace, mais elle est aussi coûteuse en ce qui a trait à la consommation d'énergie, au contrôle des émissions de matières polluantes et à la disposition des cendres contaminées (Davis 1987). Le rejet en mer est une pratique interdite depuis 1991 aux États-Unis, suite aux recommandations de plusieurs études d'impact. Un site au large du New Jersey ayant fait l'objet de rejets intensifs de boues, fut particulièrement affecté par une contamination bactérienne et chimique (Hill et al. 1996; Takizawa et al. 1993). L'épandage représente une option très intéressante puisqu'il met à profit les propriétés fertilisantes des boues (Steritt et Lester 1980). Cependant, vu les risques de contamination des sols, des cultures et les risques potentiels pour la santé publique, l'épandage des boues ne pourrait se faire sans traitement préalable. La section suivante fait état de la composition microbiologique et chimique des boues, en insistant sur les éléments limitant le recyclage de ce déchet.

1.1.2 Composition microbiologique des boues d'épuration

Les boues d'épuration concentrent les micro-organismes saprophytes responsables de la digestion de la matière organique des eaux usées, mais peuvent aussi renfermer plusieurs organismes pathogènes. Les eaux usées et les boues traitées inadéquatement constituent donc des réservoirs importants pour ces micro-organismes (Martin et al. 1992). Le tableau 1.1 dresse une liste des bactéries pathogènes et des virus, avec en exemple certaines maladies qu'ils peuvent causer. Cette liste n'est pas statique, car les connaissances évoluent rapidement, que ce soit au niveau des techniques de détection des organismes pathogènes, de la découverte de nouveaux agents infectieux ou de l'émergence de nouveaux organismes résistants aux antibiotiques (Scarpino et al. 1988). La distribution relative de ces pathogènes varie beaucoup selon les pays ou les régions et pour ne citer qu'un exemple, les eaux usées des pays en voie de développement peuvent contenir plusieurs millions de particules virales par litre, tandis qu'en Amérique du Nord, on en retrouve quelques centaines par litre (Payment 1993, Hovi et al. 1996).

Tableau 1.1 Bactéries pathogènes et virus retrouvés dans les boues d'épuration[1].

Organismes pathogènes	Maladie ou symptôme
Bactéries	
Salmonella spp.	fièvre typhoïde, salmonellose
Shigella spp., *Yersinia spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*	gastro-entérite
Clostridium spp.	botulisme, tétanos
Mycobacterium spp.	infection des voies respiratoires
Virus	
Poliovirus	poliomyélite
Coxsakievirus A et B, Echovirus	méningite, affection respiratoire, myocardite
Hépatite A et E	hépatite
Rotavirus, Norwalk	gastro-entérite aiguë

1) Données colligées de Scarpino et al. 1988 et de l'Environmental Protection Agency (U.S. EPA 1989).

Comme le rapporte le tableau 1.1, les espèces de coliformes retrouvées dans les boues d'épuration sont généralement la cause de troubles digestifs, tels que des gastro-entérites, lesquelles peuvent s'avérer très aiguës comme celles causées par certaines souches virulentes de *Escherichia coli* (Parmelee 1990; Craun 1991; Keene 1994; Grant et al. 1996). La transmission d'espèces de *Mycobacterium* chez les personnes immuno-déprimées, qui est souvent de nature nosocomiale, a récemment été reliée à la mauvaise qualité de l'eau potable (Wallace 1987; von Reyn et al. 1994). Les spores formées par les espèces de *Clostridium*, typiquement présentes dans les eaux usées et les boues, sont particulièrement résistantes aux contraintes environnementales et représentent de bons indicateurs de pollution (Payment et Franco 1993; Hill et al. 1996).

Les virus cités au tableau 1.1 sont pour la plupart à l'origine de troubles entériques et leur transmission se fait aussi par absorption d'eau traitée inadéquatement. L'agent Norwalk fut identifié comme étant responsable d'une part importante des épidémies causées par l'eau et comme les Rotavirus, il peut causer un état de déshydratation très critique (Hedberg et Osterholm 1993). Les Coxsakievirus et les Echovirus peuvent également causer des affections respiratoires et des méningites. Malgré les progrès réalisés au niveau de l'éradication du virus de la poliomyélite, il semble persister des souches sauvages qui furent la cause de récentes épidémies chez des populations non vaccinées (Drebnot et al. 1997). Enfin, les virus de l'hépatite A et celui de l'hépatite E sont endémiques dans

plusieurs régions du monde où l'eau n'est pas traitée (Ramalingaswami et Purcell 1988; Jothikumar et al. 1993; Graff et al. 1993).

Les protozoaires constituent un groupe important de pathogènes pouvant se retrouver dans les eaux usées et les boues d'épuration. La recrudescence d'infections par *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum* en Amérique du Nord est causée par la mauvaise qualité de l'eau (Mayer et Palmer 1996). Enfin, plusieurs espèces d'helminthes, qui font partie des eaux usées et des boues, sont très résistants aux divers traitements (Hays 1977).

1.1.3 Composition chimique des boues

1.1.3.1 Matière organique et valeur fertilisante

Les teneurs d'azote et de phosphore des boues se comparent à celles retrouvées dans d'autres fertilisants organiques. Le tableau 1.2 présente les concentrations typiques des principaux éléments qui sont bénéfiques en agriculture. Parmi les composés carbonés, on retrouve des teneurs non négligeables de lignine et de cellulose, qui contribuent à maintenir la structure et la texture du sol et à retenir l'eau (Steritt et Lester 1980). Le tableau indique qu'environ 24% de l'azote se retrouve sous une forme directement assimilable par les plantes (ammoniaque, nitrite et nitrate). Par ailleurs, 50 à 75% du phosphore total se retrouve sous une forme immédiatement disponible.

Tableau 1.2 Composés à valeur fertilisante dans les boues d'épuration[1].

Élément	Concentration[2]
Carbone organique total	315 000
Azote total	51 741
Azote ammoniacal	12 035
Nitrite et nitrate	300
Phosphore total	12 025

1) Données colligées de St-Yves et Beaulieu (1988) et du Ministère de l'environnement (1987).
2) Les concentrations sont exprimées en mg/Kg de matière sèche.

1.1.3.2 Contaminants organiques

Les boues de stations municipales peuvent renfermer des contaminants organiques comme des pesticides, des BPC, des HAP et des phtalates (Environnement Canada, 1985). Le caractère hydrophobe de ces composés les font adhérer aux solides en suspension plutôt

que de les solubiliser dans l'eau et c'est pourquoi ils se concentrent dans les boues. Mais généralement, la concentration de ces substances est relativement faible dans les boues d'épuration (Couillard et Grenier 1990).

1.1.3.3 Métaux

La présence de métaux dans les boues d'épuration dépend de l'activité industrielle de la région, des habitudes de vie de la population et de l'état des conduites d'eaux (Lester 1987). Pour ce qui est des sources domestiques, Lester (1987) indique que les produits de nettoyage, les médicaments, les cosmétiques et certains shampooings sont des sources de métaux variés. Les industries de transformation des métaux, de placage, de fabrication de pigments pour peintures, de production et d'utilisation d'herbicides et d'insecticides, de pâtes et papiers, de pétrochimie, de textile et de tannerie sont autant de sources de métaux provenant du secteur industriel (Lester 1987). Par ailleurs, le ruissellement des métaux peut provenir des routes et de l'entretien de celles-ci, ainsi que des véhicules automobiles. Les sources de contamination qui sont nombreuses et souvent diffuses, expliquent la présence de métaux dans les stations d'épuration. Les métaux se concentrent dans les boues car ils forment des complexes avec les exopolymères, s'entrappent dans des agrégats microbiens, se lient à la matière organique particulaire, ou précipitent sous forme de sels inorganiques (Brown et Lester 1979; MacNicol et Beckett 1989). De façon générale, les métaux ne se retrouvent pas en solution, mais leur spéciation variera en fonction de facteurs tels que le pH, la température et le potentiel d'oxydoréduction (Lake et al. 1984).

Plusieurs études indiquent que plus de 50% des boues produites contiennent des concentrations de métaux qui excèdent les normes maximales d'épandage établies dans les pays industrialisés (Lester et al. 1983; St-Yves et Beaulieu 1988; Tjell 1986; Wong et Henry 1984). De plus, des études indiquent que l'application de boues a engendré une accumulation de métaux dans les sols, pouvant atteindre les seuils de phytotoxicité en quelques décennies seulement (Chang et al. 1984; Levine et al. 1989; Adamu et al. 1989; McGrath et Lane 1989). Les effets toxiques qu'exercent les métaux sur les plantes, les animaux et les humains peuvent être de nature chronique ou aiguë (Lester 1987). L'assimilation de doses importantes de métaux peut rapidement causer la mort d'un organisme, tandis que des doses plus faibles peuvent causer des effets néfastes sur la croissance, des effets carcinogènes, mutagènes ou tératogènes (Lester 1987).

Ce survol donne une idée des risques associés à l'utilisation des boues en agriculture. Par conséquent, avant de valoriser les boues par épandage, on comprendra pourquoi celles-ci doivent subir un traitement visant à réduire la concentration de ces facteurs et ainsi limiter la contamination du sol et des cultures.

1.1.4 Traitements des boues

1.1.4.1 Stabilisation et désinfection

Divers procédés ont été développés afin de réduire les risques associés à la présence de micro-organismes pathogènes dans les boues. Trois facteurs d'importance majeure détermineront leur survie dans les boues d'épuration. Il s'agit de la température, du degré d'humidité et de la durée du traitement. Les méthodes de stabilisation et de désinfection des boues d'épuration sont présentées au Tableau 1.3. Les virus ne sont pas présentés dans ce tableau, mais des observations indiquent que leur inactivation dépend des mêmes facteurs que pour l'inactivation des bactéries (Berg et Berman 1980; Straub et al. 1994).

Parmi les traitements présentés, on observe que lorsque la température atteint 60°C et plus, comme dans le cas de la digestion anaérobie thermophile, de la digestion aérobie thermophile et du compostage, la survie des bactéries et des oeufs de parasites est grandement réduite (Wiley et Wasteberg 1969; Berg et Berman 1980; O'Donnell et al. 1984; Storey 1987). Lorsque le procédé est mené en condition mésophile, il est recommandé de prolonger le temps de traitement. L'augmentation du pH des boues à des valeurs supérieures à 12 pendant au moins deux heures, est aussi un traitement qui cause la létalité de ces organismes, surtout s'il est précédé d'une déshydratation des boues. Le séchage thermique des boues jusqu'à l'obtention de plus de 75% de solides totaux constitue également un traitement efficace (Ward et Ashley 1977; Ward et al. 1981; Yeager et Ward 1981).

En même temps qu'ils réduisent la concentration des micro-organismes, les procédés de digestion et de compostage stabilisent les boues, c'est-à-dire qu'ils réduisent la concentration de la matière organique facilement biodégradable, évitant ainsi de nouvelles contaminations. D'autres types de traitements, basés sur la pasteurisation et l'irradiation, devraient donc être complétés par un traitement de stabilisation (Havelaar 1984; Ottolenghi et Hamparian 1987). Cependant, ils sont très peu utilisés pour le traitement des boues.

Tableau 1.3 Réduction des bactéries et oeufs de parasites lors du traitement des boues d'épuration[1].

	Effet létal sur les organismes[3]		
	Facteur actif	**Bactéries**	**Œufs de parasites**
Type de procédé[2]			
Digestion anaérobie	chaleur		
mésophile	25-35°C	faible/bon	faible/bon
thermophile	40-70°C	bon	bon
Digestion aérobie	chaleur		
O_2	60-80°C	bon	bon
air	40-60°C	faible/bon	faible/bon
Compostage	chaleur 50-80°C	bon	bon
Traitement à la chaux	pH>12, fortes[NH_3]	bon	variable

1) Tableau adapté de Havelaar (1984).
2) Conditions typiques des procédés.
3) Bon: pas de survie; modéré: réduction significative; faible: pas de réduction significative; var.: variable, dépend des espèces.

Les traitements décrits ci-haut n'ont cependant aucune action sur l'élimination des métaux. La problématique posée par la présence de métaux lourds dans les boues a suscité l'intérêt de développer des procédés de décontamination. Plusieurs procédés sont basés sur l'adsorption des métaux à la surface de bactéries ou de champignons (Norberg et Rydin 1984; Siegel et al. 1990; Burgstaller et Schinner 1993; Shuttleworth et Unz 1993). Cependant, ces traitement sont déstinés à décontaminer les eaux usées et non pas les boues. Le présent travail porte plutôt sur la solubilisation biologique des métaux contaminant les boues d'épuration. Les principes de ce processus sont décrits à la section suivante.

1.1.4.2 Solubilisation des métaux

Plusieurs procédés de solubilisation des métaux contenus dans les boues d'épuration ont été rapportés dans la littérature. Les procédés basés sur l'ajout d'acides inorganiques constituent des traitements dont l'efficacité est généralement faible (Wong et Henry 1988). Dans le but d'améliorer les performances de solubilisation des métaux, le développement de procédés biotechnologiques a été entrepris (Wong et Henry 1984; Tyagi et Couillard 1987). Les procédés biologiques font appel au métabolisme chémolithotrophe des espèces bactériennes du genre *Thiobacillus* qui oxydent le fer ou le soufre. Les réactions d'oxydation catalysées par ces organismes induisent l'abaissement du pH et l'augmentation

du potentiel d'oxydoréduction, deux conditions menant à la solubilisation des métaux. L'équation 1) représente l'oxydation du sulfate ferreux par *Thiobacillus ferrooxidans*.

$$1)\ 2\,FeSO_4 + 0.5\,O_2 + H_2SO_4 \xrightarrow{\textit{Thiobacillus ferrooxidans}} Fe_2(SO_4)_3 + H_2O$$

Les ions ferriques (Fe^{3+}) produits sont de puissants oxydants qui transforment les sulfures métalliques sous forme d'ions libres M^{2+} (équation 2). Les équations 1) et 2) résument le processus indirect de biolixiviation des métaux.

$$2)\ Fe_2(SO_4)_3 + MS \longrightarrow M^{2+} + 4\,FeSO_4 + S^0$$

Comme *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans* sont capables d'oxyder le soufre élémentaire, celui-ci pourra être oxydé en sulfate et former de l'acide sulfurique (équation 3). Lorsqu'il s'agit de l'oxydation de sulfures métalliques, on parle du processus direct de biolixiviation.

$$3)\ S^0 + 1.5\,O_2 + H_2O \xrightarrow[\textit{Thiobacillus thiooxidans}]{\textit{Thiobacillus ferrooxidans}} H_2SO_4$$

Le démarrage du procédé de biolixiviation basé sur l'ajout de fer ferreux requiert la pré-acidification des boues à pH 4,0. Même si des thiobacilles sont présents dans les eaux usées et dans les boues, l'inoculation de *T. ferrooxidans* accélère le démarrage du procédé (Hutchinson et al. 1966; Khalid et Malik 1987; Tyagi et al. 1993). Couillard et Mercier (1991) ont rapporté des rendements de solubilisation d'environ 90% pour le Cu, le Zn et le Mn, et de 65% pour le Cd et le Ni en culture continue avec un temps de rétention hydraulique de 0,75 jour. À la fin du traitement, les phases solide et liquide sont séparées par filtration ou par centrifugation et des boues décontaminées sont ainsi obtenues (Couillard et Mercier 1993).

La faisabilité technique en réacteur pilote de 4 m^3 et l'évaluation économique des procédés de biolixiviation ont été réalisées. La biolixiviation se compare avantageusement aux autres types de traitement des boues décrits ci-haut (Couillard et Mercier 1994; Blais et Sasseville 1997). Enfin, il a été démontré que les principaux organismes indicateurs de

pathogènes étaient éliminés lors du traitement et que les boues étaient stabilisées (Wong et Henry 1984; Henry et al. 1988; Blais et al. 1992).

Vu leur capacité d'oxyder le fer ferreux et ou les composés soufrés réduits, les espèces acidophiles du genre *Thiobacillus* revêtent une importance majeure lors du procédé de biolixiviation. La prochaine section fait état des principales caractéristiques des thiobacilles acidophiles et comme ce travail porte sur l'étude du procédé à base de fer, l'emphase sera mise sur *T. ferrooxidans*.

1.1.5 Caractéristiques des thiobacilles

1.1.5.1 Métabolisme et taxonomie

Par définition, les thiobacilles sont des bâtonnets gram-négatifs, non sporulants, qui obtiennent leur énergie à partir de composés soufrés réduits (Kelly 1989). Afin de mieux établir la classification des espèces, d'autres caractères sont utilisés. Il s'agit de la teneur en G+C, de l'homologie ADN-ADN, de l'analyse des ARNr, de la présence de certains acides gras et du type d'ubiquinone (Hutchinson et al. 1966; Harrison 1982, Katayama-Fujiyama et al. 1982; Wakao et al. 1991). Le genre *Thiobacillus* englobe une vingtaine d'espèces, caractérisées par différents types métaboliques (autotrophe obligatoire, autotrophe facultatif et mixotrophe), différents pH de croissance (acidophile et neutrophile) et par différentes températures de croissance (mésophile et thermophile) (Kuenen, 1992). Le tableau 1.4 dresse la liste des espèces acidophiles. Parmi celles-ci on retrouve *T. thiooxidans*, une espèce autotrophe qui n'utilise que les composés soufrés et qui est sans doute l'espèce la plus acidophile, puisqu'on a pu observer sa croissance à un pH inférieur à 0,5 (Kuenen et al. 1992). *T. albertis* ressemble beaucoup à *T. thiooxidans* mais son contenu en G+C (61,5%) est à ce point différent de *T. thiooxidans* (51-53%) que cette bactérie constitue une espèce à part. De plus, sa tolérance aux fortes concentrations d'acide semble moins élevée que celle de *T. thiooxidans*.

T. cuprinus est une espèce autotrophe facultative qui utilise comme substrats énergétiques, soit des composés soufrés, soit des sucres simples. Pour sa part, *T. acidophilus* est une espèce mixotrophe, puisque des substrats inorganiques à base de soufre et des substrats organiques tel que le glucose peuvent simultanément supporter sa croissance (Pronk 1990). *T. ferrooxidans* et *T. prosperus* sont des espèces autotrophes strictes, qui obtiennent leur énergie à partir de l'oxydation de composés soufrés, de l'ion ferreux et de plusieurs minerais, comme la pyrite. *T. prosperus* montre plus de résistance à la pression osmotique

(espèce halotolérante), mais son rendement de croissance sur l'ion ferreux est plus faible que celui observé chez *T. ferrooxidans* (Huber et Stetter 1989).

Tableau 1.4 Liste des thiobacilles acidophiles[1].

Espèce	Type de physiologie	contenu en GC (%)	Température de croissance (°C)	Référence
T. ferrooxidans	autotrophe obl.[2]	55-65	30-35	Temple et Colmer, 1951
T. thiooxidans	autotrophe obl.	51-53	25-30	Waksman et Joffe, 1921
T. acidophilus	mixotrophe	61-64	25-30	Guay et Silver, 1975
T. cuprinus	autotrophe fac.[2]	66-69	30-36	Huber et Stetter, 1990
T. prosperus	autotrophe obl.	61-64	30-35	Huber et Stetter, 1989
T. albertis	autotrophe obl.	61,5	25-30	Bryant et al., 1983

1) Adapté de Kuenen (1992).
2) obl.: obligatoire; fac.: facultatif

Plus spécifiquement, *T. ferrooxidans* qui mesure un µm de long, est généralement aérobie et mésophile, bien qu'une activité suboptimale est possible entre 4 et 37°C (Ahonen et Tuovinen 1989). Cette espèce possède un pH optimal de 2,0, mais sa croissance a été rapportée à pH 1,0 (Cox et al. 1979). L'oxydation du fer ferreux ne procure que très peu d'énergie à la cellule bactérienne et c'est pourquoi le rendement de croissance sur un tel substrat est faible (Hazeu et al. 1986). Les électrons libérés lors de l'oxydation du Fe^{2+} sont graduellement acheminés vers l'oxygène moléculaire par l'intermédiaire d'une chaîne respiratoire partiellement caractérisée, dont certains constituants sont fortement exprimés (Vernon et al. 1960; Cobley et Haddock 1975; Ingledew et Cobley 1980; Blake et al. 1993; Valkova-Valchanova et Chan 1994). En accord avec la théorie chémo-isosmotique de Mitchell (1966), un gradient de protons serait maintenu par translocation des ions H^+ vers l'extérieur de la cellule. Les protons ne franchiraient la barrière membranaire vers l'intérieur du cytoplasme que pour participer au mécanisme de conservation de l'énergie via la phosphorylation oxydative de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) et participer à la réduction finale de l'oxygène moléculaire (Ingledew et al. 1977; Ingledew 1982; Cobley et Cox 1983). Comme mentionné plus haut, *T. ferrooxidans* est une espèce autotrophe car elle synthétise toutes ses composantes cellulaires à partir du CO_2, faisant intervenir les enzymes du cycle de Calvin (Maciag et Lundgren 1964; Gale et Beck 1967).

Récemment, on a observé que les mécanismes de respiration de *T. ferrooxidans* étaient plus diversifiés. En aérobiose, cette espèce utilise l'oxygène ou le fer ferrique comme accepteurs d'électrons et en plus du fer ou du soufre, elle est capable d'oxyder l'hydrogène moléculaire et le formate comme sources d'énergie (Drobner et al. 1990; Pronk et al. 1991a). En anaérobiose, *T. ferrooxidans* peut respirer en utilisant le fer ferrique comme accepteur terminal d'électrons et utiliser le soufre élémentaire ou le formate comme sources d'énergie (Pronk et al. 1991b, 1992).

1.1.5.2 Écologie

De façon générale, c'est la présence de composés soufrés réduits dans les sols, dans l'eau et dans les sédiments aquatiques qui déterminera la présence de thiobacilles en milieu naturel (Kuenen et al. 1992). Le métabolisme de ces bactéries fait en sorte qu'elles jouent un rôle économique très important. En effet, comme ils causent l'oxydation des sulfures métalliques, les thiobacilles sont utilisés dans plusieurs procédés d'extraction biologique des métaux de base comme le cuivre et le zinc. Pour ce qui est de l'extraction de l'or, la biolixiviation sert de pré-traitement oxydatif pour altérer la matrice pyritique et ainsi accroître les rendements d'extractions subséquents. Les procédés d'extraction du cuivre et de l'or sont ceux qui connaissent le plus de succès du point de vue commercial (Brierley 1978a; Lundgren et Silver 1980; Hutchins et al. 1986; Rossi 1990; Lawrence et Poulin 1995). *T. ferrooxidans* est l'espèce la plus utilisée dans ces procédés (Kelly 1989).

Cependant, les thiobacilles sont la cause d'un problème environnemental majeur, là où les ressources minières sont exploitées. Les déchets miniers constituent des niches écologiques pour plusieurs espèces de thiobacilles qui génèrent de l'acide entraînant ainsi la solubilisation des métaux sous forme d'ions libres M^{2+} toxiques (Morel et al. 1983). L'entraînement de cette solution par ruissellement, que l'on appelle drainage acide, représente une menace pour les écosystèmes adjacents (Colmer et Hinkle 1947; Singer et Stumm 1970). En effet, pour deux mines situées au nord du Québec, on a mesuré des concentrations de 39,7 Kg et de 16,1 Kg d'acide sulfurique par tonne de déchets miniers, produit par des *Thiobacillus* acidophiles, ceci ayant acidifié les milieux à des pH de 2,4 et de 3,1 (Southam et Beveridge 1993).

Étant donné l'importance économique et environnementale de *T. ferrooxidans*, les facteurs écologiques susceptibles d'influencer son développement ont été étudiés et les populations microbiennes qui partagent son habitat ont été caractérisées. Plusieurs espèces

microbiennes partagent l'environnement de *T. ferrooxidans*, que ce soit dans des procédés d'extraction minière, dans les eaux de drainage acide ou comme contaminants des cultures de laboratoire. Des espèces hétérotrophes insoupçonnées contaminant les cultures de *T. ferrooxidans* ont longtemps biaisé l'étude de ce micro-organisme (Tabita et Lundgren 1971a; Shafia et Wilkinson 1969; Shafia et al. 1972; Tuovinen et al. 1971; Tuovinen et Nicholas 1977). La mise en évidence de l'un de ces contaminants a révélé le besoin d'améliorer les méthodes permettant la culture pure de *T. ferrooxidans*, car les milieux existants inhibaient la formation de colonies (Zavarzin 1972). Par la suite, plusieurs types de milieux solides utilisant divers agents solidifiants tels que l'agar, l'agarose ou le "phytagel" ont été décrits (Tuovinen et Kelly 1973; Manning 1975; Mishra et al. 1983; Johnson et Kelso 1983; Harrison 1984; Johnson et al. 1987; Das et al. 1989; Visca et al. 1989; Khalid et al. 1993). Dans une revue de l'efficacité de ces milieux, Johnson (1995) a conclu que si toutes les précautions sont prises, l'obtention de colonies de *T. ferrooxidans* peut être très efficace.

L'inhibition de croissance fréquemment observée provient de l'effet toxique qu'exercent certains sucres provenant de l'hydrolyse de l'agar, de même que certains acides organiques tel que le pyruvate, produit par *T. ferrooxidans* (Borichewski 1967; Silver et al. 1967; Tabita et Lundgren 1971b; Tuovinen et al. 1971; Tuovinen et Kelly 1973; Tuttle et Dugan 1976; Tuttle et al. 1977; Harrison 1984; Onysko et al. 1984; Johnson et McGinness 1991). Le mécanisme de toxicité des sucres demeure inconnu. Mais pour ce qui est des acides organiques, on pense que leur passage à travers la paroi de *T. ferrooxidans* est favorisé par le gradient d'acidité existant entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. L'accumulation de ces acides viendrait interférer avec la chaîne respiratoire et causerait une acidification du cytoplasme, compromettant ainsi les fonctions cellulaires (Tuttle et Dugan 1976; Tuttle et al. 1977; Ingledew 1982; Alexander et al. 1987).

La recherche de contaminants à partir des cultures de *T. ferrooxidans* a permis l'isolement de plusieurs nouvelles espèces hétérotrophes acidophiles, incluant *T. acidophilus, Acidiphilium* spp. et d'autres espèces (Guay et Silver 1975; Harrison 1981; Wichlacz et Unz 1981; Lobos et al. 1986; Bhattacharyya et al. 1991; Wichlacz et al. 1986). Il fut démontré que certaines de ces espèces jouent un rôle synergique au niveau de la croissance de *T. ferrooxidans* (Nerkar et al. 1977; Tsuchiya et al. 1974; Trivedi et Tsuchiya 1975; Arkesteyn et de Bont 1980; Wichlacz et Thompson 1988). Il semble donc que les

interactions microbiennes entre *T. ferrooxidans* et les autres micro-organismes qui partagent son habitat revêtent une importance majeure (Harrison 1984).

1.1.5.3 Classification phylogénétique

En plus des thiobacilles, d'autres eubactéries (vraies bactéries) sont capables d'oxyder les composés à base de soufre ou de fer. Parmi celles-ci, on retrouve les genres *Thiomicrospira* et *Thiosphaera*, qui s'apparentent aux thiobacilles neutrophiles (Kuenen et al. 1992). Cependant, des analyses phylogénétiques indiquent qu'ils sont très éloignés des thiobacilles (Lane et al. 1985a, 1992). Le métabolisme de *Leptospirillum ferrooxidans* et de *Gallionella sp.* s'apparente à celui de *T. ferrooxidans*, en ce sens qu'ils sont capables d'obtenir leur énergie à partir de l'oxydation du fer ferreux (Markosyan 1972; Hanert 1981; Sand et al. 1992). Cependant, le genre *Gallionella* comporte des espèces neutrophiles dont la morphologie cellulaire est très distincte de *T. ferrooxidans*. Pour sa part, *Leptospirillum ferrooxidans* est aussi morphologiquement différent de *T. ferrooxidans* et n'a montré aucun lien phylogénétique avec les thiobacilles (Lane et al. 1992). Des espèces hétérotrophes qui catalysent aussi l'oxydation du fer furent décrites. Des analyses moléculaires indiquent que ces espèces sont distinctes de toutes les espèces acidophiles connues, indiquant qu'elles formeraient vraisemblablement un nouveau genre bactérien (Johnson et al. 1995). On a aussi caractérisé des souches Gram positives, capables d'oxyder le fer ferreux de façon autotrophe (Brierley 1978b). Il s'agit des souches modérément thermophiles TH3 et ICP, récemment regroupées dans un nouveau genre, soit *Acidimicrobium* (Clark et Norris 1996). La diversité bactérienne capable d'obtenir de l'énergie à partir de composés soufrés ou ferreux est importante et selon la littérature récente, cette diversité ne semble pas encore décrite de façon exhaustive. La phylogénie de ces espèces laisse supposer que ces phénotypes n'auraient pas évolué à partir d'un ancêtre commun; l'évolution menant à ce type de métabolisme serait alors de nature convergente (Lane et al. 1992).

À l'intérieur même de l'espèce *T. ferrooxidans*, des analyses du contenu G+C, de l'homologie ADN-ADN, de la séquence de l'ARNr 5S et de la région intergénique entre l'ADNr 16S et l'ADNr 23S indiquent une disparité évolutive entre les souches (Harrison 1982; Lane et al. 1985a; Pizarro et al. 1996). Par exemple, lors d'une étude comparative de 23 souches de *T. ferrooxidans*, celles-ci se sont réparties en sept groupes d'homologie différents (Harrison 1982). Certaines souches avaient entre elles une homologie ADN-ADN inférieure à 50%. Selon les critères actuels de taxonomie, ces souches pourraient constituer des espèces différentes, car au niveau de l'homologie ADN-ADN, une valeur

minimale de 70% marque l'appartenance de deux souches à la même espèce (Wayne et al. 1987). Les analyses du gène codant pour l'ARNr 16S révèlent que la majorité des souches *T. ferrooxidans* se retrouvent à l'intérieur de la subdivision β des Protéobactéries. Cependant, ces études corroborent la diversité génétique à l'intérieur de l'espèce et on pense que la révision taxonomique de l'espèce *T. ferrooxidans* devra être réalisée lorsque d'autres critères informatifs seront disponibles (Lane et al. 1992; Goebel et Stackebrandt 1994; Shooner et al. 1996).

1.1.5.4 Dénombrement de *T. ferrooxidans*

Le manque d'efficacité et le temps nécessaire à la formation de colonies par *T. ferrooxidans* limitent l'isolement et la purification de cette bactérie, mais aussi son dénombrement. Le développement de méthodes alternatives à la culture tente de pallier à ces lacunes. Cependant, plusieurs de celles-ci ne sont pas spécifiques à *T. ferrooxidans* ou ne permettent pas de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes. C'est le cas du compte microscopique qui est largement utilisé étant donné sa rapidité, et du comptage basé sur la résistance électrique des cellules (Shuler et Tsuchiya 1975). La technique du nombre le plus probable est sensible, mais dix jours d'incubation sont nécessaires pour l'obtention du résultat (Lafleur et al. 1992). Une technique basée sur la formation de colonies sur filtres de polyester ou de polycarbonate flottants sur un milieu liquide a été développée, mais cette méthode ne s'est pas montrée supérieure à la culture sur milieux solides (deBruyn et al. 1990).

Les méthodes d'épifluorescence basées sur la coloration de l'ADN avec de l'acridine orange, qui sont utilisées pour le dénombrement de *T. ferrooxidans*, ont l'avantage de faire la discrimination entre les cellules mortes et vivantes, mais ne sont pas spécifiques pour un micro-organisme en particulier (Huber et al. 1985; Yeh et al. 1987). La spécificité conférée par l'utilisation d'anticorps en immuno-fluorescence a permis l'énumération rapide de *T. ferrooxidans* (Apel et al. 1976; Gates et Pham, 1979). La mise au point d'une technique de dosage radioimmunologique a ajouté de la sensibilité à cette approche (Arredondo et Jerez 1989). Dans le but de combiner spécificité et distinction des cellules viables, la technique d'immuno-fluorescence a été suivie de l'ajout d'un accepteur d'électrons devenant visible lorsque réduit, ou de la coloration de l'ADN avec du bromure d'éthidium (Baker et Mills 1982; Muyzer et al. 1987).

Enfin, ces techniques sont très efficaces pour la recherche d'espèces connues. Mais pour étudier la diversité microbienne, les techniques de biologie moléculaire sont plus appropriées. La description de ces méthodes, utilisées pour l'étude de micro-organismes en milieu naturel ou dans des procédés biotechnologiques, fait l'objet de la prochaine section.

1.1.6 Écologie moléculaire

1.1.6.1 Liens évolutifs entre les micro-organismes

Les plus anciens systèmes de classification des êtres vivants sont basés sur la dichotomie animal-végétal. L'arbre décrit par Haekel en 1866 venait modifier ce système pour ajouter le règne des protistes. Par la suite, Whittaker (1969) proposa un système de classification basé sur cinq règnes, en ajoutant les bactéries et les champignons. Ce système a jusqu'à maintenant beaucoup influencé notre perception du monde vivant. Dans le but de tenir compte des liens évolutifs entre les règnes, Chatton (1938) proposait la dichotomie eucaryote-procaryote, basée sur la présence d'un noyau différencié chez les eucaryotes et l'absence de celui-ci chez les procaryotes. Le regroupement des eucaryotes en fonction de la présence d'un noyau peut certainement refléter un lien évolutif entre ceux-ci. Mais tel que souligné par Woese (1987), il était incohérent de regrouper tous les autres organismes en fonction de l'absence de ce critère. Par conséquent, le groupe des procaryotes dans lequel on incluait les eubactéries et les archaébactéries, a longtemps été considéré comme étant homogène.

Par la suite, l'étude des liens évolutifs entre les micro-organismes a pu être entreprise par l'analyse des protéines et des acides nucléiques (Zuckerkandl et Pauling 1965; Fitch et Margoliash 1967). Pendant les dernières décennies, la rapidité des techniques de séquençage s'est accrue et les travaux de Woese et de ses collaborateurs portant sur l'analyse des ARN ribosomiques (ARNr) ont fourni une base solide pour l'étude de l'évolution des bactéries (Lane et al. 1985b; Fox et al. 1980; Woese et al. 1983; 1987). Selon Pace et al. (1986) les ARNr constituent d'excellents chronomètres moléculaires pour les raisons suivantes:

1) ils sont impliqués dans les mécanismes de synthèse des protéines et sont donc importants chez tous les organismes vivants;

2) ils sont apparus très tôt dans l'évolution et sont très conservés;

3) les régions conservées permettent des comparaisons à des niveaux taxonomiques supérieurs et les régions variables permettent des comparaisons au niveau de l'espèce ou de la souche;

4) ils sont présents en quantité importante (jusqu'à 20% du poids sec de la cellule) et peuvent être facilement isolés à partir de tous les organismes;
5) leurs séquences sont suffisamment longues pour fournir un nombre de sites informatifs statistiquement significatif;
6) ils ne semblent pas soumis à des transferts latéraux entre micro-organismes et les divergences sont donc essentiellement attribuables à l'évolution.

Sur la base de ces analyses, les taxons supérieurs du système de classification ont été restructurés et la construction d'un arbre phylogénétique propose que les êtres vivants soient divisés en trois domaines nommés *Bacteria*, *Archaea* et *Eukarya* (Woese et al. 1987, 1990, 1994). La Figure 1.1 indique que les organismes eucaryotes constituent un groupe phylogénétiquement cohérent puisqu'ils ont tous été classés parmi le domaine *Eukarya*. Il est intéressant de noter que même si les animaux forment en apparence un groupe très diversifié, leur diversité évolutive est toutefois très faible par comparaison aux domaines *Bacteria* et *Archaea*. Il n'y a donc pas de corrélation entre la divergence moléculaire et la divergence phénotypique (Wilson et al. 1974).

Parmi les bactéries les mieux caractérisées, on retrouve *E. coli* de même que tous les autres coliformes, regroupés dans la subdivision γ des Protéobactéries. Comme mentionné plus haut, la majeure partie des thiobacilles se retrouve dans la subdivision β. Tel que suggéré par des analyses phylogénétiques antérieures, les *Archaea* et les *Bacteria* ne font pas partie du même règne (Fox et al. 1980). Les *Archaea* partagent des caractères phénotypiques communs avec les *Eukarya* et avec les *Bacteria* (Brock 1978; Zeikus 1977). D'autres études se poursuivent afin de déterminer la vraie racine de l'arbre et ce, sur la base de l'analyse d'autres gènes et protéines (Forterre et al. 1993; Brown et Doolittle 1995; Gruber et Bryant 1997). Les résultats ne sont pas tous en accord avec l'arbre présenté et c'est pourquoi certains auteurs préconisent une approche multi-critères ou "polyphasique", basée sur l'étude des caractères phénotypiques et génotypiques (Colwell 1970; Stackebrandt 1992; Vandamme et al. 1997).

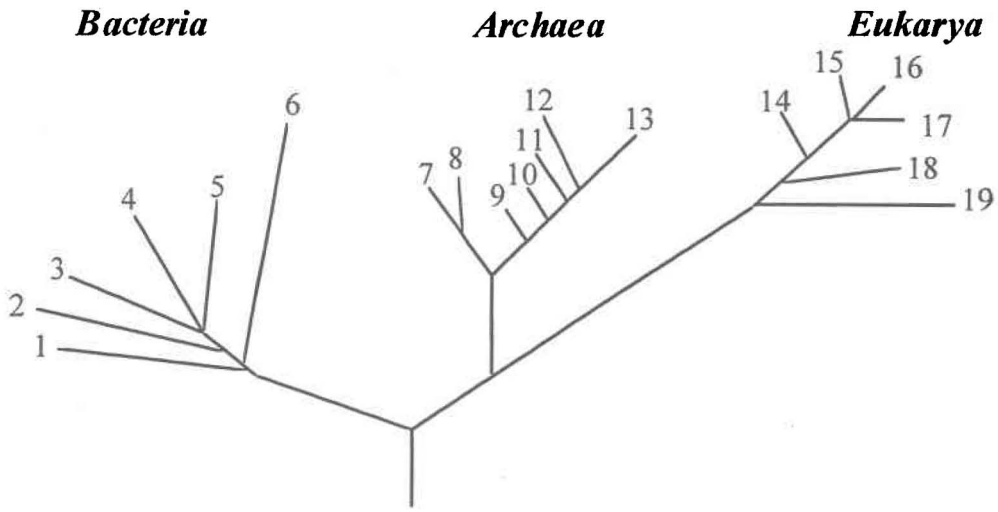


Figure 1.1 Arbre phylogénétique des êtres vivants, adapté de Woese et al. (1990). Domaine *Bacteria*: 1) ordre Thermotogales; 2) division *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*; 3) *Cyanobacteria*; 4) division *Proteobacteria*; 5) division des bactéries Gram-positives; 6) Bactéries vertes non sulfureuses. Domaine *Archaea*: 7) genre *Pyrodictium*; 8) genre *Thermoproteus*; 9) ordre *Thermococcales* 10) ordre *Methanococcales* 11) ordre *Methanobacteriales* 12) ordre *Methanomicrobiales* 13) *Archaea* halophiles extrêmes. Domaine *Eukarya*: 14) Animaux; 15) Ciliés; 16) Plantes; 17) Champignons; 18) Flagellés; 19) Microsporidies.

1.1.6.2 Outils moléculaires pour l'étude de la diversité microbienne

La possibilité de comparer les micro-organismes en fonction de la séquence de leurs ARNr a donné un nouveau souffle à l'écologie microbienne. Les outils de la biologie moléculaire constituent désormais des techniques performantes pour l'étude des populations microbiennes en milieu naturel. En 1986, on disposait de la séquence de l'ARNr 16S de 25 organismes, incluant des bactéries, des chloroplastes et des mitochondries (Pace 1986). En 1994, le Ribosomal Database Project comportait plus de 6000 séquences d'ARNr 16S provenant d'organismes procaryotes (Maidak et al. 1994). Plusieurs travaux basés sur une telle approche ont mis en évidence des micro-organismes non révélés par les techniques de culture et ces observations appuient les estimations voulant que moins de 20% de la diversité microbienne soit connue (Giovannoni et al. 1990; Ward et al. 1990; Wayne et al. 1987; Boivin-Jahns et al. 1995). L'incapacité de cultiver une importante proportion des micro-organismes provenant de milieux naturels est certes due au manque de connaissances au sujet de leur métabolisme, mais surtout à l'élimination de ceux-ci par la pression sélective qu'exerce inévitablement la culture en laboratoire. Étant donné qu'elle ne nécessite pas d'étape de culture, l'approche moléculaire peut mener à la découverte de

nouvelles espèces, dont l'affiliation phylogénétique sera en mesure de fournir des informations quant à la composition des milieux et des conditions de culture permettant leur isolement (Stackebrandt et al. 1993).

La Figure 1.2 illustre les approches possibles pour effectuer la caractérisation des communautés microbiennes par les techniques moléculaires et indique que plusieurs informations peuvent être obtenues. Par exemple, l'abondance relative des espèces peut être estimée soit par hybridation moléculaire, soit par hybridation *in situ* (Giovannoni et al. 1988; Amann et al. 1990a; Risatti et al. 1994; Zheng et al. 1996). L'utilisation de sondes spécifiques à l'ARNr 16S, couplées à des fluorochromes, permet aussi l'utilisation du cytofluoromètre, assurant un comptage spécifique, automatisé et beaucoup plus rapide que le dénombrement au microscope (Amann et al. 1990b; Wallner et al. 1995). L'hybridation *in situ* a aussi l'avantage de fournir des informations quant à la morphologie des micro-organismes, leur distribution spatiale (Risatti et al. 1994; Mobarry et al. 1996; Harmsen et al. 1996) et la structure des biofilms qu'ils forment (DeLong et al. 1989; Amann et al. 1990b; Amann et al. 1992; Porter et al. 1993; Poulsen et al. 1993; Raskin et al. 1995; Neef et al. 1996). En plus, comme le contenu cellulaire en ARNr et conséquemment l'intensité du signal obtenu par hybridation est corrélé avec le taux de croissance des bactéries, des informations quant à l'importance de l'activité métabolique des espèces peuvent ainsi être obtenues (DeLong et al. 1989; Wallner et al. 1995).

Une approche basée sur l'amplification des acides nucléiques par la réaction de la polymérase en chaîne (PCR), suivie du clonage et du séquençage des fragments produits peut répondre à d'autres questions, touchant à la diversité bactérienne totale, la détection d'espèces insoupçonnées et l'identification celles-ci (Giovannoni et al. 1990; Ward et al. 1990; DeLong et al. 1992; Liesack et Stackebrandt 1992; Stackebrandt et al. 1993; Barns et al. 1994). Des techniques de séparation des fragments de gènes obtenus par PCR telles que le DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) et le SSCP (single strand conformation polymorphism) ont permis l'obtention de résultats forts intéressants pour fournir un indice de la diversité microbienne dans plusieurs environnements (Muyzer et al. 1993; Wawer et al. 1995; Ferris et al. 1996; Lee et al. 1996a). Enfin, des travaux ont rapporté des essais de quantification des bactéries, soit par PCR couplé à la technique du nombre le plus probable, soit par PCR compétitif (Pillai et al. 1991; Sykes et al. 1992; Leser et al. 1995; Lee et al. 1996b).

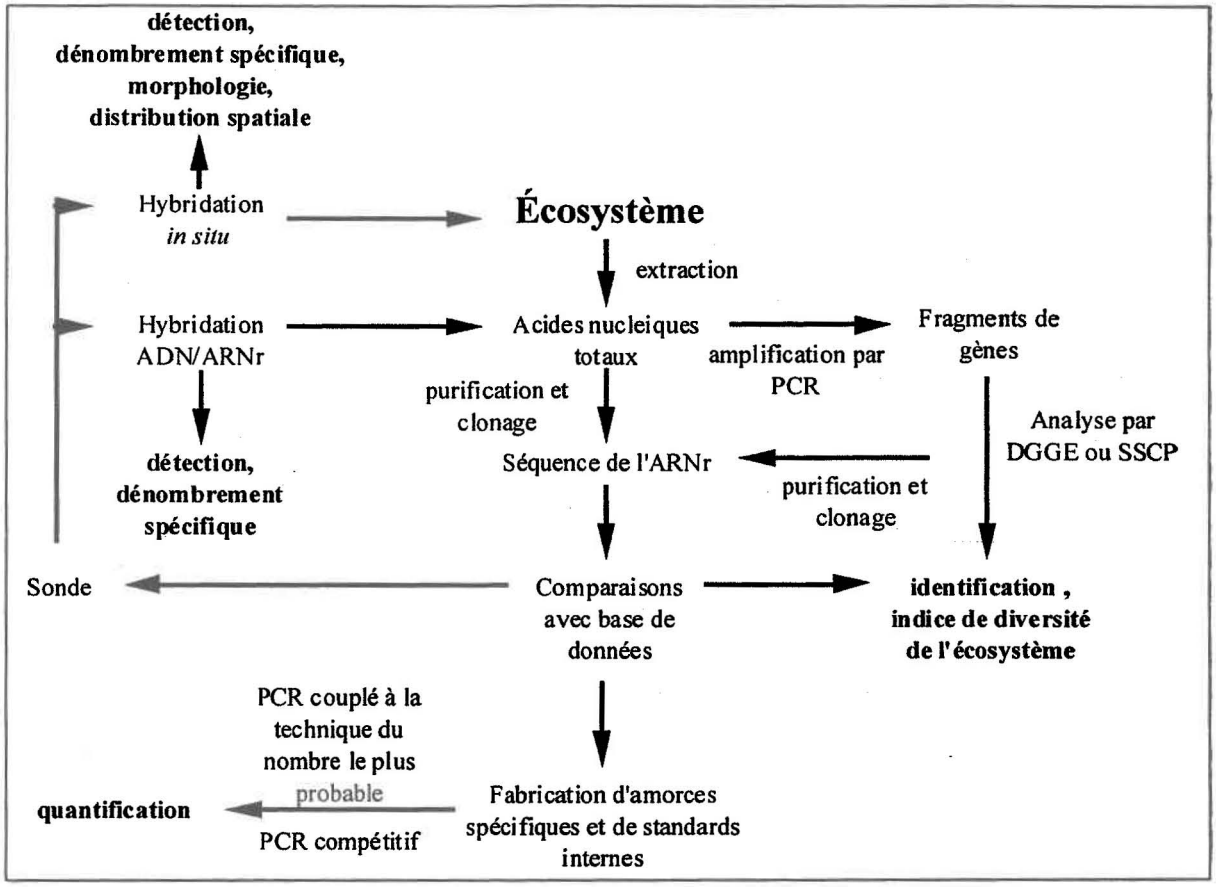


Figure 1.2 Schéma général pour la caractérisation des populations microbiennes avec des techniques de biologie moléculaire. Modifié à partir de Amann et al. (1991).

En résumé, l'application des outils de la biologie moléculaire permet une meilleure compréhension des processus écologiques microbiens responsables de la transformation du milieu naturel ou du fonctionnement des procédés biotechnologiques. Cette compréhension ouvrira de nouvelles avenues pour l'utilisation optimale des micro-organismes en biotechnologie environnementale.

1.2 Hypothèse et Objectifs

Considérant d'une part que la croissance de *T. ferrooxidans* est facilement inhibée par plusieurs composés organiques et que d'autre part, la présence de micro-organismes hétérotrophes semble renverser cet effet, nous avons voulu savoir si un mécanisme synergique similaire régissait l'activité de *T. ferrooxidans* lors du procédé de biolixiviation. Le présent travail s'inscrit dans cette problématique et poursuit deux objectifs généraux, à savoir la mise en évidence d'interactions synergiques entre *T. ferrooxidans* et des espèces microbiennes hétérotrophes lors du traitement des boues par le procédé de biolixiviation, ainsi que la caractérisation de ces espèces. La première hypothèse à vérifier est que malgré la forte pression de sélection causée par l'importante acidification s'établissant lors du procédé, il persiste des espèces hétérotrophes actives au niveau métabolique, essentielles à la croissance de *T. ferrooxidans*. Les expériences de culture de *T. ferrooxidans* présentées au chapitre II ont tenté de vérifier cette hypothèse.

Suite à la mise en évidence du rôle essentiel des populations microbiennes hétérotrophes, la caractérisation de celles-ci constituait l'objectif suivant. Compte tenu du fait que l'évaluation de la diversité des populations faisant partie de communautés microbiennes complexes est fortement biaisée par la culture des micro-organismes, nous avons décidé d'entreprendre cette investigation selon une approche moléculaire. D'ailleurs, ceci constitue la seconde hypothèse à vérifier, à savoir que l'analyse des populations bactériennes abordée par l'approche moléculaire révélera beaucoup plus de diversité que la culture de ces bactéries. Considérant que l'ADNr 16S représente une molécule dont l'analyse peut fournir le plus d'informations quant à la diversité des micro-organismes et à leur identification, nous l'avons choisi pour effectuer cette étude de biodiversité. Mais comme peu d'études ont rapporté la caractérisation moléculaire de populations bactériennes présentes dans les boues d'épuration, le chapitre III fait état de la mise au point et de la validation d'une procédure visant à connaître la diversité globale et à identifier les espèces à partir de ce type d'environnement. Le chapitre IV poursuit l'objectif ultime de révéler l'ampleur de la diversité bactérienne lors du procédé et d'identifier, par le biais d'une étude phylogénétique, les espèces qui, de concert avec *T. ferrooxidans*, permettent le fonctionnement du procédé de biolixiviation. Enfin le chapitre V regroupe les conclusions générales qui ressortent de ce travail et fait état des perspectives de recherche qui découlent de ce projet.

1.3 Publication des résultats

Les travaux du chapitre II et III ont été soumis pour publication:

Fournier, D., R. Lemieux et D. Couillard (1997). Essential interactions between *Thiobacillus ferrooxidans* and heterotrophic microorganisms for heavy metal bioleaching in wastewater sludge.

Fournier, D., R. Lemieux et D. Couillard (1997). Genetic evidence for highly diversified bacteria populations in wastewater sludge during biological leaching of metals.

Le manuscrit concernant les travaux du chapitre IV est en préparation:

Fournier, D., R. Lemieux, J. Bousquet et D. Couillard (1997). Phylogenetic analysis of the bacterial diversity found in the extreme environment of a bioleaching process for heavy metal solubilization in wastewater sludge.

Les travaux ont aussi fait l'objet de communications:

Fournier, D., D. Couillard, A. Darveau et R. Lemieux (1995). Bioleaching of heavy metals in wastewater sludges: microbial ecology and genetic molecular studies. Dans: C. A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo et J. V. Wiertz (éds) *Biohydrometallurgical processing vol. II*, Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS-95, Viña del Mar, Chile, November 19-22. University of Chile. pp 53-62. Communication avec comité de lecture.

Fournier D., A. Darveau, R. Lemieux et D. Couillard. (1995). Bioleaching of heavy metals in wastewater sludges: Synergism between acidophilic microorganisms. 45^{e} Congrès de la Société Canadienne de Génie Chimique. Québec, 15-18 octobre 1995.

Fournier, D., D. Couillard et R. Lemieux. (1994). Bioleaching of heavy metals in wastewater sludges: ecological study of an acidophile mixed microbial culture. Résumé du 7^{e} Symposium international sur la Génétique des microorganismes d'intérêt industriel, GIM 94, Montréal, 26 juin-1er juillet 1994.

Fournier, D. (1996). Importance de la diversité microbienne lors d'un procédé de solubilisation des métaux lourds contaminant les boues de stations d'épuration. Résumé du Congrès annuel de l'APCAS, (section québécoise de l'Air and Waste Management Association) Montréal, 28 mai 1996. Premier prix pour la présentation étudiante.

CHAPITRE II: IMPORTANCE DES INTERACTIONS MICROBIENNES DANS LE PROCEDE DE BIOLIXIVIATION

2.1 Introduction

Les conditions optimales pour la culture de *T. ferrooxidans* ont été largement étudiées et comme mentionné au chapitre précédent, il est bien établi que cette espèce est intolérante à la matière organique, particulièrement aux acides organiques de faible poids moléculaire. Cette intolérance rend sa croissance difficile sur milieu solide (Tuovinen and Kelly 1973), ce qui soulève des questions quant aux mécanismes par lesquels *T. ferrooxidans* peut survivre et croître dans les boues d'épuration. Cependant, il faut considérer que les boues d'épuration contiennent une importante diversité de micro-organismes, suggérant que le procédé pourrait ne pas être uniquement basé sur l'activité de *T. ferrooxidans*. Comme dans le cas d'autres traitements biologiques des eaux usées et des boues, ce procédé pourrait résulter de l'activité du consortium microbien évoluant dans ces conditions. Des interactions de type synergique pourraient supporter la croissance de *T. ferrooxidans*, qui n'est pas totalement adapté aux boues d'épuration. En laboratoire ou lors de procédés d'extraction biologique des métaux, on a rapporté que la croissance ou le métabolisme énergétique de *T. ferrooxidans* pouvaient être stimulés par certaines espèces. Il s'agit de *T. acidophilus* (Arkesteyn et deBont 1980), de *Rhodotorula sp.* (Nerkar et al. 1977), de *Beijerinckia lacticogenes* (Tsuchiya et al. 1974), et d'*Acidiphilium sp.* (Wichlacz et Thompson 1988).

Cependant, on possède peu d'informations concernant l'activité métabolique et l'autonomie de *T. ferrooxidans* lors du procédé de traitement des boues. Le but de ce chapitre est d'évaluer l'effet synergique des micro-organismes hétérotrophes sur *T. ferrooxidans* lors du procédé de biolixiviation des métaux dans les boues d'épuration. Pour ce faire, une souche de *Rhodotorula rubra*, isolée à partir de sédiments lagunaires, fut testée pour sa capacité à stimuler la croissance et l'activité métabolique de *T. ferrooxidans* en milieu synthétique. L'effet de *R. rubra* a ensuite été déterminé lors du procédé de biolixiviation, par comparaison à celui de la communauté microbienne indigène aux boues.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Micro-organismes et milieux de culture

T. ferrooxidans ATCC 19859 (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA), fut l'espèce chémolithotrophe utilisée tout au long de ces expériences. *T. ferrooxidans* était maintenu en culture dans le milieu MS, dont la composition en % (poids/vol) est de: 0,20 $(NH_4)_2SO_4$, 0,01 KCl, 0,025 K_2HPO_4, 0,025 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Harrison 1984). Le milieu MS était préparé à une concentration de 100x et était stérilisé à l'autoclave. Au moment de son utilisation, le milieu MS était dilué dans une solution stérile d'acide sulfurique de façon à ce que les milieux liquides et solides soient respectivement ajustés à pH 2,0 et à pH 3,5 (Harrison, 1984). Des concentrations de 4% (milieu liquide) et 1% (milieu solide) (poids/vol) de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, stérilisé par filtration sur une membrane de 0,2µm, étaient respectivement ajoutées comme substrat énergétique. L'absence de contaminants était régulièrement confirmée par culture sur milieu MS-Fe gélifié avec des concentrations finales de 0,4% d'agarose (Type 1, Sigma, #A-6013), de 0,01% d'extrait de levure (MS-Fe-Ye) et/ou de 0,1% glucose (MS-Fe-Ye-Glu) (poids/vol). Les espèces hétérotrophes acidophiles soit *T. acidophilus* ATCC 27087, *Acidiphilium cryptum* ATCC 33463 et la souche de *Rhodotorula rubra* (décrite plus bas) étaient cultivées dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu à pH 3,5. À moins d'être spécifiée, la température de croissance était de 30°C.

Le taux de croissance maximal (μ_{max}) de *T. ferrooxidans* a été évalué en culture pure dans les milieux MS-Fe et MS-Fe-Ye et en culture mixte avec *R. rubra* dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu. La planification des expériences est présentée au tableau 2.1.

2.2.2 Isolement et identification de micro-organismes acidophiles

Lors d'un stage au Laboratoire d'Océanographie Biologique de l'Université de Bordeaux à Arcachon au mois de janvier 1994, des sédiments de la lagune du domaine de Serte ont été prélevés. Le laboratoire de microbiologie du Prof. Pierre Caumette était intéressé par la problématique observée dans cette lagune, à savoir son assèchement périodique et la diminution substantielle du pH des sédiments lors de sa remise en eau. Ce processus d'acidification, pouvant modifier la spéciation des métaux et les rendre toxiques, laisse supposer que des espèces de *Thiobacillus* acidophiles s'y retrouvent. Le but premier des expériences était de mettre en évidence la présence de *T. ferrooxidans* dans ces sédiments particulièrement riches en précipités ferriques, mais aussi de caractériser les autres espèces présentes dans cet environnement.

Pour ce faire, la couche oxique des sédiments fut prélevée et mise en culture dans du MS-Fe, MS-Fe-Ye standard et du MS-Fe-Ye préparé dans de l'eau de la lagune. Les cultures ont été incubées à 20°C sous forte agitation et des isolements ont été réalisés sur des milieux MS solidifiés. Des colonies jaunes similaires à celles formées par *T. ferrooxidans* ont été observées de même que des colonies de levures roses-orangé. Ces colonies ont été purifiées par plusieurs passages successifs d'une colonie en milieu liquide, puis sur milieu solide. L'identification de la levure a été réalisée en utilisant le système d'identification API 20C (Biomérieux) avec une souche de *Rhodotorula glutinis* comme témoin positif, gracieusement fournie par Luc Trudel du Département de Biochimie de l'Université Laval. Afin de mieux préciser l'identification de l'espèce, l'assimilation de certains sucres a été confirmée et un test d'assimilation du nitrate fut réalisé tel que décrit (Lodder and Kreger-van Rij 1967). Ces tests sont basés sur la croissance ou non des levures dans le milieu liquide dont la composition en % (poids/vol) est la suivante: 0,50 $(NH_4)_2SO_4$, 0,10 KH_2PO_4 0,05 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 $CaCl_2$, 0,01 NaCl. Pour tester l'assimilation des sucres, ceux-ci étaient ajouté à 0,5% (poids/vol). Le test d'assimilation du nitrate fut réalisé en utilisant des concentrations finales de $(NH4)_2SO_4$ à 0,1% ou de KNO_3 à 0,078% (poids/vol). L'observation de la morphologie cellulaire en microscopie à contraste de phase a permis de compléter l'identification de la souche isolée.

La souche bactérienne isolée des enrichissements a été testée pour sa capacité à croître en présence de sulfate ferreux comme unique substrat énergétique. Sa morphologie, de même que sa réaction à la coloration de Gram, ont aussi été observées en microscopie.

2.2.3 Rôle des micro-organismes hétérotrophes sur la croissance et l'activité de *T. ferrooxidans*

2.2.3.1 Formation de colonies sur milieux solides

Afin de comparer la capacité de *T. ferrooxidans* à former des colonies en culture pure ou en présence d'organismes hétérotrophes, des milieux de culture solides ont été préparés tels que décrit par Butler et Kempton (1987) avec les modifications suivantes. Une couche mince de milieu MS-Fe-Ye a été coulée dans des boîtes de Pétri. Après solidification, un volume de 0,2 ml d'une suspension de micro-organismes hétérotrophes provenant de cultures en fin de phase logarithmique de croissance, lavée avec de l'acide sulfurique 0,01 N, a été étalé. Après séchage à température de la pièce pendant 12 heures, une seconde

couche de milieu MS-Fe-Ye a été coulée par-dessus la première. Des milieux furent préparés avec *T. acidophilus* ou *R. rubra* comme micro-organismes hétérotrophes, tous deux ayant été préalablement adaptés à croître en présence de fer. Des témoins négatifs ont été préparés en étalant 0,2 ml d'acide sulfurique 0,01 N. Le jour même, les milieux solidifiés ont été inoculés avec des dilutions décimales faites à partir d'une suspension de *T. ferrooxidans* et furent ensuite incubés à 30°C sous atmosphère humide. Les colonies ont été comptées chaque jour, jusqu'à ce que leur nombre reste stable. L'efficacité de formation de colonies a été obtenue en établissant le rapport entre le compte viable, c'est-à-dire le nombre d'unités formant des colonies (ufc) et la concentration de l'inoculum de départ, déterminée par microscopie.

2.2.3.2 Évaluation du taux de croissance

Le taux de croissance de *T. ferrooxidans* a été évalué en culture mixte avec *R. rubra*, dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu à une température de 25°C, soit à mi-chemin entre la température optimale de croissance de *T. ferrooxidans* (30°C) et la température d'enrichissement de *R. rubra* (20°C). Par la suite, *T. ferrooxidans* a été cultivé en culture pure à 20°C, dans les milieux MS-Fe et MS-Fe-Ye, afin de savoir si l'extrait de levure avait un effet sur celle-ci. Les valeurs de $\ln_2$ des concentrations bactériennes obtenues dans la phase logarithmique de croissance ont été exprimées en fonction du temps et la pente des droites obtenues correspondent au μ_{max}. La croissance, l'oxydation du fer et l'acidification du milieu ont été suivis tels que décrit à la section 2.2.4.

2.2.3.3 Performances du procédé de biolixiviation

Le même échantillon de boues secondaires provenant de la station d'épuration municipale de Beauceville (Québec) a été utilisé pour réaliser toutes les expériences de biolixiviation. La concentration des solides totaux a été mesurée par séchage des boues à 105°C, selon le protocole de l'American Public Health Association (APHA, 1989), et a été ajustée à 2% (poids/vol). Les boues ont été pré-acidifiées à pH 3,5, enrichies avec un volume de MS et supplémentées avec 4% de sulfate ferreux (8000 mg/l de Fe^{2+}) avant leur inoculation. La culture pure de *T. ferrooxidans* de même que les co-cultures de cette espèce avec *R. rubra* ou *A. cryptum* ont été faites dans des boues stérilisées deux fois à l'autoclave (121°C, 20 min.), avec un intervalle de 12 heures entre chaque cycle. Une concentration de $2x10^5$ cellules/ml a été inoculée pour chacun des micro-organismes. Les cultures de 100 ml ont été réalisées dans des erlenmeyers de 500 ml (Bellco/Biotechnology, USA) et ont été agitées à 175 rpm, à 20°C. Le plan des expériences est présenté au tableau 2.1.

Tableau 2.1 Expériences réalisées pour l'évaluation du rôle des micro-organismes hétérotrophes en co-culture avec *T. ferrooxidans*.

Paramètre évalué	Milieu de culture	Inoculum
Formation de colonies	Géloses double douche	*T. ferrooxidans*
		T. ferrooxidans et *T. acidophilus*
		T. ferrooxidans et *R. rubra*
Croissance, oxydation du fer et acidification	Milieux liquides	*T. ferrooxidans*
		T. ferrooxidans et *R. rubra*
Performances du procédé de biolixiviation	Boues d'épuration	*T. ferrooxidans*
		T. ferrooxidans et *R. rubra*
		T. ferrooxidans et *A. cryptum*
		T. ferrooxidans et microflore des boues

2.2.4 Suivi de la croissance bactérienne et méthodes analytiques

La croissance de *T. ferrooxidans* en milieu liquide a été suivie par comptage en microscopie à contraste de phase à l'aide d'une chambre de Petroff-Hausser. Le pH et le potentiel d'oxydoréduction ont été mesurés avec un pH-mètre Acumet 805MP (Fisher). Le fer ferreux et le fer total (Fe^{2+} et Fe_{total}) ont été analysés par une méthode colorimétrique basée sur la réaction des ions ferreux avec le 1,10 ortho-phenanthroline, qui détecte une gamme de concentrations de Fe^{2+} s'échelonnant de 10 à 100 mg/l (Muir and Andersen, 1977). Cette méthode est détaillée à l'annexe A et une droite de calibration est montrée à la figure A.1. Les concentrations de fer ferrique (Fe^{3+}) ont été obtenues par soustraction ($Fe_{total} - Fe^{2+}$).

2.3 Résultats

2.3.1 Enrichissement, isolement et identification de micro-organismes acidophiles à partir de sédiments

La figure 2.1 indique qu'en 150 heures de culture (environ six jours), le pH de tous les enrichissements réalisés à partir de sédiments lagunaires a diminué aux alentours de 2,5. Après épuisement du fer ferreux, des passages successifs dans du milieu neuf ont mené à l'obtention d'enrichissements très acidophiles. Par exemple, dans le milieu MS-Fe-Ye préparé avec de l'eau de la lagune, le pH a atteint une valeur de 1,5.

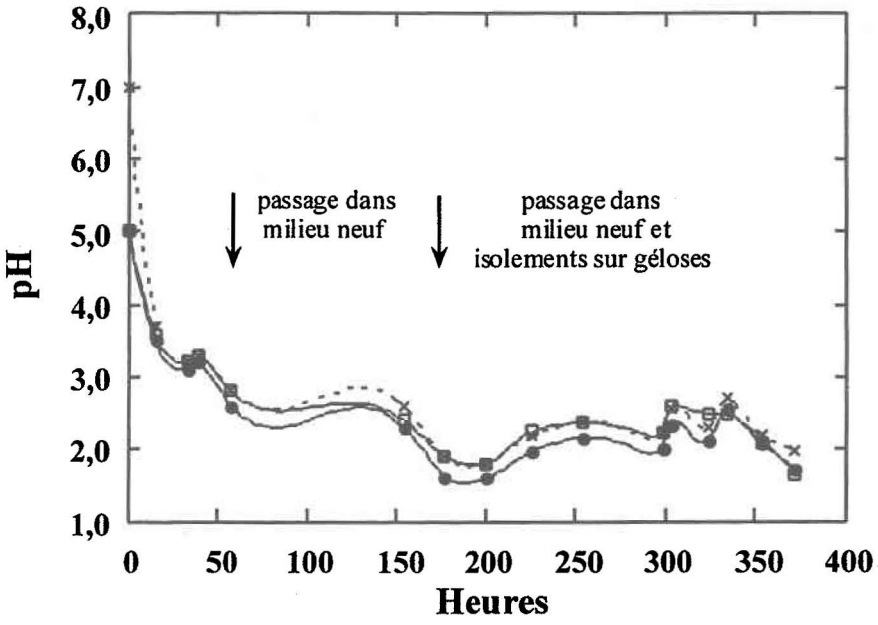


Figure 2.1 Évolution du pH lors d'enrichissements de micro-organismes acidophiles provenant de sédiments lagunaires. MS-Fe (×); MS-Fe-Ye (□); MS-Fe-Ye préparé dans de l'eau de la lagune à 8g/l NaCl (●).

Des colonies roses-orangé, caractéristiques du genre *Rhodotorula* ont été isolées et purifiées sur milieu solide et l'identification sur galerie API 20C a confirmé l'affiliation de la souche avec ce genre de levure. Les résultats provenant d'une caractérisation plus poussée sont présentés au Tableau 2.2. Tout comme *R. glutinis*, la souche de *Rhodotorula* est capable de croître avec tous les sucres testés, sauf le lactose. Cependant, la souche est incapable d'assimiler le nitrate comme source d'azote et les cellules formées sont plus allongées que celles de *R. glutinis*. En fonction de ces critères, la souche a été identifiée comme étant *R. rubra* (Lodder and Kreger-van Rij 1967). La culture de *R. rubra* dans le

milieu MS-Fe a permis de déterminer son incapacité à utiliser le sulfate ferreux comme substrat énergétique.

Tableau 2.2 Tests d'assimilation de sucres et d'azote pour l'identification de la souche de levure isolée des sédiments lagunaires[1].

Observations	***Rhodotorula glutinis***	***Rhodotorula* isolé à partir des sédiments**
Morphologie cellulaire	Ovale ronde	Ovale allongée
Pigmentation des colonies	Rose	Rose-orangé
Assimilation des sucres		
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	-	-
Assimilation de l'azote		
Ammonium	+	+
Nitrate	+	-

1) Les tests ont été réalisés en triplicata.

Parallèlement à l'isolement de *R. rubra*, des bactéries formant des colonies jaunes incrustées de précipités ferriques ont été isolées. Comme la souche bactérienne formait des bacilles Gram-négatifs, capables d'utiliser le sulfate ferreux comme seule source d'énergie, ceci suggère fortement que *T. ferrooxidans* ou *T. prosperus* (qui est une espèces halotolérante) était aussi présent dans les sédiments lagunaires.

2.3.2 Effet des micro-organismes hétérotrophes sur la croissance de *T. ferrooxidans*

Sur des milieux standards solidifiés avec de l'agarose et conservés à 4°C quelques jours avant leur utilisation, le temps requis pour l'obtention d'un nombre stable de colonies de *T. ferrooxidans* fut de huit jours et l'efficacité de formation de colonies fut inférieure à 5%. L'effet des micro-organismes hétérotrophes sur l'efficacité de formation de colonies de *T. ferrooxidans* fut évalué sur milieux solides incorporant *T. acidophilus* ou *R. rubra* entre deux couches de gélose. Pour toutes les conditions testées, des comptes stables ont été obtenus en six jours d'incubation (Figure 2.2).

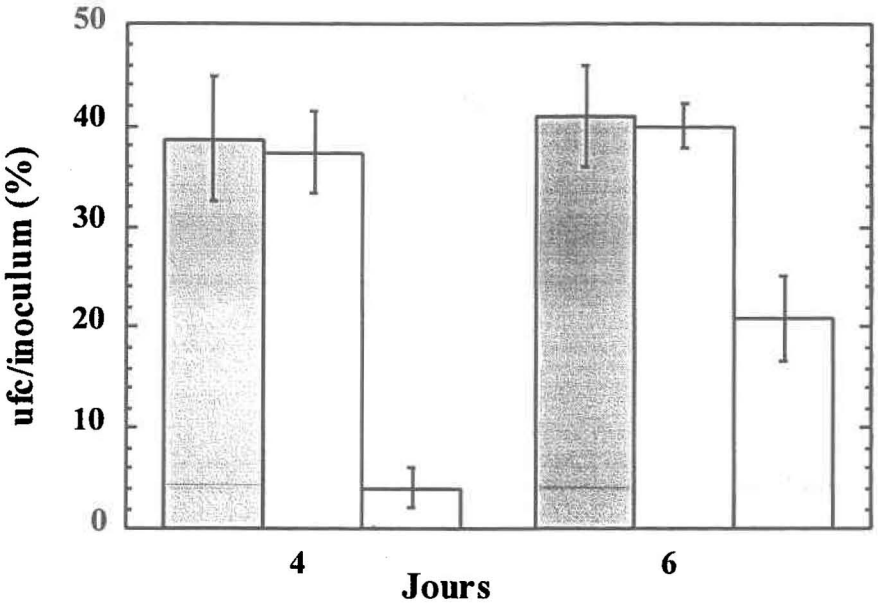


Figure 2.2 Effet des micro-organismes hétérotrophes sur l'efficacité de formation de colonies par *T. ferrooxidans* cultivé sur milieux solides comportant deux couches de gélose. La première couche de gélose a été inoculée avec *R. rubra* (▨),*T. acidophilus* (□), ou du H_2SO_4 0,01 N (□).

Sur les géloses témoin ne comportant aucune des deux espèces hétérotrophes, des efficacités de 4% et de 21% furent respectivement mesurées en quatre et six jours d'incubation (Figure 2.2). Mais pour ce qui est des géloses incorporant *R. rubra* ou *T. acidophilus*, l'efficacité s'est accrue d'un facteur de neuf au jour quatre (environ 39%) et d'un facteur de deux au jour six (environ 40%) (Figure 2.2).

Le taux de croissance maximal (μ_{max}) de *T. ferrooxidans* a été évalué en culture liquide, selon les conditions présentées au Tableau 2.3. Afin de vérifier l'effet potentiel causé par l'extrait de levure, des cultures ont été réalisées dans le MS-Fe et MS-Fe-Ye. En culture pure réalisée à 20°C, le taux de croissance maximal de *T. ferrooxidans* a été évalué à 0,036 h^{-1}. L'ajout d'extrait de levure dans le milieu MS-Fe n'a eu aucun effet significatif sur le μ_{max}, la valeur calculée étant de 0,037 h^{-1} (Tableau 2.3). Les Figures A.2 et A.3 de l'annexe A présentent les graphiques ayant servi au calcul des valeurs de μ_{max}. Pour évaluer l'effet de la levure sur le taux de croissance de *T. ferrooxidans*, on a procédé à la réalisation de cultures à 25°C, qui correspond à la température intermédiaire entre la température optimale de croissance de *T. ferrooxidans* (30°C) et la température à laquelle *R. rubra* a été

isolé (20°C). Les valeurs de μ_{max} ne se comparent donc pas avec celles décrites précédemment, car ces dernières ont été obtenues à 20°C. Lorsque *T. ferrooxidans* fut cultivé seul, son taux de croissance a été évalué à 0,060 h^{-1}. L'ajout de *R. rubra* dans le milieu a augmenté faiblement, mais significativement, le taux de croissance de *T. ferrooxidans*. En effet, le μ_{max} calculé pour la culture mixte est de 0,067 h^{-1} (Tableau 2.3). En plus d'augmenter la valeur du μ_{max}, l'ajout de *R. rubra* semble avoir nettement diminué la phase de latence de *T. ferrooxidans*. En début de croissance, cette phase de latence est difficile à évaluer, mais si on compare le temps requis pour obtenir une concentration bactérienne correspondant à la moitié de la concentration obtenue à la phase de plateau, soit environ $7x10^6$ bactéries/ml, on note une différence marquée entre la culture pure et la culture mixte (Figure 2.3). En effet, la culture pure a requis 62 heures pour atteindre cette concentration cellulaire, tandis que la culture mixte avec *R. rubra* a nécessité dix heures de moins, soit 52 heures (Figure 2.3).

Tableau 2.3 Effet des conditions de culture sur les paramètres de croissance de *T. ferrooxidans* [1].

Conditions de culture	Taux de croissance (h^{-1})	Temps de dédoublement (h)	n
20°C			
MS-Fe	0,036 ± 0,001	19,1 ± 0,7	3
MS-Fe-Ye	0,037 ± 0,001	18,8 ± 0,6	5
25°C			
MS-Fe-Ye-Glu	0,060 ± 0,002[2]	11,6 ± 0,5	3
MS-Fe-Ye-Glu + *R. rubra*	0,067 ± 0,003[2]	10,3 ± 0,4	3

1) Les valeurs sont des moyennes ± l'écart-type.
2) Ces deux valeurs sont significativement différentes (t de Student: t=-3.54441, df=4, p=0,023918).

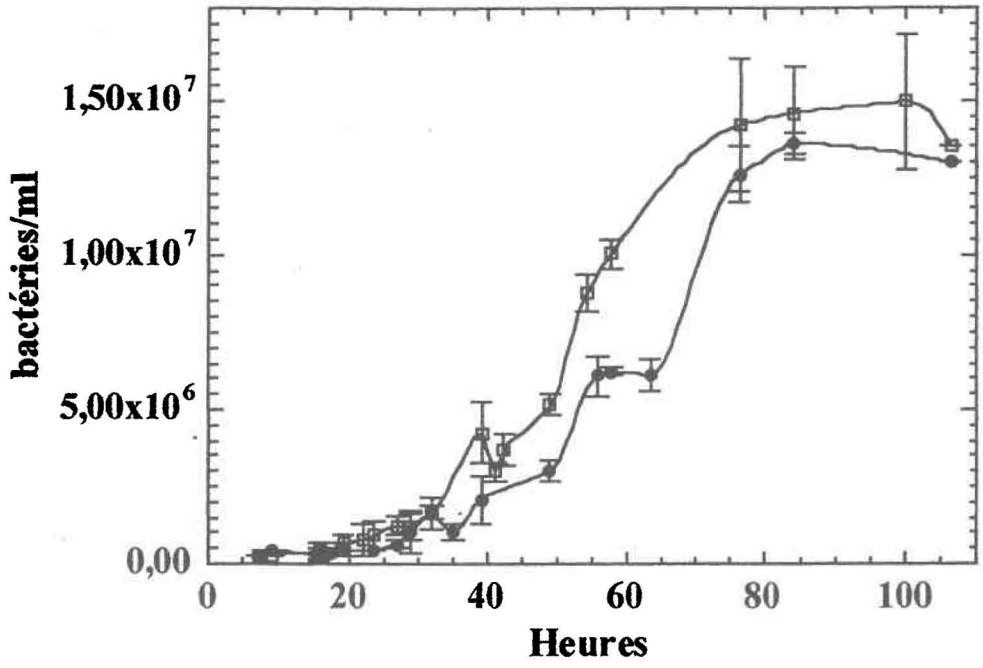


Figure 2.3 Effet de la culture mixte de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra* dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu à 25°C sur la concentration de *T. ferrooxidans*. Chaque point représente une moyenne de triplicatas ± l'écart-type. Culture pure de *T. ferrooxidans* (●); co-culture de *T. ferrooxidans* et *R. rubra* (□).

2.3.3 Effet des micro-organismes hétérotrophes sur l'oxydation du fer et l'acidification du milieu

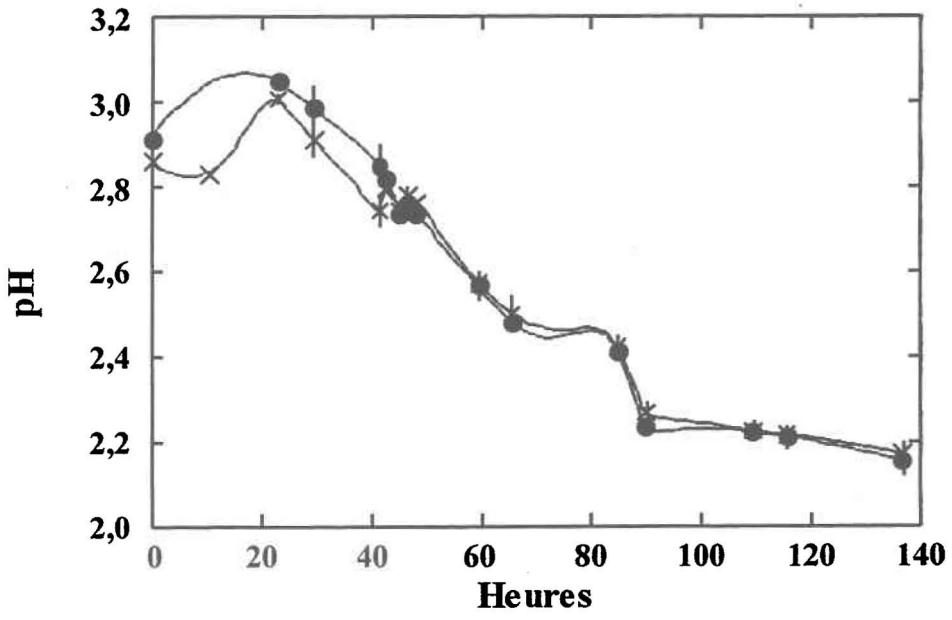
Afin de déterminer si la co-culture de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra* avait un effet sur le procédé de biolixiviation, deux des paramètres typiques de ce processus, soit le pH et l'oxydation du fer ont été suivis. Afin d'exclure la possibilité que l'extrait de levure puisse influencer le résultat, des expériences préliminaires ont été faites avec *T. ferrooxidans*, en présence et en absence d'extrait de levure. Le résultat obtenu (Figure 2.4a) indique que l'ajout d'extrait de levure n'a exercé aucun effet sur l'évolution du pH dans le milieu. Dans les deux types de milieu, le pH a atteint une valeur minimale de pH de 2,2 en 137 heures. De plus, en présence et en absence d'extrait de levure, l'épuisement du substrat s'est complété en 90 heures d'incubation (Figure 2.4b).

Cependant, lorsque *T. ferrooxidans* fut cultivé en culture mixte avec *R. rubra*, les courbes de baisse de pH et d'oxydation du fer ferreux ont été significativement modifiées (Figure

2.5a et 2.5b). Ainsi, la culture la culture mixte de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra* a amorcé plus rapidement l'abaissement du pH. Si on compare le temps requis pour atteindre un pH de 2,2 (valeur intermédiaire entre le pH initial et le pH final), la culture pure a nécéssité 90 heures, tandis que la culture mixte n'a eu besoin que de 70 heures. De plus, la culture mixte a atteint un pH final de 1,7 comparé à 1,9 pour la culture pure (Figure 2.5a).

Les courbes d'oxydation du fer ferreux sont présentées à la Figure 2.5b. Nous avons comparé les pentes correspondant à la portion linéaire de l'évolution du fer, soit la période comprise entre 24 et 55 heures d'incubation. Pour cette période, une analyse de covariance a déterminé que l'élévation des pentes est très significativement différente entre les deux types de culture ($F(1,42)=149,3415$, $p<0,001$). Ceci indique que le processus d'oxydation du fer ferreux a aussi débuté plus rapidement dans le cas de la culture mixte. Les valeurs initiales de fer ferreux mesurées sont de 7200 mg/l. Si on considère le temps requis pour oxyder la moitié du substrat énergétique, on note que la culture pure a nécessité 62 heures, tandis que la culture mixte a requis 52 heures. Le tableau 2.5 récapitule l'avantage que confère *R. rubra* au niveau des paramètres de croissance, d'acidification et d'oxydation du fer par *T. ferrooxidans*.

(a)



(b)

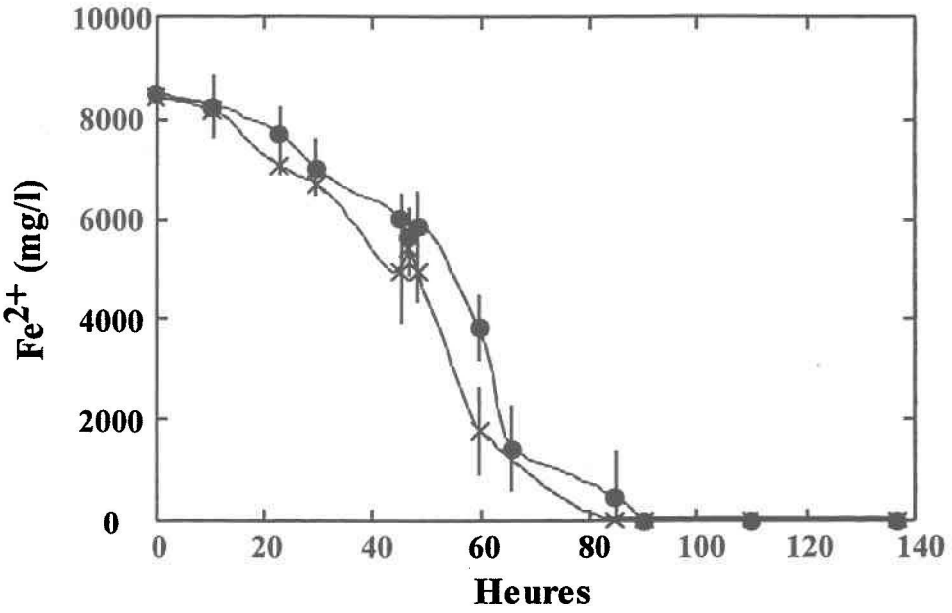


Figure 2.4 (a) Évolution du pH et (b) du fer ferreux lors de cultures pures de *T. ferrooxidans* en milieu synthétique avec et sans extrait de levure. Chaque point représente une moyenne de triplicatas ± l'écart-type. MS-Fe (●); MS-Fe-Ye (×).

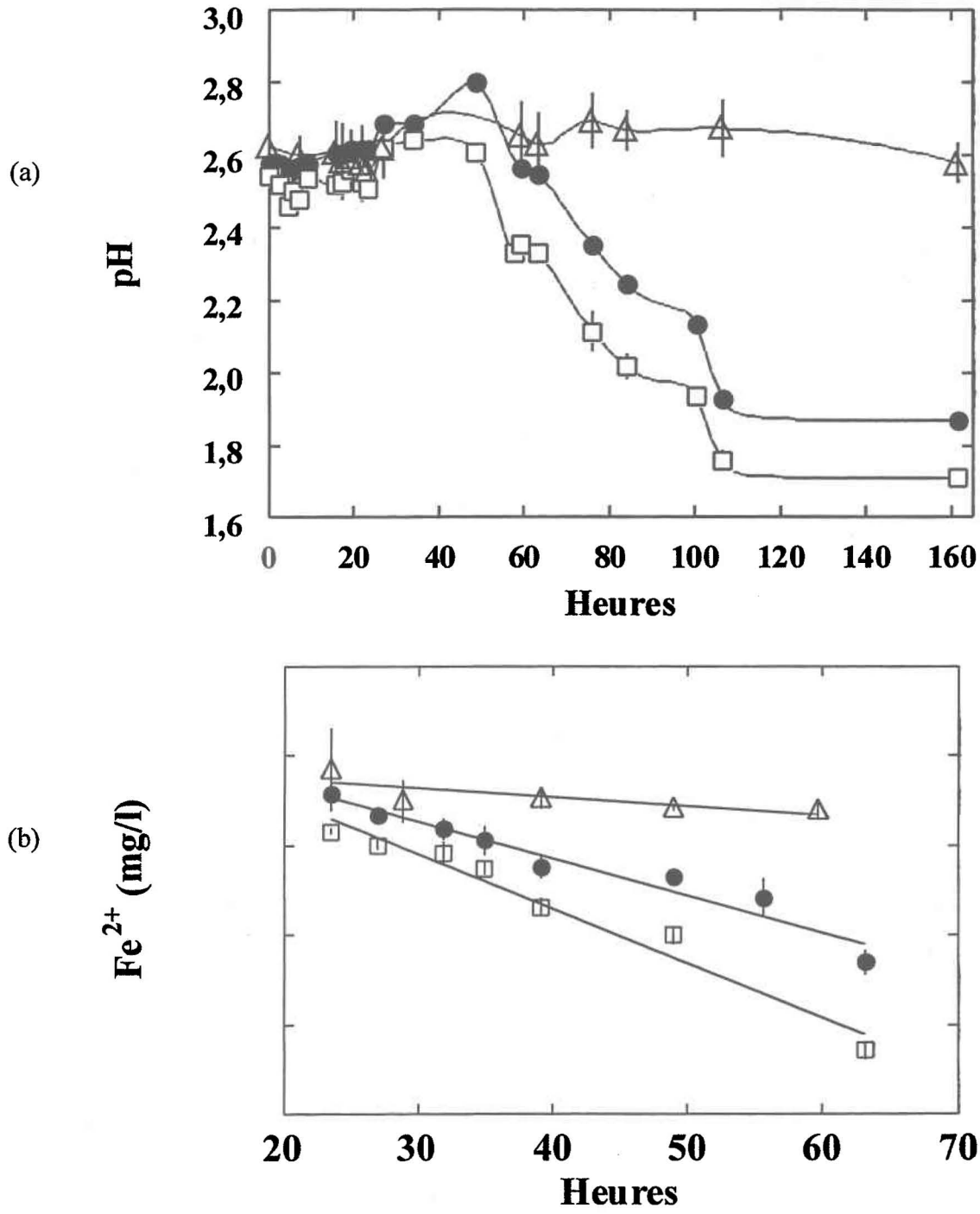


Figure 2.5 Effet de la culture mixte de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra* dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu à 25°C sur (a) le pH et (b) l'oxydation des ions ferreux. Chaque point représente une moyenne de triplicatas ± l'écart-type. Témoin sans inoculum (△); culture pure de *T. ferrooxidans* (●); co-culture de *T. ferrooxidans* et *R. rubra* (□).

Tableau 2.4 Récapitulation du rôle de *R. rubra* sur l'évolution des paramètres de biolixiviation, lors de la culture de *T. ferrooxidans* sur MS-Fe-Ye-Glu[1].

	Culture pure	Co-culture avec *R. rubra*
Heures requises pour:		
Acidifier à pH 2,2	90	70
Oxyder 360 mg Fe^{2+}	62	52
Atteindre $7X10^6$ *T. ferrooxidans*/ml	62	52

1) Le pH de 2,2 est une valeur intermédiaire entre le pH initial et final. 360 mg de Fe^{2+} correspond à la consommation de la moitié du substrat énergétique et $7x10^6$ *T. ferrooxidans*/ml correspond à environ la moitié de la concentration bactérienne maximale atteinte.

2.3.4 Effet des micro-organismes hétérotrophes lors du procédé de biolixiviation dans les boues d'épuration

Afin de déterminer le rôle des micro-organismes hétérotrophes dans le procédé de biolixiviation, les expériences de cultures pure et mixtes ont été reprises dans les boues d'épuration. Et afin de pouvoir observer le rôle de *R. rubra*, une partie des boues a été stérilisée pour tuer la communauté microbienne indigène à ce milieu. Le suivi du potentiel d'oxydoréduction (POR) a été effectué car avec la diminution du pH, il est possible d'évaluer l'efficacité du procédé. L'oxydation du fer a aussi été mesurée pour évaluer l'activité métabolique de *T. ferrooxidans*. Les résultats sont présentés aux Figures 2.6, 2.7a et 2.7b. Dans le cas des boues stérilisées non inoculées et inoculées avec *T. ferrooxidans*, plus de 90% du fer reste sous sa forme d'ion ferreux Fe^{2+} (résultat non montré). En culture pure dans ce milieu, *T. ferrooxidans* s'est donc montré incapable d'oxyder son substrat énergétique. La co-culture de *T. ferrooxidans* avec *A. cryptum* se comporte exactement de la même façon (Figure 2.6). Par contre, la Figure 2.6 montre que pour la culture de *T. ferrooxidans* dans les boues non stérilisées et sa co-culture avec *R. rubra* dans les boues stérilisées, le ratio Fe^{3+}/Fe_{total} suit une évolution de type logarithmique. En six jours d'incubation, 100% du fer se retrouve oxydé. Cependant, la co-culture de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra* dans les boues stérilisées semble avoir été plus performante que la culture menée dans les boues non stérilisées. En effet, l'obtention d'un ratio Fe^{3+}/ Fe_{total} de 50% fut atteint en 98 heures (4,1 jours) pour la co-culture avec *R. rubra* et en 118 heures (4,9 jours) pour la culture de *T. ferrooxidans*, réalisée dans les boues non stérilisées. Ceci

correspond à une avance d'une vingtaine d'heures pour la co-culture de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra*.

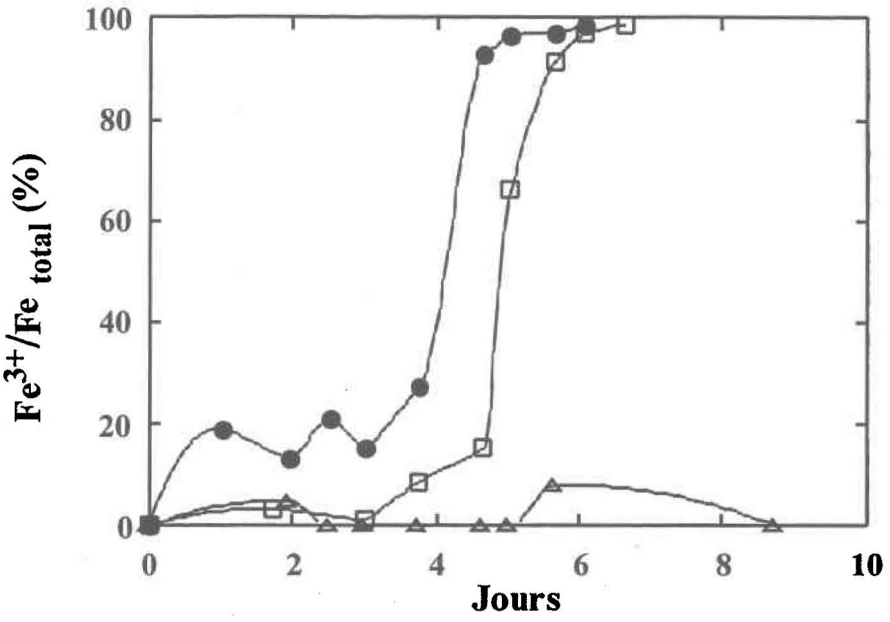
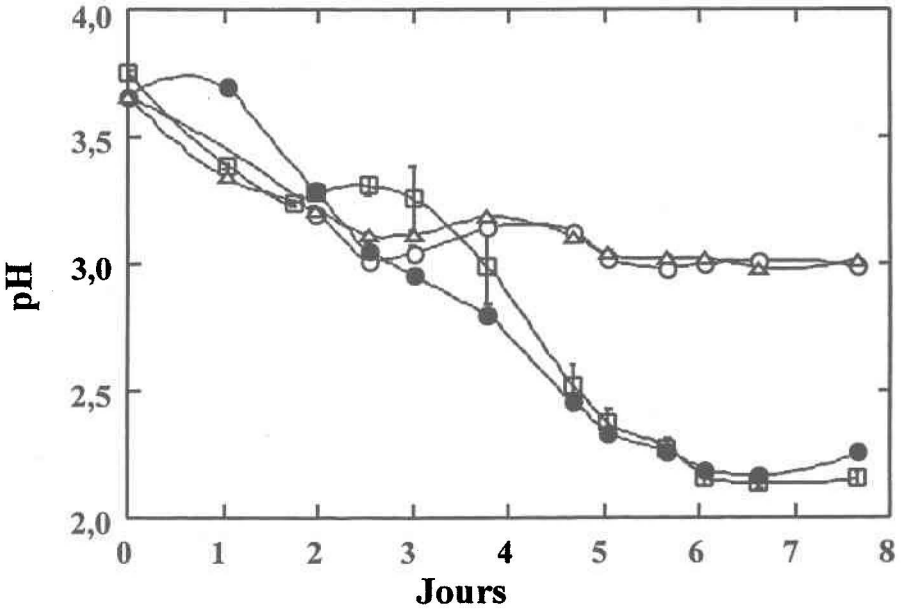


Figure 2.6 Effet de *T. ferrooxidans* cultivé dans les boues d'épuration sur le ratio Fe^{3+}/Fe_{total}. Boues stérilisées inoculées avec *T. ferrooxidans* et *A. cryptum* (Δ); Boues non stérilisées inoculées avec *T. ferrooxidans* (□); Boues stérilisées inoculées avec *T. ferrooxidans* et *R. rubra* (●).

Le suivi du pH et du potentiel d'oxydoréduction (POR) est présenté à la Figure 2.7a et 2.7b. Comme pour les boues stérilisées non inoculées (témoin négatif), les boues stérilisées et inoculées avec *T. ferrooxidans* sont caractérisées par une légère baisse du pH et la stabilisation de celui-ci à une valeur de 3,0 (Figure 2.7a). Pour ce qui est du POR, la Figure 2.7b montre que les boues stérilisées et inoculées avec *T. ferrooxidans* se sont comportées comme le témoin négatif, puisque dans les deux cas, les valeurs ne dépassent pas 350 mV. Les boues stérilisées inoculées avec *T. ferrooxidans* et *A. cryptum* se sont aussi comportées de la même façon que le témoin négatif (résultat non montré). Cependant, lorsque les boues stérilisées furent cultivées avec *T. ferrooxidans* et *R. rubra*, l'évolution du pH observée correspond à celle des conditions standard du procédé, c'est-à-dire les boues non stérilisées, inoculées avec *T. ferrooxidans* (Figure 2.7a). En effet, pour ces deux conditions expérimentales, le pH des boues a diminué continuellement et a atteint une valeur minimale de 2,1 en six jours d'incubation. Les courbes du POR sont similaires

dans les deux cas et atteignent une valeur maximale de 580 mV pour la culture de *T. ferrooxidans* dans les boues non stérilisées et de 600 mV pour les boues stérilisées inoculées avec *T. ferrooxidans* et *R. rubra*. En terme de rapidité à amorcer les conditions propices à la solubilisaton des métaux, le procédé mené avec la co-culture de *T. ferrooxidans* et *R. rubra* semble plus performant que le procédé standard. En effet, la coculture a requis 98 heures (4,1 jours) pour acidifier le milieu à pH 2,7 et 113 heures (4,7 jours) pour atteindre un POR de 500 mV. Pour ces deux paramètres, ces valeurs correspondent à une avance d'un peu plus de six heures, par rapport aux cultures de *T. ferrooxidans* réalisées dans les boues non stérilisées.

(a)



(b)

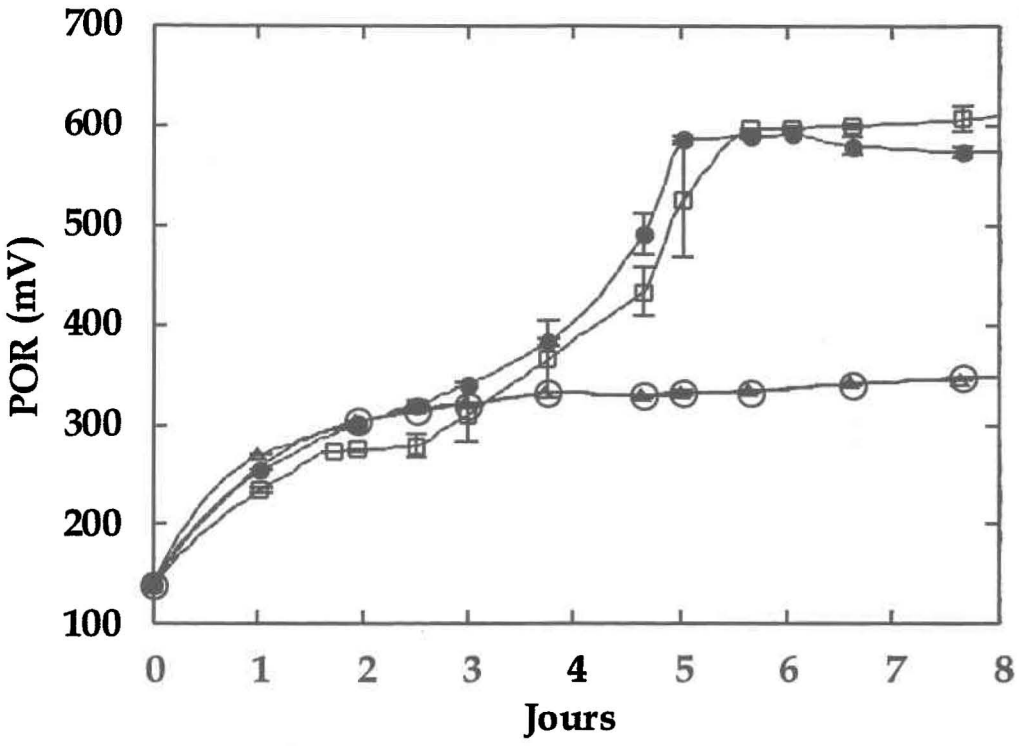


Figure 2.7 Effet de *T. ferrooxidans* cultivé dans les boues d'épuration à 20°C sur a) le pH et b) le potentiel d'oxydoréduction. Chaque point représente une moyenne de triplicatas ± l'écart-type. Boues stérilisées (Δ); Boues stérilisées inoculées avec *T. ferrooxidans* (○); Boues non stérilisées inoculées avec *T. ferrooxidans* (□); Boues stérilisées inoculées avec *T. ferrooxidans* et *R. rubra* (●).

2.4 Discussion

Les enrichissements réalisés à partir des sédiments lagunaires ont démontré que les communautés microbiennes acidophiles étaient partiellement composées de *T. ferrooxidans* et de *R. rubra*. Ce n'est pas la première fois que ces deux micro-organismes sont isolés à partir du même milieu. Des travaux ont rapporté l'isolement concomitant de ces deux micro-organismes à partir d'échantillons d'une rivière acide et riche en fer et à partir d'eau de drainage acide (López-Archilla et al. 1995; Nerkar et al. 1977). D'ailleurs, Nerkar et al. (1977) ont proposé l'existence d'une relation symbiotique entre les deux espèces puisque la levure s'est montrée capable d'annuler l'effet inhibiteur qu'exerce le pyruvate sur la solubilisation des métaux par *T. ferrooxidans*. Ces données supportent le bien-fondé d'utiliser *R. rubra* isolé à partir de sédiments, pour la réalisation des expériences visant à déterminer l'effet des organismes hétérotrophes sur la croissance et sur l'activité de biolixiviation de *T. ferrooxidans*.

Les essais de cultures réalisés sur milieux solides ont confirmé la capacité de *R. rubra* à stimuler la croissance de *T. ferrooxidans* à faible densité cellulaire. Comparé au témoin négatif, l'accroissement de l'efficacité de formation de colonies par un facteur de deux fut similaire lors de l'inoculation de la levure ou de *T. acidophilus* sur la première couche de gel. Les efficacités obtenues (40%) sont comparables à celles rapportées par Butler et Kempton (1987) (48-54%), qui ont utilisé une bactérie hétérotrophe isolée à partir d'un site d'exploitation minière. Dans des milieux préparés de façon similaire, d'autres auteurs ont aussi observé des comptes supérieurs lors de la culture de diverses souches de *T. ferrooxidans* en utilisant *T. acidophilus*, *A. cryptum*, de même qu'une souche d'*Acidiphilium* sp. (Johnson et McGinness 1991). Johnson et McGinness (1991) ont démontré que les concentrations de monosaccharides produits par l'hydrolyse acide de l'agar ou de l'agarose étaient significativement plus faibles lors de la présence d'hétérotrophes dans le milieu, ce qui supporte l'hypothèse de l'inhibition de la croissance de *T. ferrooxidans* par des composés organiques de faible poids moléculaire. Cette inhibition semblerait expliquer les très faibles efficacités de formation de colonies (<5%) observées dans ce travail, avec *T. ferrooxidans* cultivé sur milieux solides standards et l'absence totale de croissance observée par Butler et Kempton (1987), dans des conditions de culture similaires. Dans ce système de culture, il semble donc que *R. rubra* soit capable de détoxiquer le milieu de sorte que la concentration des produits inhibiteurs se situe en deçà du seuil d'inhibition pour *T. ferrooxidans*.

La culture pure de *T. ferrooxidans* en milieu liquide synthétique a révélé que l'ajout d'extrait de levure n'exerçait pas d'effet inhibiteur sur la croissance, l'oxydation du fer et l'acidification du milieu. L'ajout de glucose ne semble pas avoir non plus modifié ces paramètres, ce qui corrobore des résultats précédents (Wichlacz et Thompson 1988). En effet, le taux de croissance dans le MS-Fe-Ye-Glu obtenu est comparable à ce qui est rapporté dans la littérature, dans des conditions similaires (Huber et al. 1984; Myerson et al. 1984; LaCombe Barron et al. 1990). Le système de culture liquide, où la densité cellulaire est forte et où les transferts sont optimisés par l'agitation, explique peut-être l'absence d'effet inhibiteur de ces composés organiques, par opposition à l'important effet noté lors de la formation de colonies sur gélose.

Le taux de croissance obtenu en culture mixte avec *R. rubra* fut faiblement mais significativement supérieur à celui obtenu en culture pure. Comme le glucose ne semble pas nuire à la croissance de *T. ferrooxidans* en milieu liquide, le rôle de la levure ne pourrait être dans ce cas-ci attribuable à la détoxication du milieu. Comme mentionné précédemment, plusieurs composés pouvant être produits par des micro-organismes hétérotrophes, tels que des vitamines, des cofacteurs ou des agents chélateurs, sont autant de facteurs qui ont le potentiel de stimuler la croissance et le métabolisme de *T. ferrooxidans* (Wichlacz et Thompson 1988). Par ailleurs, le CO_2 pourrait être un des facteurs les plus importants fourni par *R. rubra,* car on a précédemment démontré que le taux de croissance de *T. ferrooxidans* était limité par la concentration de ce composé. En effet, l'enrichissement des cultures avec du CO_2 accroît le taux de croissance et/ou le métabolisme oxydatif de *T. ferrooxidans* (Holuigue et al. 1987; LaCombe Barron et Lueking 1990; Nagpal et Dahlstrom 1993). Le fait que le CO_2 est produit de façon universelle par tous les organismes hétérotrophes expliquerait la diversité des espèces qui se sont montrées capables de stimuler la croissance ou le métabolisme énergétique de *T. ferrooxidans*.

Même si la levure *R. rubra* n'a que faiblement accru le taux de croissance de *T. ferrooxidans*, elle a cependant exercé des effets plus marqués sur la diminution de la phase de latence des cultures. En effet, la culture mixte a atteint la moitié de sa concentration cellulaire maximale en dix heures de moins que la culture pure de *T. ferrooxidans*. Ce phénomène de réduction de la latence s'est aussi observé sur l'oxydation du fer et sur l'acidification du milieu, car ces deux processus se sont amorcés plus rapidement dans le

cas de la culture mixte. En effet, par comparaison à la culture pure de *T. ferrooxidans*, la culture mixte avec *R. rubra* a requis dix heures de moins pour achever l'oxydation de la moitié du fer ferreux et 20 heures de moins pour acidifier le milieu à pH 2,2.

Les résultats des expériences réalisées sur le procédé de biolixiviation des boues sont en accord avec ceux obtenus en milieu synthétique. Cependant, elles ont mis en évidence que le rôle synergique de *R. rubra* ou de la communauté microbienne des boues était essentiel pour le fonctionnement du procédé. En effet, par opposition aux expériences faites en milieu synthétique, les cultures pures de *T. ferrooxidans* dans les boues stérilisées furent incapables d'oxyder des quantités significatives de fer et d'abaisser le pH. Ce résultat met en évidence le rôle des micro-organismes hétérotrophes dans ce système. La ou les raisons expliquant pourquoi *T. ferrooxidans* n'a pu initier l'oxydation de son substrat énergétique et ce, après une période d'incubation prolongée de 87 jours (résultat non montré), reste inconnue. Cependant, les fortes concentrations de composés inhibiteurs tels que des acides organiques, ou l'importante viscosité des boues par rapport au milieu synthétique, réduisant ainsi le transfert de CO_2 dans les cultures, pourraient bien être en cause. Les résultats sont donc en accord avec les hypothèses mentionnées plus haut et attribuent aux micro-organismes hétérotrophes un rôle de détoxication du milieu et de production de CO_2 dont *T. ferrooxidans* tire avantage. L'addition de l'espèce hétérotrophe *A. cryptum* dans les cultures de *T. ferrooxidans* n'a pas permis le démarrage du procédé. Mais compte tenu que cette espèce est, tout comme *T. ferrooxidans*, intolérante à de faibles concentrations de composés organiques, *A. cryptum* n'est vraisemblablement pas capable de se développer dans les boues (Harrison, 1981).

Lors des expériences faites sur le procédé de biolixiviation, nous avons observé que l'acidification et l'oxydation du fer s'amorçaient plus rapidement lorsque *T. ferrooxidans* était cultivé avec *R. rubra* dans les boues stérilisées, que lorsque les cultures étaient réalisées dans les boues non stérilisées. Il faut mentionner que la stérilisation des boues par autoclave a pu engendrer l'hydrolyse de certains composés organiques complexes en composés plus simples, facilement assimilables par *R. rubra*. Toutefois, l'avance de six heures indique que l'inoculation de *T. ferrooxidans* et de *R. rubra* pourrait significativement accroître l'efficacité du procédé. En effet, lorsque d'importants volumes doivent être traités, la diminution du temps de rétention a un impact majeur sur la réduction des coûts de traitement. Le consortium composé de ces deux espèces pourrait aussi accroître l'efficacité des procédés d'extraction biologique des métaux.

Dans l'ensemble, la communauté microbienne des boues s'est montrée essentielle au fonctionnement du procédé. Des colonies produisant un pigment rose ont été isolées, suggérant la présence de *Rhodotorula sp.* dans les boues en traitement (résultat non montré). Cette étude élargit nos connaissances quant à l'association naturelle de *Rhodotorula sp.* avec *T. ferrooxidans*. Cependant, le procédé de biolixiviation pourrait être aussi le résultat de l'activité de plusieurs autres populations microbiennes, impliquées dans divers processus, tels que les réactions d'oxydation et de réduction du fer et du soufre, la minéralisation de la matière organique, etc.

L'analyse de la diversité de la flore microbienne des boues devrait nous permettre de mieux comprendre le fonctionnement du procédé et l'extrapolation des résultats devrait apporter plus d'informations quant aux relations écologiques de ces espèces en milieu naturel. Afin de réaliser cette analyse de la diversité, nous avons opté pour une approche de biologie moléculaire, basée sur l'analyse de la diversité du gène codant pour l'ARNr 16S. Cependant, le choix d'une telle approche nécessitait la mise au point et la validation de techniques utilisables avec des échantillons provenant d'un milieu aussi complexe que les boues d'épuration. Ces travaux font l'objet du chapitre III.

CHAPITRE III: DÉVELOPPEMENT DE TECHNIQUES MOLECULAIRES POUR L'ANALYSE DE LA DIVERSITE BACTÉRIENNE DANS LES BOUES D'EPURATION

3.1 Introduction

Comme le démontrent les résultats présentés au chapitre II, *T. ferrooxidans* n'est pas le seul micro-organisme impliqué dans le procédé de biolixiviation. Même en milieu fortement acide, il semble persister une ou plusieurs populations microbiennes actives. Il est vraisemblable qu'en rendant le milieu moins toxique et en produisant du CO_2, ces populations jouent de façon non spécifique un rôle synergique sur la croissance de *T. ferrooxidans.* La caractérisation de ces populations était le prochain objectif de ce travail. Mais comme peu d'études ont porté sur l'investigation de la diversité microbienne dans les boues d'épuration et dans des milieux similaires, le mise au point des méthodes et la validation de celles-ci constituaient des étapes préalables essentielles.

La revue de littérature faisait état des biais majeurs inhérents aux techniques de culture lorsqu'elles sont appliquées à l'évaluation de la diversité microbienne en milieu naturel. Dans un procédé de traitement des eaux par des boues activées, l'hybridation moléculaire de populations bactériennes avec des sondes spécifiques à l'ARNr 16S a mis en évidence que la culture préalable sur milieux riches favorisait la détection de Protéobactéries de la subdivision γ (taxon qui englobe les coliformes), au détriment des Protéobactéries de la subdivision β, qui sont en réalité présentes en plus grand nombre (Wagner et al. 1993). L'hybridation avec des sondes ribosomales spécifiques à d'autres groupes taxonomiques tels que les *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* et les bactéries Gram positives a aussi montré que la pression sélective engendrée par la culture tendait à supprimer ces groupes (Manz et al. 1994). Les travaux antérieurs visant à connaître la composition microbienne dans des procédés de traitement biologique des eaux usées ont été pour la plupart basés sur la détection de groupes taxonomiques spécifiques, celle-ci étant réalisée soit avec des anticorps (Howgrave-Graham et al. 1988; Brigmon et al. 1995; Watanabe et Hino 1996), mais surtout avec des sondes moléculaires (Wagner et al. 1993; Manz et al. 1994; Wallner et al. 1995; Rosello-Mora et al. 1995; Mobarry et al. 1996; de los Reyes 1997). Cette approche est fort

utile lorsqu'il s'agit de détecter un ou plusieurs micro-organismes à l'intérieur d'un consortium donné, mais elle ne fournit qu'une vision partielle de la diversité. Le clonage et le séquençage de fragments de gène 16S amplifiés par PCR et provenant d'échantillons environnementaux a été réalisé pour l'étude de la diversité des bactéries dans le sol (Liesack et Stackebrandt 1992), dans le milieu aquatique (Giovannoni et al. 1990; Schmidt et al. 1991; DeLong et al. 1993; Ekendahl et al. 1994) et dans le procédé de traitement des eaux usées par boues activées (Blackall 1989a; Blackall et al. 1993; Bond et al. 1995). Cependant, on ne peut avoir une idée au sujet de la diversité qu'après avoir analysé la séquence d'un nombre important de clones.

Dans le but d'aborder l'étude de communautés microbiennes de façon plus globale, la technique du DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) initialement développée par Fischer et Lerman (1979a et 1979b), a été appliquée par Muyzer et al. (1993), pour séparer un mélange des fragments différents d'ADNr 16S. En effet, en amplifiant par PCR un extrait d'ADN provenant d'un biofilm anaérobie, ces auteurs ont été en mesure d'obtenir un indice de la diversité bactérienne. Le principe de cette technique d'électrophorèse est basé sur la théorie de la fusion de l'ADN et permet la séparation de fragments d'ADN de même longueur, en fonction de leur composition (Fischer et Lerman 1983). Les fragments d'ADN double-brin migrent dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient ascendant d'agents dénaturants. Lorsqu'un fragment atteint une distance telle que la concentration d'agents dénaturants correspond à la température de fusion de son domaine de fusion le moins stable (déterminée par sa teneur en guanine et cytosine), la molécule subit une dissociation partielle dans cette région. Cette dissociation partielle engendre un changement de conformation de la molécule, qui ralentit nettement son parcours dans la matrice formée par le gel. L'ajout aux fragments à analyser, d'une queue riche en guanine et cytosine longue d'une quarantaine de nucléotides accroît le pouvoir de résolution et la sensibilité de cette technique, permettant la séparation de fragments ne différant que d'une paire de base (Myers et al. 1985; Sheffield et al. 1989). Tel que décrit précédemment, cette queue riche en guanine et cytosine peut être incorporée à une des amorces, lors de l'amplification de gènes bactériens par la réaction de la polymérase en chaîne (PCR). Ainsi, le nombre de fragments obtenus sur DGGE reflétera la diversité (Muyzer et al. 1993). Depuis, plusieurs travaux ont rapporté l'utilisation de cette technique pour étudier la diversité bactérienne dans différentes communautés microbiennes. Dans tous les cas, la diversité observée s'est avérée beaucoup plus importante que celle révélée par les méthodes de culture (Wawer et Muyzer 1995; Santegoeds et al. 1996; Ferris et al. 1996; Murray et al. 1996; Teske et al. 1996; Ferris et Ward 1997; Kowalchuk et al. 1997).

Dans ce chapitre, l'application des méthodes de PCR et de DGGE pour l'analyse de la diversité bactérienne dans les boues d'épuration est présentée. Cependant, comme cette procédure n'a jamais été appliquée à l'analyse des boues, plusieurs contrôles devaient être effectués pour s'assurer de la validité des résultats. Même si la composition des boues d'épuration peut à la limite être assimilée à celle des boues activées, plusieurs composés comme des métaux et de la matière organique réfractaire se concentrent dans les boues décantées, tel que discuté au chapitre I. Ces composés pourraient interférer avec l'analyse de l'ADN. Par exemple, la matière organique renferme des acides humiques, qui sont constitués de noyaux phénoliques, reconnus pour dénaturer plusieurs enzymes utilisées en biologie moléculaire (Tsai et Olson 1992a; Tebbe et al. 1993; Young et al. 1993; Straub et al. 1994). Et puisque les méthodes de culture sont délaissées à cause des biais méthodologiques qu'elles entraînent, chaque étape nécessaire à l'analyse moléculaire des populations bactériennes devra être scrupuleusement contrôlée pour s'affranchir des artefacts propres à cette approche (Farelly et al. 1995). Pour investiguer la diversité bactérienne dans des milieux complexes tels que des sols ou des sédiments, plusieurs auteurs ont recommandé qu'une attention particulière soit portée sur les étapes de lyse cellulaire, d'extraction et de purification des acides nucléiques (Tsai et Olson 1991, 1992a; Tebbe et al. 1993; Moré et al. 1994).

En premier lieu, nous présentons l'adaptation d'une technique initialement développée pour extraire et purifier l'ADN à partir de sédiments aquatiques, pour l'analyse des bactéries dans les boues d'épuration (Moré et al. 1994). Cette technique a été contrôlée pour son efficacité à extraire l'ADN provenant de bactéries ayant des parois particulièrement résistantes, comme des espèces Gram positives et pour son efficacité à recouvrer l'ADN provenant de faibles concentrations cellulaires. Ces paramètres d'efficacité d'extraction et de purification de l'ADN ont été mesurés indirectement, par l'amplification d'une partie du gène codant pour l'ARNr 16S.

Ensuite, la mise au point de la technique de DGGE a été effectuée pour permettre la séparation de fragments d'ADNr 16S amplifiés à partir des genres *Thiobacillus* et *Acidiphilium*. Et afin de valider l'utilisation de ces techniques pour l'étude de la diversité dans les boues, des communautés bactériennes artificielles composées de une à cinq espèces ont été inoculées dans les boues. Celles-ci ont été analysées par les techniques d'extraction et d'analyses moléculaires ci-haut mentionnées. Enfin, comme le but ultime vise l'identification de chacune des populations bactériennes impliquées dans le procédé de biolixiviation, nous

avons analysé la séquence des produits de PCR de quelques espèces, afin de déterminer si la région d'ADNr 16S amplifiée fournit assez d'informations pour permettre une telle identification.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Micro-organismes et milieux de culture

3.2.1.1 Espèces bactériennes

Les espèces bactériennes utilisées pour la mise au point des techniques moléculaires sont regroupées au Tableau 3.1. Les souches de *T. ferrooxidans* et la souche isolée à partir de sédiments lagunaires ont été cultivées dans le milieu MS-Fe selon les conditions spécifiées au chapitre II (Harrison 1984). *T. acidophilus* et *Acryptum* ont été cultivées dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu, décrit au chapitre II. *E.coli* a été cultivé dans le milieu LB (tryptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 5 g/l). *Staphylococcus sp.* a été cultivé dans un bouillon dextrose (10 g/l peptone de caséine, 5 g/l NaCl, 5 g/l glucose) et *P. aeruginosa* a été cultivé dans un milieu protéose-peptone (2 g/l peptone, 2 g/l hydrolysat de soya, 5 g/l extrait de levure, 5 g/l NaCl). Les autres espèces ont été cultivées dans les milieux et les conditions recommandés par l'ATCC (American Type Culture Collection), soit milieu ATCC 152 pour *T. intermedius*, milieu ATCC 561 pour *E. aerogenes*, milieu ATCC 3 pour *Staphylococcus sp.* et milieu ATCC 22 pour les 2 espèces de *Bacillus*. Des cellules congelées de *Thiobacillus* thermophiles, soit *T. tepidarius* et *T. thermosulfatus* ont gracieusement été fournis par Frédéric Shooner (à l'époque étudiant au doctorat à l'INRS-Eau).

3.2.1.2 Espèces de levures

Dans des travaux préliminaires, les espèces de levures *Rhodotorula glutinis* et *Rhodotorula rubra* ont été utilisées pour valider les techniques d'extraction et de PCR. *R. rubra* fut isolé à partir de sédiments lagunaires tel que décrit à la section 2.2.2 et *R. glutinis* nous a été procuré par Luc Trudel du Département de Biochimie de l'Université Laval. Ces levures ont été cultivées dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu détaillé à la section 2.2.1.

3.2.2 Extraction et purification d'ADN

3.2.2.1 Bactéries cultivées en milieu synthétique

Pour les espèces cultivées en milieu synthétique, l'ADN génomique servant à l'amplification par PCR était le plus souvent obtenu par 4 cycles successifs de gel et de dégel (de l'azote liquide à un bain à 55°C) des culots cellulaires lavés, ou en suivant un protocole standard de préparation d'ADN génomique tel que décrit précédemment (Ausubel et al. 1994). Brièvement, le culot provenant de 1,5 ml d'une suspension bactérienne cultivée à saturation était resuspendu à 567 µl de TE et soumis à une étape de lyse cellulaire, avec des

concentrations finales de 0,5% de SDS et de 100 µg/ml de protéinase K, pendant une heure à 37°C. Un volume de 100 µl de NaCl 5 M et 80 µl CTAB (solution 10%, préparée dans du NaCl 0,7 M) étaient ajoutés. Le CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide), induit une précipitation sélective des débris cellulaires, particulièrement efficace pour l'enlèvement des exopolysaccharides bactériens. Après des extractions au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:25:1), l'ADN de haut poids moléculaire était précipité avec de l'isopropanol, lavé avec de l'éthanol 70% (vol/vol) et resuspendu dans du TE (Tris-Cl 10 mM [pH 7,4], EDTA 1 mM [pH 8,0]).

Tableau 3.1. Souches bactériennes utilisées pour la mise au point des techniques moléculaires.

Affiliation	Espèce	Souche
Protéobactéries		
subdivision α	*Thiobacillus acidophilus*	ATCC 27807
	Acidiphilium cryptum	ATCC 33463
subdivision β	*Thiobacillus ferrooxidans*	ATCC 19859
	Thiobacillus ferrooxidans	ATCC 23270
	Thiobacillus ferrooxidans	ATCC 13598
	Thiobacillus ferrooxidans	ATCC 13661
	Thiobacillus ferrooxidans	sédiments
	Thiobacillus intermedius[1]	ATCC 15466
	Thiobacillus tepidarius	ATCC 43215
	Thiobacillus thermosulfatus	ATCC 51520
subdivision γ	*Escherichia coli*	ATCC 47000
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 10145
	Enterobacter aerogenes	ATCC 13048
Bactéries gram positives	*Staphylococcus sp.*[2]	ATCC 155
	Bacillus megaterium	ATCC 9885
	Bacillus subtilis	ATCC 6051

1) L'affiliation de cette espèce n'est pas encore confirmée par la séquence complète de son ADNr 16S.
2) Ces souches ont été gracieusement fournies par Luc Trudel du Département de Biochimie de l'Université Laval.

3.2.2.2 Bactéries ajoutées aux boues d'épuration

Les analyses faites à partir des boues d'épuration ont été réalisées en utilisant un échantillon de boues secondaires provenant de la station de traitement de Beauceville, dilué à 2% de solides (poids/vol) et stérilisé tel que décrit au chapitre II. Les boues ont été conservées en conditions stériles à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation. Des espèces bactériennes

furent ajoutées aux boues et l'extraction de l'ADN fut réalisée selon la technique précédemment décrite par Moré et al. (1994) avec les modifications suivantes. Un volume de 1 ml de boues était centrifugé à 12,000 x g pendant 3 minutes. Le culot était lavé avec du tampon phosphate 100 mM (pH 8,0) et resuspendu dans 1 ml de ce tampon. La lyse des cellules débutait par 4 cycles successifs de gel et de dégel, tel que décrit ci-haut Puis, un volume de 0,66 ml d'une solution de NaCl 100 mM, Tris 500 mM [pH 8,0], SDS 10% (poids/vol) était ajouté (concentration finale de SDS de 4%) et les échantillons étaient soumis à une agitation vigoureuse au vortex pendant 5 minutes, en présence d'un poids équivalent de billes de zirconium et de silice, de 0,1 mm de diamètre, préalablement stérilisées (BioSpec Products). Le surnageant était par la suite obtenu par centrifugation à 12,000 x g pendant 3 minutes et était mélangé dans une proportion de 5:2 à de l'acétate d'ammonium 7,5 M. Ce mélange était incubé 5 minutes à 4°C, puis centrifugé à 12,000 x g pendant 3 minutes. Le surnageant était ensuite mélangé avec unvolume d'une solution de NaI 7,2 M, DTT 20 mM, phosphate de sodium 0,1 M (pH 6,0) et appliqué sur une colonne SpinBind (FMC BioProducts) dont la membrane de silice a la propriété de retenir l'ADN. La colonne était ensuite lavée à 3 reprises avec 450 µl d'une solution composée de 2 volumes de Tris-EDTA (Tris-HCl 50 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM) et de 8 volumes d'éthanol absolu, maintenue à -20°C. Finalement, l'ADN purifié était élué dans 30 µl d'eau à 65°C.

3.2.2.3 Levures cultivées en milieu synthétique et ajoutées aux boues d'épuration

Que ce soit à partir de cultures en milieu synthétique ou suite à leur ajout aux boues stérilisées, l'ADN provenant des souches de *R. rubra* et de *R. glutinis* a été extrait et purifié selon le protocole décrit à la section 3.2.2.2. Cependant, des billes de 0,5 mm de diamètre ont été utilisées pour détruire la paroi de ces cellules de taille supérieure, tel que recommandé par le fabricant (BioSpec Products). Comme pour l'ADN bactérien, la purification a été faite en utilisant le système de SpinBind selon le protocole détaillé à la section précédente.

3.2.3 Amplification par PCR

3.2.3.1 Amplification universelle des bactéries

La région variable V3 de l'ADNr 16S du domaine *Bacteria* a été amplifiée par PCR (Saiki et al. 1988) tel que schématisé à la Figure 3.1. Les amorces p3 et p2 décrites par Medlin et al. (1988), amplifient un fragment compris entre la position 341 et 534 selon la numérotation de *E. coli*. L'ajout à l'extrémité 5' de l'amorce p3 d'une séquence riche en guanine et cytosine, longue de 40 nucléotides, faisait en sorte que la longueur totale des fragments générés était de 233 pb. La séquence des amorces était la suivante: p2: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3';

p3: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGG-AGGCAGCAG-3'. Comme ces amorces sont universelles pour toutes les bactéries, il était important de se prémunir contre la contamination, tant au niveau des instruments (pipettes, embouts munis de filtres et tubes), que des solutions, lesquelles étaient préparées stérilement, aliquotées en petits volumes pour usage unique et conservées à -20°C. Les réactions ont été réalisées dans un volume total de 50 µl et comprenaient 250 ng d'ADN purifié ou un volume d'extrait correspondant à une concentration cellulaire déterminée (cf. section 3.3.3.3) ou 1 µl d'extrait de cellules lysées, 50 pmol de chaque amorce (Oligo Etc.), 200 µmol de chaque désoxyribonucléotide (dNTP) (Pharmacia), 5 µl de tampon de PCR 10x (Tris-HCl 100 mM [pH 9,0], MgCl 15 mM, KCl 500 mM, gélatine 0,1% [poids/vol] et Triton X-100 1% [vol/vol], Boehringer Manheim) et une goutte d'huile minérale stérilisée (Muyzer et al. 1993). Les réactions étaient faites dans un thermocycleur programmable (Perkin Elmer Cetus) et afin de minimiser l'hybridation non spécifique des amorces sur l'ADN génomique, les échantillons étaient d'abord dénaturés à 94°C pendant 5 minutes et la température était abaissée à 80°C avant l'ajout de 0,25 U de *Taq* ADN polymérase (Boehringer Manheim). La température d'hybridation était fixée à 57°C, soit 2°C de plus que décrit précédemment et 3 cycles d'amplification supplémentaires étaient réalisés, pour un total de 33 cycles, selon le protocole suivant: dénaturation (1 minute à 94°C), hybridation (1 minute à 57°C), élongation (1 minute à 72°C), avec une période d'incubation supplémentaire de 7 minutes à 72°C, pour permettre l'élongation finale des fragments.

Les produits de PCR étaient conservés à 4°C jusqu'à leur analyse sur gel d'agarose (Seakem, GTG) 1,5% (poids/vol) préparé dans du tampon TBE 1x (Tris 89 mM [pH 8,0], acide borique 89 mM, Na_2-EDTA 2 mM). Les échantillons étaient dilués 5:1 dans un "tampon échantillon" (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25%, glycérol 30%), chargés dans les puits et soumis à un voltage constant de 100 mV. La solution de "100 pb DNA ladder" (Gibco BRL), qui produit 15 bandes s'échelonnant de 100 pb à 1500 pb et qui augmente par tranches de 100 pb, fut utilisée comme marqueur de poids moléculaire. Les gels étaient colorés avec une solution de bromure d'éthidium, rincés avec de l'eau déminéralisée et photographiés, sous illumination avec des rayons U.V.

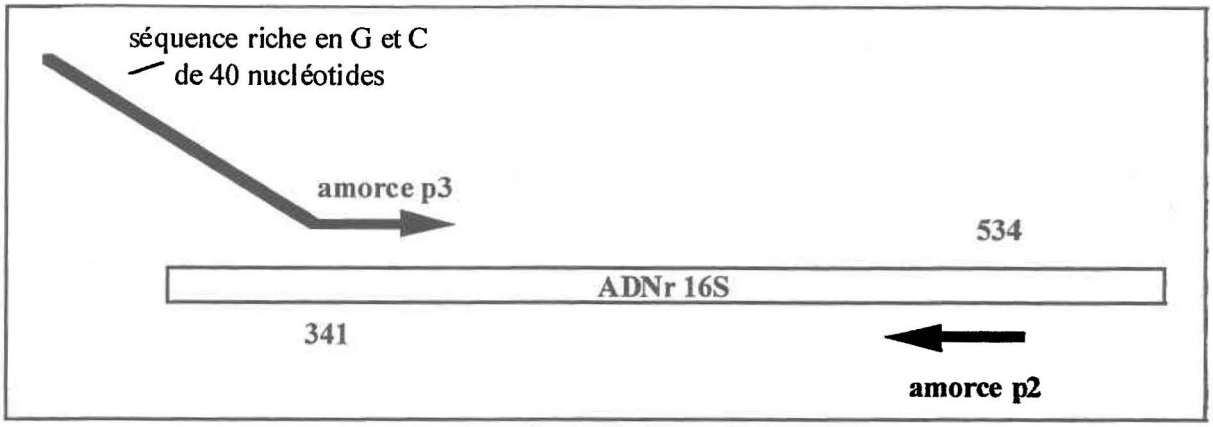


Figure 3.1 Schéma représentant la portion de la région variable V3 du gène codant pour l'ARNr 16S de *E. coli*, ciblée pour l'amplification universelle des bactéries par PCR. D'après Muyzer et al. 1993.

3.2.3.2 Vérification de l'efficacité de détection des espèces Gram positives dans les boues

L'efficacité de l'extraction d'ADN provenant de bactéries ajoutées aux boues stérilisées a été vérifiée pour les espèces Gram positives, par comparaison à un témoin Gram négatif. Pour ce faire, l'ADN a été extrait tel que décrit à la section 3.2.2.2, à partir de $3x10^6$ cellules/ml de *T. ferrooxidans*, *B. subtilis*, *B. megaterium* et de *Staphylococcus sp.* ajoutées aux boues. L'ADNr 16S des extraits a été amplifié par PCR et les produits ont été vérifiés sur gel d'agarose tel que décrit à la section 3.3.3.1.

3.2.3.3 Vérification de la limite de détection des bactéries dans les boues

Dans le but d'estimer la limite de détection des bactéries dans les boues, des quantités croissantes de bactéries ont été ajoutées à des échantillons de boues stérilisées et l'ADN a été extrait tel que décrit à la section 3.2.2.2. Par la suite, les extraits ont été amplifiés en suivant le protocole de PCR décrit à la section 3.3.3, en utilisant un volume d'extrait correspondant à des concentrations de $3x10^0$ à $3x10^6$ cellules/ml de *T. ferrooxidans*, de *P.aeruginosa* et de *B. subtilis*, en assumant que la totalité des cellules avait été lysée.

3.2.3.4 Essais préliminaires pour la détection des levures

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 18S a été réalisé pour les souches de *R. rubra* et *R. glutinis* provenant de cultures en milieu synthétique, ou suite à leur ajout dans des boues d'épuration stérilisées. L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant les amorces NS51 et NS61 décrites précédemment: NS51, 5'-GGGGGAGTATGGTCGCAAGGC-3'; NS61, 5'-TCAGTGTAGCGCGCGTGCGGC-3' (Simon et al. 1992). Les réactions étaient faites dans

un volume total de 20 µl en utilisant 1 µl d'extrait cellulaire dilué 1:50, 1 pmol de chaque amorce, 200 µmol de chaque dNTP (Pharmacia), 2 µl de tampon de PCR 10x (Boehringer Mannheim) et une goutte d'huile minérale stérilisée. Après un cycle de dénaturation de 5 minutes à 95°C, 0,25 U de *Taq* ADN polymérase était ajoutée à 80°C et le programme de température, modifié à partir de celui de Simon et al. (1992) était le suivant: dénaturation (2 minutes à 95°C pour le 1er cycle et 35 sec. à 96°C pour les autres), hybridation (55 sec. à 53°C) et polymérisation (35 sec. à 72°C pour les 14 1ers cycles, 2 minutes à 72°C pour les 11 cycles suivants et 3 minutes à 72°C pour les 15 derniers cycles).

3.2.4 Optimisation du DGGE

Le protocole de DGGE a été modifié de celui de Muyzer et al. (1993), et inclut plusieurs détails techniques décrites par Myers et al. (1987). Un gradient linéaire ascendant, s'échelonnant de 15 à 55% d'urée (Gibco BRL) et de formamide (Sigma) était incorporé dans un gel de polyacrylamide de 8% de 14 cm de long et de 0,75 mm d'épaisseur (100% d'urée= 7M et 100% de formamide solution= 40% (vol/vol) deionisée avec la résine AG501-X8 (Bio-Rad)). Pour ce faire, deux solutions comportant 0% et 100% de dénaturants étaient préparées tel qu'indiqué au tableau 3.2, filtrées sur papier, désaérées et refroidies au moins 30 minutes à 4°C. Le gradient était formé par le mélange graduel de la solution sans agent dénaturant à la solution contenant l'urée et la formamide, cette dernière étant maintenue sous agitation constante. Ce mélange était réalisé à l'aide d'un montage comportant deux chambres reliées par un tube. Un volume de 36 ml de la solution concentrée était pompée dans un contenant, faisant en sorte que sa concentration atteigne 55%. À ce moment, le gel était coulé entre les deux vitres du système Protean II (Bio-Rad), à l'aide d'une aiguille de 18 cm (Bio-Rad). Tel que recommandé précédemment, un faible débit était utilisé (environ 5 ml/min.) faisait en sorte que le gel était coulé en plus de 5 minutes (Myers et al. 1987). Afin de ne pas perturber la linéarité du gradient par l'insertion d'un peigne de téflon, le gel de résolution était superposé par un second gel ne contenant aucun agent dénaturant et servant à la formation des puits. Tel que recommandé par Myers et al. (1987), la séparation optimale des fragments ne pouvait être obtenue que si la température et le pH étaient maintenus les plus constants possible. Ainsi, le gel était totalement immergé dans le réservoir rempli de 4 l de tampon TAE 1x, lequel était maintenu sous agitation magnétique et recirculé de bas en haut du gel, à l'aide d'une pompe péristaltique. Comme le système de circulation interne de l'appareil Protean II ne permettait pas l'obtention d'une température constante dans le réservoir de tampon, le réservoir était immergé en entier dans un bain-marie. Le gel était soumis à une pré-électrophorèse de 30 minutes à 100 mV et lorsque la température du

tampon se stabilisait à 60°C, les échantillons (25-40 µl) étaient chargés dans les puits, soumis à 100 mV jusqu'à leur entrée dans le gel de résolution, après quoi un voltage constant de 200 mV était appliqué pour une durée de 90 minutes. Les gels étaient ensuite colorés avec une solution de bromure d'éthidium, rincés avec de l'eau déminéralisée et photographiés sous illumination avec des rayons U.V.

Tableau 3.2 Composition des solutions pour le DGGE.

	Gel de résolution 8% acrylamide		**Gel supérieur** 5% acrylamide
% de dénaturants:	0	100	0
Solutions stocks			
Acrylamide/Bisacrylamide 38:1 (ml)	8,4	8,4	1,3
TAE 10X[1] (ml)	2,0	2,0	0,5
Urée (g)	—	16,0	—
Formamide 40% (ml)	—	16,8	—
APS 10%[2] (µl)	133	133	50
Temed[3] (µl)	13,3	13,3	10,0
Eau déminéralisée jusqu'à (ml):	40,0	40,0	10,0

1) TAE 10x: Tris base 0,4 M, acétate de sodium 0,2 M, Na_2-EDTA 0,01 M (pH 7,4).
2) APS: persulfate d'ammonium 10% (poids/vol).
3) *N, N, N', N'*-tétraméthylélthylènediamine.

3.2.5 Clonage et séquençage des produits de PCR

Les produits de PCR formés avec l'ADN des souches de *E. coli*, *T. ferrooxidans*, *T. acidophilus*, *A. cryptum* ainsi qu'avec la souche de *T. ferrooxidans* isolée à partir de sédiments, ont été clonés dans le vecteur pBlueScript (Stratagene). Pour ce faire, les produits de PCR furent découpés à partir d'un gel d'agarose et purifiés à l'aide du kit commercial GeneClean (Bio-101) selon le protocole du manufacturier, avec les modifications suivantes. Les bandes d'agarose furent incubées dans un bain à 55°C jusqu'à ce qu'elles fondent et 5 ml de la solution de NaI commerciale, puis 20 µl de billes de silice étaient ensuite ajoutés. Les solutions étaient alors incubées 20 minutes sur de la glace. Ensuite, les billes de silice liant l'ADN étaient récupérées par centrifugation, lavées 3 fois tel que recommandé par le fabricant et l'ADN était élué dans un volume minimal d'eau stérile ou de TE, à 55°C. Tel que recommandé par Kanungo et Pandey (1993), les fragments furent ensuite soumis à une réaction de la T4 polynucléotide kinase (Gibco BRL) pour la phosphorylation de leurs

extrémités 5' selon la procédure décrite précédemment (Ausubel et al. 1994). La concentration des fragments fut estimée sur gel d'agarose, par comparaison avec des quantités connues d'ADN du phage λ, digéré avec les enzymes *Eco* RI (Gibco BRL) et *Hind* III (Gibco BRL). En parallèle, le vecteur pBlueScript fut linéarisé par digestion avec l'enzyme *Eco* RV (Gibco BRL) et pour éviter qu'il ne se referme sans incorporer de fragment, son extrémité 5' fut déphosphorylée avec l'enzyme CIP (calf intestine phosphatase, Gibco BRL), tel que décrit précédemment (Ausubel et al. 1994). La préparation de vecteur fut soumise à une extraction au phénol et sa concentration fut dosée sur gel d'agarose, par comparaison avec des quantités connues de vecteur linéarisé.

Pour réaliser la ligation des extrémités franches des produits de PCR avec celles du vecteur, ceux-ci furent mélangés de sorte à avoir un rapport insert/vecteur de 3 pour 1, en terme de picomoles d'extrémités disponibles. Les réactions, incluant les contrôles mentionnés dans le manuel d'instruction de Stratagene (réactions sans ajout d'insert, sans ajout de vecteur ou sans ajout de ligase), furent incubées dans un volume total de 10 µl avec 1,5 U de ligase (Gibco BRL) à 15°C pendant une nuit. Ensuite, ces réactions furent précipitées avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M (pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol absolu à -35°C, pendant environ une heure. L'ADN était ensuite récupéré par centrifugation, lavé à l'éthanol 70% (vol/vol), asséché et resuspendu dans 4 µl d'eau. La moitié de ce volume fut utilisée pour la transformation de cellules "électro-compétentes" de *E. coli* JM 109, préparées tel que décrit précédemment (Sambrook et al. 1989), en utilisant un appareil Gene Pulser (Bio-Rad), selon le protocole "d'électroporation" décrit par Ausubel et al. (1994).

La sélection des transformants a été réalisée sur des géloses LB (tryptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l), additionnées de 50 µg/ml d'ampicilline. Comme la souche de *E. coli* JM 109 est de phénotype lac- et que le vecteur pBlueScript code pour la partie N terminale du peptide α de la β-galactosidase, la sélection de type bleu-blanc, basée sur la complémentation α a été réalisée. Lorsque le vecteur intact est incorporé à l'intérieur des cellules bactériennes, la partie N terminale du peptide se complémente avec la partie C terminale du gène *lacZ*, codée par le chromosome. Ceci confère à la bactérie un phénotype lac+, qui se détecte avec le substrat chromogène X-gal (5-bromo-4chloro-3indolyl-β-D-galactoside), qui vire au bleu lorsqu'il est scindé. Mais lorsque le vecteur incorpore l'insert, la partie N terminale du gène est modifiée, empêchant la complémentation α. Pour réaliser ce type de sélection, 4 µl d'IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) (solution à 200 mg/ml) (qui est un inducteur non métabolisable de l'opéron lactose) et de 40 µl de X-gal (solution à 20

mg/ml, préparé dans du diméthylformamide) sont étalés à la surface des géloses (Sambrook et al. 1989). Les plasmides provenant des colonies blanches furent purifiés selon le protocole de préparation plasmidique de Sambrook et al. (1989). Après digestion d'une partie de ceux-ci avec les enzymes *Eco* RI et *Hind* III, les fragments clonés étaient détectés sur gel d'agarose.

Le séquençage des fragments clonés était réalisé selon la méthode basée sur l'incorporation de di-désoxyribonucléotides (Sanger et al. 1977), en utilisant une trousse commerciale (^{T7}Sequencing kit, Pharmacia), selon les recommandations du fabricant. Mais les modifications suivantes furent apportées pour accroître la dénaturation de l'ADN plasmidique et par conséquent, l'efficacité d'hybridation de l'amorce. L'ADN provenant des préparations plasmidiques fut précipité avec de l'éthanol tel que décrit plus haut et repris dans 24 µl d'eau stérile. La moitié de ce volume était mélangé avec 2 µl d'amorce KS pour le vecteur pBlueScript (Stratagene) et 2 µl de NaOH 2N; ce mélange était incubé 10 minutes à température de la pièce et ensuite, 8 µl d'acétate de sodium 1,5 M (pH 4,5), et 60 µl d'éthanol absolu étaient ajoutés. L'ADN était ainsi précipité à -20°C pendant 10 minutes, lavé avec de l'éthanol 70% (vol/vol), asséché puis enfin repris dans 12 µl d'eau. La suite des manipulations fut réalisée selon le protocole de Pharmacia. Les réactions de séquences ont été appliquées sur un gel de polyacrylamide de 6%, contenant 7 M d'urée, et soumises à une électrophorèse à 54°C en utilisant le système Macrophor LKB 2010 (Pharmacia) à un voltage constant de 2000 mV.

3.2.6 Analyse des séquences

Après avoir enlevé les portions de séquence correspondant aux amorces en utilisant le programme SEQED (Genetic Computer Group, Université du Wisconsin; Devereux et al. 1984), les séquences obtenues ont été comparées avec celles provenant de GenBank, en utilisant le programme "FASTA" de GCG (GCG; Devereux et al. 1984). Les espèces donnant les meilleures homologies de séquence ont servi de groupe de référence pour calculer les taux de similarité avec les espèces dont la séquence est connue. Ces séquences furent alignées avec le programme PILEUP (GCG; Devereux et al. 1984) et une vérification visuelle des alignements fut réalisée. Des comparaisons entre paires d'espèces furent établies selon la méthode de Kimura (1980) avec le programme MEGA version 1.0 (Kumar et al. 1993). Cette méthode calcule des taux de substitutions en utilisant deux paramètres distincts, qui tiennent compte des transitions et des transversions. Les taux de similarité ont été

obtenus à partir des matrices de distance obtenues, en effectuant le calcul suivant: (1-distance)x100.

D'autre part, les taux de similarité entre les espèces utilisées pour la mise au point du DGGE ont été calculés afin d'apprécier le pouvoir de résolution de cette technique. Pour calculer les taux de similarité, l'alignement des séquences a été réalisé avec le programme "PILEUP" et le programme "DISTANCES" (GCG; Devereux et al. 1984) a été utilisé pour le calcul des distances, selon une méthode qui n'effectue pas de corrections pour les substitutions multiples (option "uncorrected distances").

3.3 Résultats

3.3.1 Mise au point des conditions de PCR

Le protocole de PCR décrit par Muyzer et al. (1993) pour l'amplification d'une partie de l'ADNr 16S, a été appliqué pour réaliser l'amplification d'espèces faisant partie du genre *Thiobacillus*, ainsi que *Acidiphilium cryptum*. Les résultats obtenus montrent que la plupart des produits de PCR du gène codant pour l'ARNr 16S affichent une longueur d'environ 230 pb, tel que décrit précédemment (Figure 3.2). Les autres souches listées au tableau 3.1, soit les Protéobactéries de la subdivisions γ et les bactéries Gram positives, ont aussi produit un fragment de cette longueur (résultat non montré). Cependant, *T. acidophilus* et *A. cryptum*, qui font partie de la subdivision α des Protéobactéries, ont produit un fragment dont la longueur est d'environ 200 pb (Figure 3.2). Ce fut aussi le cas pour le second fragment généré par l'ADN extrait de la souche de *T. ferrooxidans* isolée à partir de sédiments lagunaires. Vraisemblablement, cette souche était contaminée par une espèce bactérienne qui pourrait faire partie de la subdivision α des Protéobactéries.

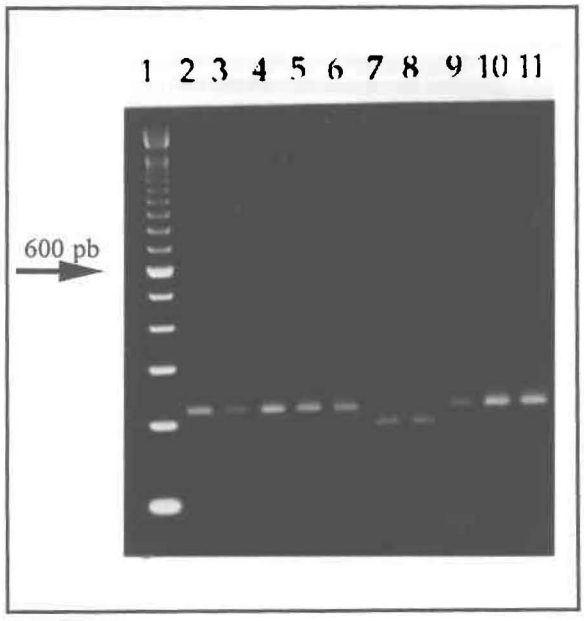


Figure 3.2 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% de fragments de gène d'ARNr 16S amplifiés par PCR. 1, marqueur de poids moléculaire 100pb; 2-5 *T. ferrooxidans* ATCC 19859; 13598; 23270; 13661; 6, *T. ferrooxidans* isolé de sédiments lagunaires; 7, *T. acidophilus*; 8, *A. cryptum*; 9, *P. aeruginosa*; 10, *E. aerogenes*; 11, *E. coli*.

3.3.2 Extraction d'ADN dans les boues et amplification par PCR

3.3.2.1 Efficacité pour les espèces bactériennes Gram positives

Afin de s'assurer que les techniques d'extraction et de purification d'ADN à partir des boues étaient en mesure de révéler la présence d'espèces ayant une paroi très résistante, des espèces Gram positives ont été inoculées à des boues d'épuration stérilisées, à raison de $3x10^6$ cellules/ml. Pour fin de comparaison, une concentration similaire de *T. ferrooxidans* a été inoculée à un autre échantillon de boues. Le contenu en ADN a ensuite été purifié, puis amplifié par PCR. Les résultats sont montrés à la Figure 3.3.

Figure 3.3 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% de fragments de gène d'ARNr 16S provenant d'espèces Gram positives et Gram négatives ajoutées à des boues d'épuration stérilisées. 1, marqueur de poids moléculaire 100pb; 2, boues stérilisées; boues stérilisées inoculées avec les bactéries suivantes: 3, *T. ferrooxidans*; 4, *B. subtilis*; 5, *B. megaterium*; 6, *Staphylococcus sp.*

Tout d'abord, on observe que l'extrait réalisé avec les boues stérilisées et non inoculées n'a généré aucun produit de PCR. Ceci indique que la stérilisation a détruit la totalité des bactéries des boues (de même que leur matériel génétique) et que les manipulations subséquentes n'ont pas entraîné la contamination du milieu. À en juger par l'intensité des bandes obtenues sur gel d'agarose, les techniques utilisées induisent la formation d'une quantité de produit de PCR provenant de *B. subtilis* similaire à celle formée par le témoin Gram négatif utilisé, soit *T. ferrooxidans*. Pour ce qui est des boues ensemencées avec *B. megaterium* et *Staphylococcus sp.*, la quantité de produit de PCR observée est plus importante que celle générée par *T. ferrooxidans*. L'efficacité d'extraction d'ADN à partir des boues ne semble donc pas limitée par la résistance des parois bactériennes.

3.3.2.2 Évaluation de la limite de détection des bactéries dans les boues

La limite de détection des bactéries dans les boues a aussi été évaluée. Des concentrations croissantes de *T. ferrooxidans*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa* ont été ajoutées aux boues. Le résultat obtenu pour *B. subtilis* est présenté à la Figure 3.4. Sur ce gel, on observe que l'intensité des bandes est proportionnelle au nombre de cellules ensemencées, surtout pour les fortes concentrations. Aussi, ce gel nous permet de situer la limite de détection à moins de 30 bactéries/ml de boues, puisqu'à cette concentration, la bande de produit de PCR était toujours visible. À cette concentration, un résultats similaire a été obtenu avec *T. ferrooxidans* et de *P. aeruginosa*, bien que l'intensité des bandes produites par ces espèces était plus faible (résultats non montrés). On peut également observer que la bande produite par l'extrait cellulaire correspondant à $3x10^6$ cellules/ml de *P. aeruginosa* donne un signal plus faible que la concentration équivalente de *B. subtilis* (Figure 3.4).

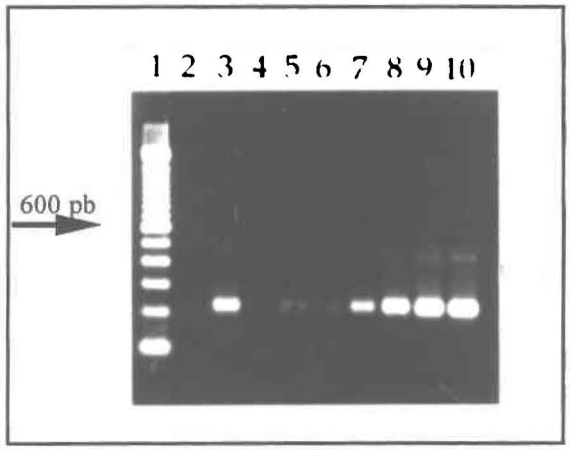


Figure 3.4 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification du fragment de gène de l'ARNr 16S obtenu à partir de boues ensemencées avec différentes concentrations de bactéries. 1, marqueur de poids moléculaire 100pb; 2, contrôle négatif de PCR sans ajout d'ADN; extraits cellulaires faits à partir des boues correspondant à: 3, $3x10^6$ *P. aeruginosa*/ml; 4, 0 bactéries/ml; 5, $3x10^1$ *B. subtilis*/ml; 6, $3x10^2$ *B. subtilis*/ml; 7, $3x10^3$ *B. subtilis*/ml 8, $3x10^4$ *B. subtilis*/ml; 9, $3x10^5$ *B. subtilis*/ml; 10, $3x10^6$ *B. subtilis*/ml.

Les étapes d'extraction et de purification d'ADN ont aussi été validées pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 18S des levures *R. rubra* et *R. glutinis*. Les extraits provenant des souches de *R. rubra* et de *R. glutinis* réalisés à partir de milieu synthétique ont produit le fragment de PCR attendu d'une taille d'environ 400 pb. Et lorsque ces espèces furent ensemencées aux boues stérilisées, l'extraction et l'amplification ont aussi permis de révéler leur présence (Figure 3.5).

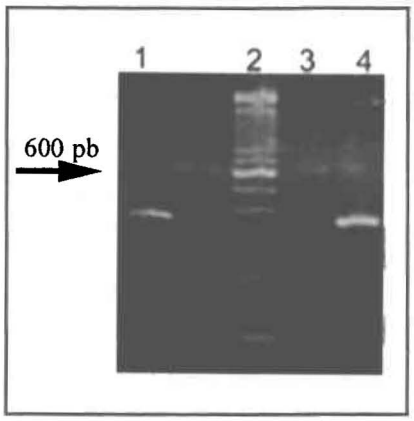


Figure 3.5 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification du fragment de gène de l'ARNr 18S obtenu à partir de boues ensemencées avec des levures. 1, boues ensemencées avec *R. glutinis*; 2, marqueur de poids moléculaire 100pb; 3, contrôle négatif de PCR sans ajout d'ADN; 4, boues ensemencées avec *R. rubra*.

3.3.3 Adaptation du DGGE à l'étude de la diversité dans les boues

Le but de cette section était d'adapter un protocole de DGGE pour la séparation d'espèces bactériennes faisant partie du genre *Thiobacillus* et de valider l'utilisation de cette technique pour l'étude de la diversité dans les boues. Afin d'évaluer le pouvoir de résolution du DGGE, les fragments de gènes d'ARNr 16S générés par PCR à partir de l'ADN génomique de plusieurs espèces du genre *Thiobacillus* et de *A. cryptum* furent mélangés et soumis à une séparation sur DGGE. Les étapes d'optimisation des conditions de préparation du gel et des conditions d'électrophorèse ont permis de séparer les fragments de même longueur provenant de six espèces différentes (Figure 3.6). La distance de migration des mêmes échantillons déposés dans des puits différents est constante, ce qui permet des comparaisons entre les divers couloirs de migration (Figure 3.6). La souche de *T. thermosulfatus* isolée à partir des boues d'épuration cultivées en condition thermophile par Shooner et al. (1996), a migré à une position différente par rapport à *T. tepidarius*, ce qui permet de conclure que ces deux espèces sont probablement distinctes, même si elles partagent des caractères phénotypiques semblables. La détermination de la séquence du gène entier de l'ARNr 16S de *T. thermosulfatus*, qui est nécessaire à l'identification d'une nouvelle espèce, a confirmé ce résultat (Shooner et al. 1996). On peut voir au Tableau 3.3 que l'alignement des séquences partielles du gène 16S de ces deux souches thermophiles ne révèle que 74% de similarité (Shooner et al. 1996). Par ailleurs, le DGGE a permis la séparation de fragments provenant de *A. cryptum* et de *T. thermosulfatus,* qui partagent un taux de similarité de 90%. De même,

les fragments de *T. acidophilus* et de *A. cryptum*, qui sont encore plus reliées du point de vue phylogénétique (96%), furent aussi séparés sur DGGE (Tableau 3.3).

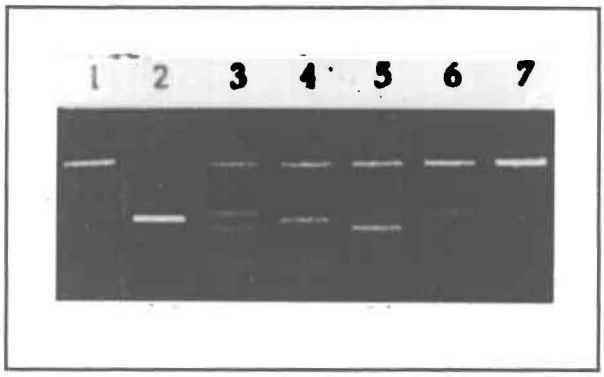


Figure 3.6 Séparation sur DGGE de fragments de gène d'ARNr 16S provenant d'espèces de *Thiobacillus* et d'*Acidiphilium*. 1, *T. ferrooxidans*; 2, *T. thermosulfatus*; 3, *T. ferrooxidans*, *T. intermedius*, *T. acidophilus*, *T. tepidarius*; 4, *T. ferrooxidans*, *T. thermosulfatus*, *T. tepidarius*; 5, *T. ferrooxidans*, *T. acidophilus*; 6, *T. ferrooxidans*, *A. cryptum*; 7, *T. ferrooxidans*. Dans un même couloir de migration, les différentes espèces sont énumérées de haut en bas.

Tableau 3.3 Taux de similarité théorique pour les fragments de gène d'ARNr 16S de la région V3 des espèces ayant servi à la mise au point du DGGE[1].

	% de similarité						
Espèce	*T. ferrooxidans*	*T. tepidarius*	*P. aeruginosa*	*E. coli*	*A. cryptum*	*T. acidophilus*	*T. thermosulfatus*
T. ferrooxidans	100						
T. tepidarius	81	100					
P. aeruginosa	70	70	100				
E. coli	77	74	88	100			
A. cryptum	80	78	87	87	100		
T. acidophilus	80	81	87	84	96	100	
T. thermosulfatus	73	74	78	79	90	88	100

1) Les séquences de *E.coli*, *T. ferrooxidans*, *A. cryptum* et *T. acidophilus* ont été déterminées dans ce travail. Les numéros d'accession pour autres les séquences proviennent de GenBank: *T. tepidarius* (m79424), *T. thermosulfatus* (u27839), *P. aeruginosa* (u06684). Bien qu'elle ait servi au développement du DGGE, la séquence de*T. intermedius* n'a pu être soumise à ces calculs puisqu'elle n'est pas publiée.

Afin de vérifier si la technique de DGGE pouvait révéler la diversité bactérienne dans les boues d'épuration, des mélanges contenant de une à cinq espèces bactériennes ont été ajoutés à des boues stérilisées, pour simuler des communautés bactériennes de complexité croissante. Puis, l'extraction et la purification de l'ADN ont été réalisées. L'amplification de ces mélanges par PCR et leur séparation sur gel d'agarose indiquent que tous les extraits ont produit un fragment d'environ 233 pb (Figure 3.7a). Mais ces fragments ont pu être séparés en fonction de leur composition, puisque la migration sur DGGE a révélée la présence des divers membres des communautés bactériennes inoculées aux boues, et ce, avec une résolution satisfaisante (Figure 3.7b). À cause de leur taille plus courte (200 pb), les fragments produits par *T. acidophilus* et *A. cryptum* migrent plus rapidement mais sont clairement séparées dans le gel. *P. aeruginosa* et *E. coli*, qui font tous deux partie de la subdivision γ des Protéobactéries et qui partagent un taux de similarité de 88% (Tableau 3.2), ont aussi été bien séparés. Cependant, on peut noter que même si les concentrations bactériennes utilisées pour inoculer les boues étaient similaires, la bande formée par *T. acidophilus* est nettement plus faible que celles formées par *E. coli*, *T. ferrooxidans* et *P. aeruginosa* (Figure 3.7b). Par ailleurs, l'intensité des fragments de *E. coli* et de *T. ferrooxidans* est diminuée lorsque les cinq espèces sont amplifiées simultanément.

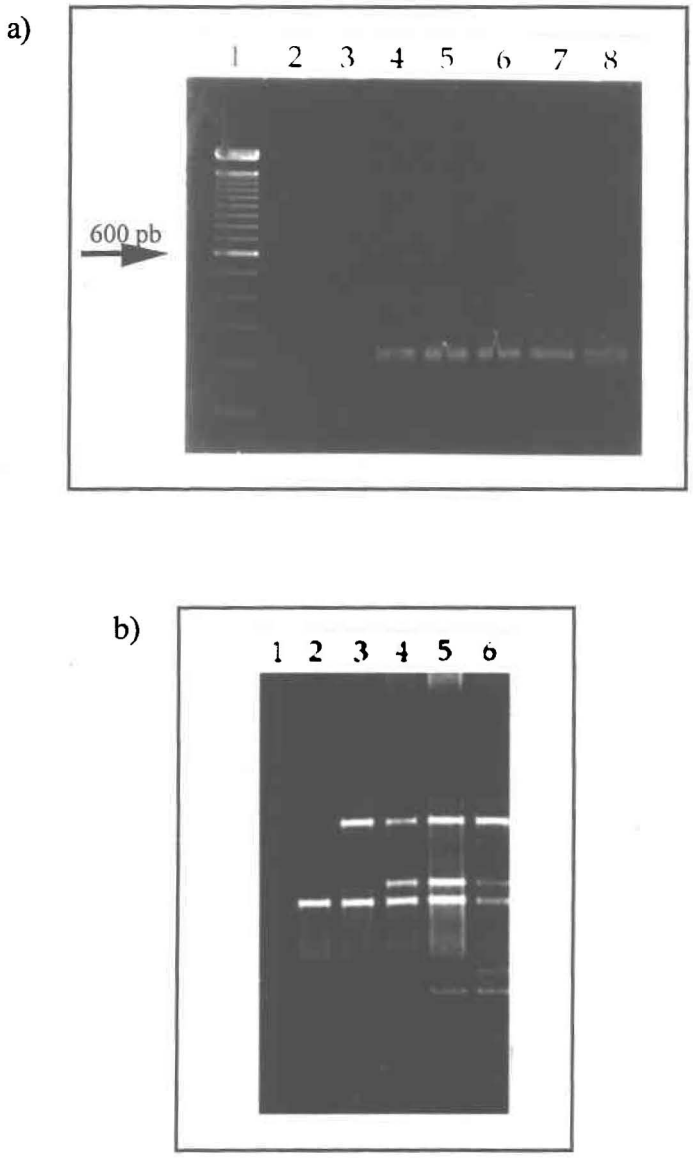


Figure 3.7 Séparation électrophorétique de fragments de gène d'ARNr 16S provenant d'espèces bactériennes ajoutées à des boues d'épuration stérilisées. (a) Gel d'agarose 1,5%: 1, marqueur de poids moléculaires 100pb; 2, contrôle négatif de PCR sans ajout d'ADN; 3, boues stérilisées sans ajout de bactéries; inoculation des bactéries suivantes dans les boues: 4, *E. coli*; 5, *E. coli* et *P. aeruginosa*; 6, *E. coli* , *P. aeruginosa* et *T. ferrooxidans*; 7, *E. coli*, *P. aeruginosa, T. ferrooxidans* et *T. acidophilus*; 8, *E. coli, P. aeruginosa, T. ferrooxidans*, *T. acidophilus* et *A. cryptum*. (b) DGGE: 1, témoin sans ajout de bactéries; 2-6, Mélanges décrits dans la partie (a), de 4 à 8. Dans un même couloir de migration, les différentes espèces sont énumérées de haut en bas.

3.3.4 Analyse des séquences des produits de PCR

Les produits de PCR formés par *E. coli*, *T. ferrooxidans*, *T. acidophilus*, Sed1 et Sed2 ont été clonés et séquencés. L'alignement des séquences des produits de PCR a été effectué avec celles provenant des banques de gènes bactériens. Pour chaque séquence alignée, plusieurs espèces ont été sélectionnées et utilisées pour le calcul des taux de similarité. Les résultats (Tableau 3.4) montrent les meilleurs taux de similarité pour chacune des séquences.

Tableau 3.4 Taux de similarité entre les séquences des fragments de gène d'ARNr 16S amplifiés et les séquences publiées[1].

Espèce séquencée	Affiliation	Espèces reliée et affiliation	% Similarité
E. coli	Protéobactéries Subdivision γ	*Escherichia coli* K12 Subdivision γ	100
		Shigella sonnei Subdivision γ	100
		Proteus vulgaris Subdivision γ	95
T. ferrooxidans	Protéobactéries Subdivision β	*Thiobacillus ferrooxidans* N-Fe3 Subdivision β	100
		Thiobacillus thiooxidans Subdivision β	95
		Thiobacillus caldus Subdivision β	95
T. acidophilus	Protéobactéries Subdivision α	*Thiobacillus acidophilus* Subdivision α	100
		Acidiphilium angustum Subdivision α	100
		Acidiphilium rubrum Subdivision α	100
Sed1	Inconnue	*Thiobacillus ferrooxidans* N-Fe3 Subdivision β	100
		Thiobacillus thiooxidans Subdivision β	93
Sed2[2]	Inconnue	*Acidiphilium cryptum* Subdivision α	100
		Acidiphilium organovorum Subdivision α	100

1) Les taux de similarité ont été calculés à partir des distances calculées selon la méthode de Kimura (1980).
2) Les taux de similarité obtenus pour Sed2 ne concernent qu'une partie de la séquence, soit les 89 derniers nucléotides.

Il est important de noter qu'aucune variation intraspécifique n'a été détecté lors de l'analyse des séquences. Pour la séquence de *E. coli*, le plus haut taux de similarité rencontré est de 100%, et fut obtenu avec les souches de *E. coli* K12, ainsi qu'avec *Shigella sonnei*. La séquence de *E. coli* partage un taux de similarité de 95% avec une autre espèce de la subdivision γ des Protéobactéries, soit *Proteus vulgaris*. Pour ce qui est de *T. ferrooxidans*, on retrouve un taux de similarité de 100% avec la séquence de *T. ferrooxidans*, N-Fe3

(Tableau 3.4) et des taux de plus de 98% avec plusieurs autres souches de cette espèce (résultat non montré). Par ailleurs, la séquence de *T. ferrooxidans* révèle un taux de similarité de 95% avec *T. thiooxidans* et *T. caldus*. Pour sa part, *T. acidophilus* partage un taux de similarité de 100% avec les séquences de *T. acidophilus*, *A. angustum* et *A. rubrum*, qui font toutes partie de la subdivision α des Protéobactéries.

Le clonage du produit de PCR formé par la souche de *T. ferrooxidans* isolée à partir de sédiments a également été effectué et l'alignement des séquences provenant des deux transformants obtenus a indiqué que celles-ci étaient différentes. Le calcul des similarités a montré que la séquence du fragment Sed 1 est identique à 100% avec la souche de *T. ferrooxidans* N-Fe3. D'autres souches de *T. ferrooxidans* ont montré un degré de similarité de plus de 98% avec Sed 1 et *T. thiooxidans* s'est révélé similaire à 93% avec cette séquence. De façon préliminaire, la séquence du fragment Sed 2 s'est montrée fortement apparentée à deux espèces d'*Acidiphilium*, soit *A. cryptum* et *A. angustum*, avec lesquelles elle partage un taux de similarité de 92%. Cependant, une analyse pour la détection de molécules chimériques, qui sont des fragments d'ADN hybrides pouvant être formés lors de l'amplification de mélanges d'ADN par PCR, fut réalisée avec le programme "Check Chimera" du Ribosomal database Project (Maidak et al. 1994). Cette analyse a démontré que Sed 2 était vraisemblablement une molécule hybride, car la fragmentation de la séquence indique deux régions distinctes, qui sont plus similaires à des espèces connues que ne l'est l'ensemble de la molécule (cf. annexe B). La première partie de la séquence de Sed 2, englobant les 40 premiers nucléotides, indique un taux de similarité de 100% avec *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* et *T. caldus*. Mais à partir du nucléotide 41 jusqu'à la position 129, cette séquence partage une similarité de 100% avec *A. cryptum* et *A. organovorum* (Tableau 3.4 et annexe B). Pour confirmer cette analyse, les 40 premiers nucléotides ont été enlevés de la séquence Sed 2 et un alignement a été réalisé avec huit autres espèces de la subdivision α. La matrice de distance calculée appuie la forte affiliation de la séquence de Sed 2 avec ces espèces (Tableau 3.5). En effet, un taux de similarité de 100% fut obtenu avec les séquences de *A. cryptum* et de *A. organovorum* (Tableau 3.4 et 3.5). Afin de vérifier que la fragmentation observée chez la séquence Sed 2 n'était pas simplement propre aux espèces du genre *Acidiphilium*, la séquence de *A. cryptum* provenant de la banque de gènes fut également soumise à une analyse "Chimera Check ". Le résultat de l'analyse, qui est présenté à l'annexe B, n'a pas révélé une telle fragmentation. Enfin, l'analyse du fragment Sed 1 par cette méthode a montré qu'il n'était pas une molécule chimérique (cf. annexe B).

Tableau 3.5 Taux de similarité entre les 40 premiers nucléotides du produit de PCR de Sed 2 et des Protéobactéries de la subdivision α.

	% de similarité							
Espèce	Sed2	*A. cryptum*	*A. organovorum*	*T. acidophilus*	*A. angustum*	*A. rubrum*	*Acidiphilium sp.*	*A. facilis*
Sed 2	100							
A. cryptum	100	100						
A. organovorum	100	100	100					
T. acidophilus	97	95	95	100				
A. angustum	97	95	95	100	100			
A. rubrum	97	95	95	100	100	100		
Acidiphilium sp.	97	97	97	99	99	99	100	
A. facilis	93	94	94	94	94	94	96	100

3.4 Discussion

La région variable V3 du gène codant pour l'ARNr 16S est universelle pour le domaine *Bacteria* (Medlin et al. 1988) et a été un succès pour toutes les espèces testées, provenant de trois subdivisions des Protéobactéries et de trois espèces Gram positives. Cependant, comme son nom l'indique, cette région possède une certaine variabilité qui pourra permettre, lors d'analyses ultérieures par DGGE ou par séquençage, une discrimination fine des espèces. Comme mentionné précédemment, la région V3 est idéale pour étudier la diversité génétique, car parmi les neuf régions variables de l'ADNr 16S, c'est celle qui offre le plus de variabilité entre divers groupes bactériens (Lee et al. 1996a).

Chez les espèces de la subdivision α des Protéobactéries, soit *T. acidophilus* et *A. cryptum*, la variabilité se manifeste aussi par la présence d'une brèche importante et détectable sur gel d'agarose, située entre les positions 436 et 462 selon la numérotation de *E. coli* (Woese, 1987). La souche de *T. ferrooxidans* isolée à partir de sédiments lagunaires a révélé, en plus de la bande attendue à 233 pb, un second produit de longueur similaire à celui formé par *T. acidophilus* et *A. cryptum*. De toute évidence, la souche de *T. ferrooxidans* n'avait pas été isolée en culture pure. Cette contamination n'avait été détectée, ni par les observations microscopiques (état frais, coloration de Gram), ni lors des étapes d'isolement de colonies sur boites de Pétri. Tel que précédemment recommandé par Harrison (1984), d'autres précautions avaient également été prises pour s'assurer de la pureté de la souche, tel que la culture dans un milieu minimal ne contenant pas de matière organique, l'ajustement du pH initial à 1,8-1,9 et la culture avec d'importantes concentrations de cuivre (de 1 à 5 g/l). Cependant, *T. ferrooxidans* est souvent contaminé par des espèces oligotrophes particulièrement difficiles à éliminer des cultures (Johnson et Kelso 1983; Harrison 1984). L'analyse comparative de la séquence des fragments Sed 1 et Sed 2 a indiqué qu'une des deux espèces était similaire à 100% avec *T. ferrooxidans*, tandis que l'autre était similaire à 100% avec deux espèces du genre *Acidiphilium*, soit *A. cryptum* et *A. organovorum*. Du point de vue écologique, ces résultats sont fort pertinents, car la plupart des espèces acidophiles de la subdivision α des Protéobactéries furent isolées de façon concomitante avec *T. ferrooxidans* (Zavarzin 1972; Guay et Silver 1975; Harrison 1981; Lobos et al. 1986; Wichlacz et Thompson 1986; Bhattacharyya et al. 1991; Johnson et McGinness 1991; Goebel et Stackebrandt 1994). L'analyse moléculaire nous a donc fourni des résultats concluants quant à l'écologie des micro-organismes acidophiles en milieu naturel, ceux-ci n'ayant pas été observés par les techniques de microbiologie classiques. De plus, ces résultats corroborent

l'importance des interactions microbiennes entre les espèces hétérotrophes et *T. ferrooxidans*, dont il a été question au chapitre précédent.

L'efficacité des techniques d'extraction et de purification de l'ADN mises au point à partir des travaux de Moré et al. (1994) a été validée pour l'étude des bactéries dans les boues. Moré et al. (1994) ont comparé leur technique d'extraction d'ADN utilisant des billes pour lyser les cellules, avec la technique utilisée par Ogram et al. (1987), basée sur des cycles de gel et de dégel des échantillons. Pour ce faire, des sédiments ont été inoculés avec des cellules ou avec des endospores de *B. subtilis*, ces dernières servant de modèle pour représenter les espèces les plus résistantes au traitement de lyse. En évaluant la viabilité des bactéries à la suite de l'un ou de l'autre traitement, ces auteurs ont mesuré une efficacité comparable de lyse des cellules. Cependant, la lyse des endospores s'est comportée bien différemment en fonction des deux traitements, puisqu'un taux de survie de 2% a été mesuré suite au traitement avec des billes, comparativement à un taux de survie de 94% suite au gel et au dégel des échantillons. Dans ce travail, de tels contrôles n'ont pas été repris pour l'extraction de l'ADN à partir des boues et c'est pourquoi nous avons opté pour une procédure faisant successivement appel à ces deux méthodes, afin de s'assurer que tous les micro-organismes présents dans le milieu soient lysés.

En procédant à l'extraction d'ADN des bactéries Gram positives, nous avons démontré que l'efficacité de lyse, évaluée par la formation de produits de PCR, était comparable à celle des bactéries Gram négatives et que la rigueur du traitement utilisé ne causait pas de dommage à l'ADN pouvant compromettre l'amplification par PCR. De plus, la technique de purification de l'ADN sur colonnes SpinBind a permis l'obtention d'un matériel exempt de contaminants pouvant inhiber l'amplification par PCR (Moré et al. 1994). Il faut aussi noter que l'absence de produit de PCR suite à l'amplification des extraits faits à partir des boues stérilisées confirme que le traitement à l'autoclave a permis la destruction de tous les micro-organismes. En plus, cette condition indique que les manipulations subséquentes ne causent pas la contamination des boues. Ce contrôle est très important car il démontre que la méthodologie développée n'engendrera pas de tels artefacts lorsqu'il s'agira d'analyser des communautés dont la composition microbienne est inconnue. De façon préliminaire, cette procédure a aussi été adaptée pour la lyse d'autres organismes possédant une paroi très résistante, soit les levures *R. rubra* et *R. glutinis* où elle s'est aussi montrée efficace en produisant des réactions de PCR positives. Comme les amorces utilisées ont été développées pour l'amplification

universelle des champignons, l'étude de ces micro-organismes eucaryotes pourrait aussi être entreprise avec une approche moléculaire (Simon et al. 1992).

La limite de détection a aussi été évaluée et pour les trois espèces testées, soit *T. ferrooxidans*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis*, celle-ci se situerait autour de 30 bactéries/ml de boues. En fait, l'intensité du produit de PCR formé par l'extrait correspondant à la plus faible dilution était assez importante pour supposer qu'un extrait d'ADN correspondant au moins à la moitié de cette concentration pourrait encore mener à la formation d'un produit de PCR détectable sur gel coloré au bromure d'éthidium. Tel que précédemment déterminé, la détection de *E. coli* dans l'environnement s'était avérée très sensible, car des concentrations de 3 bactéries/g de sol, 10 bactéries/g de sédiments et 80 bactéries/g de boue avaient produit des réactions de PCR positives (Tsai et Olson 1992b; Tsai et al. 1993). Cependant, la comparaison de ces résultats avec les nôtres est difficile à établir, vu la différence des espèces bactériennes en cause, des milieux étudiés, de la technique d'extraction utilisée, de l'erreur sur le dénombrement et des conditions de PCR utilisées (amorces, nombre de cycles, longueur du fragment produit). Par exemple, selon les amorces utilisées, Way et al. (1993) ont obtenu une limite de détection de 1000 et de 100 ufc (unité formant une colonie), pour *Salmonella typhimurium*. Ces auteurs ont pu accroître la limite de détection de *S. typhimurium* à aussi peu que 1 ufc, en procédant à un double PCR, c'est-à-dire en réalisant un PCR de 25 cycles et en utilisant un volume de la réaction pour réaliser une seconde amplification de 25 cycles. Dans l'ensemble, la détection des bactéries par PCR dans des échantillons de nature complexe tels que les sols, les sédiments ou les boues d'épuration est donc très sensible. Par contre, l'estimation de la limite de détection restera une notion spéculative lorsqu'il s'agira d'amplifier le gène codant pour l'ARNr 16S provenant de populations inconnues. En effet, tel que souligné par Farelly et al. (1995), l'intensité des produits de PCR obtenus sur gel ne pourrait être considéré comme un critère reflétant l'abondance relative des espèces, puisque la taille et le nombre de génomes, le nombre de copies du gène codant pour l'ADNr 16S de même que l'organisation des opérons *rrn*, sont autant de facteurs qui varient en fonction des espèces et même en fonction des souches. Le nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S peut varier de un à 14. Par exemple, *B. subtilis* possède dix copies de ce gène (Green et al. 1985; Itaya et Tanaka 1991), *P. aeruginosa* en possède quatre (Römling et al. 1989; Ratnaningsih et al. 1990) et la souche "Torma" de *T. ferrooxidans* en possède deux (Sagredo et al. 1992). Ceci explique pourquoi le PCR réalisé avec $3x10^6$ *B. subtilis*/ml a produit, sur gel d'agarose, une bande beaucoup plus intense que le PCR réalisé avec une concentration équivalente de *P. aeruginosa*. Et

comme rapporté précédemment, *B. subtilis* possède un génome plus petit que celui de *P. aeruginosa*, ceci faisant en sorte que 0,36% de son génome est composé de gènes d'ARNr 16S, tandis que ce ratio est de 0,1% pour *P. aeruginosa* (Farrelly et al. 1995). Selon ces auteurs, ce ratio pourrait aussi être déterminant au niveau de l'efficacité d'amplification de l'ADNr 16S d'une espèce par rapport à une autre.

L'optimisation de la technique de DGGE a pu permettre la séparation de plusieurs espèces du genre *Thiobacillus*, ainsi que la séparation de *T. acidophilus* et de *A. cryptum* dont les fragments de PCR sont similaires à 96%. La séparation par DGGE des ARNr 5S provenant de *T. ferrooxidans* et de *T. thiooxidans*, qui sont similaires à 98% a été récemment décrite (Stoner et al. 1996). La séparation de *T. tepidarius* de *T. thermosulfatus* a aussi été réalisée, fournissant un indice supplémentaire que cette dernière espèce, récemment isolée, était bien distincte de *T. tepidarius*, avec qui elle partage des caractères phénotypiques tels que les types de substrats utilisés et la thermophilie. La séparation des fragments obtenue lors des premiers essais était plutôt médiocre et ce, même après avoir travaillé sur l'optimisation de l'échelle du gradient et sur la linéarité de celui-ci. Les conditions d'électrophorèse telles que la recirculation du tampon et le maintien d'une température la plus stable possible, soulignés par Myers et al. (1987), se sont révélées d'une importance majeure pour l'obtention d'une résolution satisfaisante. Dans la première description de cette technique dans le contexte environnemental, l'importance de ces conditions n'avait pas été soulignée car apparemment, les auteurs avaient réussi à obtenir une bonne séparation avec le système commercial d'électrophorèse utilisé (Muyzer et al. 1993). Dans notre cas, des améliorations ont dû être apportées à ce système parce que la simple circulation d'eau à 60°C dans le serpentin interne de l'appareil engendrait un gradient de température dans le tampon, venant ainsi perturber la linéarité des conditions de dénaturation. Il est bien établi que la température est un facteur crucial pour la fusion de l'ADN et lors de la technique de DGGE, ce sont les agents dénaturants chimiques qui induisent la dénaturation de l'ADN; la température doit donc être la plus uniforme possible. Les difficultés liées à la réalisation du DGGE que nous avons rencontrées expliquent peut-être les tentatives infructueuses rapportées précédemment (Farrelly et al. 1995).

Le modèle reconstituant une communauté bactérienne dans les boues a été analysé par DGGE. La séparation des produits de PCR a démontré que les fragments de gènes de toutes les espèces inoculées aux boues ont été séparés avec une résolution très nette. Ceci indique que plusieurs autres espèces pourraient être mises en évidence dans de telles conditions.

Muyzer et al. (1993) ont rapporté la séparation de cinq et dix fragments dans deux écosystèmes différents et Santegoeds et al. (1996) ont obtenu la résolution de 14 fragments différents dans une source thermale. Même si nos résultats indiquent que l'amplification simultanée de plusieurs espèces génère des produits de PCR ayant des intensités différentes, des essais de sensibilité ont démontré que dans une communauté microbienne constituée de cinq espèces, *Desulfovibrio sapovorans* était encore détecté, même lorsqu'il ne représentait plus que 1% du nombre total des bactéries (Muyzer et al. 1993). D'autres analyses par DGGE ont révélé la présence de bactéries dont la concentration était 300 fois moins élevé que d'autres espèces (Santegoeds et al. 1996). Ainsi, cette sensibilité devrait permettre la détection d'espèces minoritaires impliquées dans le procédé de traitement des boues.

L'analyse des séquences partielles de l'ADNr 16S s'est montrée cohérente avec la classification phylogénétique des bactéries. Cependant, en fonction du degré de conservation de l'ADNr 16S du groupe taxonomique considéré, nous avons observé que l'information dérivée de la région amplifiée peut être limitée dans certains cas et empêcher l'identification à l'espèce (Cilia et al. 1996). Ce fut le cas pour la séquence de *E. coli* qui s'est montrée similaire à 100% avec *Shigella sonnei*, une entérobactérie de la subdivision γ qui est étroitement reliée à *E. coli*. Ce fut également le cas pour *T. acidophilus*, qui n'a pu être distingué de *A. angustum* et de *A. angustum*, car ces espèces partagent entre elles un taux de similarité de 100%. Pour ce qui est de *T. ferrooxidans* ATCC 19859, un taux de 100% fut exclusivement observé avec la souche de *T. ferrooxidans* N-Fe3, dont l'analyse phylogénétique réalisée avec le gène entier a démontré un lien étroit entre celles-ci (Goebel et Stackbrandt 1994). La similarité de 100% du fragment Sed 1 avec *T. ferrooxidans* a confirmé l'identification de cette espèce, sur la base des caractères phénotypiques observés au chapitre II, soit un bacille Gram négatif acidophile, qui pousse de façon autotrophe en utilisant le fer ferreux comme substrat énergétique. La séquence du fragment Sed 2, correspondant à l'espèce contaminant le *Thiobacillus* isolé à partir des sédiments lagunaires a confirmé son affiliation avec le genre *Acidiphilium* de la subdivision α des Protéobactéries, mais n'a toutefois pas permis l'identification de l'espèce.

Donc, pour ce qui est de certaines espèces inconnues qui seront amplifiées à partir du procédé de biolixiviation, on pourra s'attendre à ce que l'analyse de la séquence pourra mener à l'identification au niveau de l'espèce. Mais pour d'autres espèces, une telle analyse se limitera à établir leur appartenance à des taxons de niveaux supérieurs. La construction d'arbres phylogénétiques englobant plusieurs espèces connues devrait être en mesure de

mettre en perspective l'affiliation des inconnus. Cependant, une attention particulière devra être portée sur la détection de molécules chimériques, car si un mélange de deux espèces a mené à la formation du fragment chimérique Sed 2, les risques associés à ce phénomène devraient être accrus lors de l'amplification à partir des boues d'épuration. La formation de ces molécules hybrides, découle vraisemblablement de processus de recombinaison, qui ont lieu lors de l'amplification par PCR, entre des fragments de forte homologie, comme c'est typiquement le cas pour l'ADNr 16S (Shuldiner et al. 1989; Meyerhans et al. 1990; Liesack et al. 1991). Dans le cas de Sed 2, il a été possible de déterminer les molécules "parentales" ayant donné lieu à la formation de ces fragments, car les souches bactériennes avaient été caractérisées en culture. Mais pour ce qui est des espèces inconnues non cultivées, ces informations ne seront pas disponibles. Nous ne disposons d'aucune méthode pour prévenir la formation de telles molécules et la détection de celles-ci revêt une importance majeure. En effet, les séquences chimériques peuvent donner lieu à des interprétations erronnées quant à la découverte d'espèces faisant partie de nouvelles lignées évolutives, à l'évaluation de la biodiversité, et contribuer à la dégradation de la qualité des banques de gènes (Kopczynski et al. 1994).

En conclusion, l'étude des divers aspects liés à la validité de l'approche moléculaire indique que l'application de celle-ci devrait être en mesure de fournir plusieurs informations quant à la diversité des populations bactériennes lors du procédé de biolixiviation dans les boues. Le DGGE pourra être utilisé comme méthode analytique pour rapidement connaître la diversité bactérienne, mais également comme technique de purification des fragments de gènes, afin d'orienter les étapes de clonage et de séquençage. Malgré les limites imposées par la courte longueur du fragment de gène analysé, cette approche a le potentiel de révéler beaucoup plus d'informations que les techniques de culture, en ce qui a trait à la détection, l'identification et l'affiliation des espèces (Ferris et al. 1996; Santegoeds et al. 1996). L'analyse moléculaire des populations présentes dans le procédé de biolixiviation dans les boues d'épuration constitue le sujet du chapitre IV.

CHAPITRE IV: ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ BACTÉRIENNE LORS DU PROCÉDÉ DE BIOLIXIVIATION

4.1 Introduction

Au chapitre II, nous avons mis en évidence un mécanisme synergique entre *T. ferrooxidans* et des micro-organismes hétérotrophes, accroissant l'efficacité du processus de biolixiviation. En effet, nous avons d'abord démontré l'importance du rôle des micro-organismes hétérotrophes sur la croissance de *T. ferrooxidans* en milieu synthétique. Lors du traitement des boues par le procédé de biolixiviation, cet effet synergique s'est vérifié et s'est même révélé essentiel. Un consortium microbien, actif du point de vue métabolique, est vraisemblablement présent dans les conditions du procédé. Ce consortium aurait un rôle au niveau de la dégradation de la matière organique potentiellement toxique pour *T. ferrooxidans*, de même qu'au niveau de la production de CO_2, métabolite d'importance majeure pour cette espèce autotrophe. Mais en plus des espèces impliquées dans la minéralisation du carbone, d'autres micro-organismes, sélectionnés par les conditions du procédé, pourraient croître à partir des composés présents dans ce milieu.

Comme les boues d'épuration sont constituées de la fraction sédimentée des eaux usées traitées, la diversité bactérienne devrait être très importante. Étant donné les préoccupations liées à la disposition sécuritaire des boues d'épuration, la littérature rapporte surtout la détection des organismes pathogènes dans ce milieu. Au tableau 1.1, nous avons cité des espèces de coliformes potentiellement entéropathogènes, telles que *E. coli*, *Shigella spp.* et *Salmonella spp.*, de même que des espèces de *Mycobacterium* et de *Clostridium* (Dudley et al. 1980; Scarpino et al. 1988; Parmelee 1990; Craun 1991; Keene 1994; Grant et al. 1996; Wallace 1987; von Reyn et al. 1994; Hill et al. 1996). Cependant, l'analyse des bactéries indicatrices de pathogènes a révélé que la biolixiviation induisait une importante réduction de celles-ci, rendant les boues conformes aux recommandations du guide québécois de valorisation de cette biomasse (Gouvernement du Québec 1991; Blais et al. 1992). Selon Blais et al. (1992), la diminution des organismes indicateurs serait attribuable à l'acidification du milieu, car la baisse de concentration de ces bactéries est observée lorsque le pH atteint une valeur inférieure à 2,7.

Des travaux antérieurs ont porté sur l'analyse de la diversité bactérienne hétérotrophe dans les boues subissant un traitement de biolixiviation similaire à celui étudié dans ce travail (Gamache 1996). Après avoir utilisé de nombreux types de milieux, cet auteur a révélé la présence de quelques bactéries telles que *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* et *Klebsiella sp.* Par contre, celles-ci furent essentiellement détectées avant l'amorce du traitement. La concentration de toutes ces espèces a subi une chute drastique, pour disparaître sous la limite de détection lorsque le procédé de biolixiviation a débuté. Seule une levure du genre *Blastoschizomyces sp.*, de même que des moisissures, furent détectables tout au long du processus. Suite à ce travail, on pouvait conclure que la diversité bactérienne hétérotrophe était nulle dans les conditions du procédé.

Cependant, tel que mentionné précédemment, il appert que la culture des micro-organismes ne peut permettre une évaluation réaliste de la diversité des communautés microbiennes complexes. La culture sélectionne les espèces dont la croissance est rapide, au détriment d'espèces peut-être plus nombreuses et peut-être plus importantes. De plus, il faut garder en tête l'estimation rapportée au chapitre I, mentionnant que plus de 80% des bactéries n'ont pas encore été cultivées en laboratoire (Giovannoni et al. 1990; Ward et al. 1990). Des analyses moléculaires, qui s'affranchissent de ces biais, ont été appliquées à l'étude de la diversité bactérienne lors du traitement des eaux usées. Celles-ci ont mis en évidence l'importance des Protéobactéries de la subdivision β, mais ont aussi révélé des espèces des subdivisions α et γ, des espèces de la branche *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, des *Planctomyces* et espèces reliées, de même que des bactéries Gram positives (Wagner et al. 1993; Manz et al. 1994; Bond et al. 1995; Wallner et al. 1995; Rossello-Mora et al. 1995; Mobarry et al. 1996; Amann et al. 1996; Manz et al 1996; de los Reyes et al. 1997). Étant donné l'intensité du signal obtenu suite à l'hybridation avec des sondes pour l'ARN ribosomique, plusieurs bactéries manifestaient une forte activité au niveau de la synthèse de protéines, ce qui témoignait de leur activité dans le procédé (Manz et al. 1994; Wallner et al. 1995).

Du point de vue fonctionnel, les bactéries associées aux boues activées sont impliquées au niveau de la minéralisation du carbone organique, processus particulièrement performant à l'intérieur des flocs microbiens, ces derniers étant nombreux dans des conditions d'exploitation optimales. Des espèces participent au niveau de l'enlèvement du phosphore et d'autres sont impliquées dans le processus de réduction de l'azote par nitrification-

dénitrification (Prakasam et Dondero 1967; Siefert et al. 1978; Völsch et al. 1990; Wagner et al. 1994; Bond et al. 1995; Rossello-Mora et al. 1995; Hiorns et al. 1995). Enfin plusieurs autres espèces retrouvées dans les boues induisent une mauvaise décantation de l'eau traitée et empêchent l'obtention d'un effluent adéquatement purifié. Il s'agit notamment de *Sphaerotilus natans*, *Thiothrix sp.*, *Microthrix parvicella* et également plusieurs espèces Gram positives de la branche des actinomycètes (Williams et Unz 1985; Lechevalier et Lechevalier 1974; Eikelboom 1975; Lemmer et Kropenstedt 1984; Kohno 1988; Howgrave-Graham et Stein 1988; Blackall et al. 1989a, 1989b; Sodell et Seviour 1990; Blackall 1993; Amann et al. 1996; Stratton et al. 1996).

Nous avons donc utilisé les méthodes développées au chapitre III afin de révéler la diversité des espèces bactériennes, lors de la phase de latence et lors de la phase logarithmique du procédé de biolixiviation dans les boues. En parallèle à cela, des échantillons ont été pris tout au long du procédé et furent mis en culture sur boîte de Pétri, afin de comparer les résultats que fournissent ces deux approches. Les résultats devraient nous permettre de savoir s'il persiste dans les conditions du procédé des espèces hétéretrophes, capables d'exercer un rôle synergique sur la croissance de *T. ferrooxidans*. Et puisque la destruction des organismes pathogènes fait aussi partie des objectifs du procédé de biolixiviation, nous verrons si les analyses moléculaires corroborent les résultats obtenus par la culture de ceux-ci.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Micro-organismes, milieux de culture et essais de biolixiviation

La souche de *T. ferrooxidans* ATCC 19859 a été utilisée comme inoculum, dans le procédé de biolixiviation dans les boues. Cette souche était maintenue dans le milieu MS-Fe, tel que décrit à la section 2.2.1 (Harrison 1984). La levure *Rhodotorula rubra*, qui fut isolée à partir de sédiments lagunaires, était maintenue dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu, décrit à la section 2.2.1. Cette levure a servi à l'inoculation des boues stérilisées, lors des expériences de co-cultures avec *T. ferrooxidans*, tel que décrit à la section 2.2.3.3. Brièvement, des boues furent pré-acidifiées à pH 3,5, additionnées de 4% de sulfate ferreux et inoculées avec une concentration finale de $2x10^5$ *T. ferrooxidans* /ml. Les cultures furent réalisées à température de la pièce, sous forte agitation. Pour ce qui est des co-cultures de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra*, les procédures étaient les mêmes, sauf que les boues étaient préalablement stérilisées tel que décrit à la section 2.2.3.3 et qu'une concentration $2x10^5$ de *R. rubra*/ml était aussi ensemencée.

4.2.2 Étude de la diversité microbienne dans le procédé de biolixiviation

4.2.2.1 Isolement et culture des micro-organismes

Des cultures sur milieux solides ont été réalisées pour révéler la diversité microbienne et le dénombrement de *T. ferrooxidans* tout au long du procédé de biolixiviation dans les boues. Comme les micro-organismes se regroupent en aggrégats passablement denses, des échantillons de 1 ml étaient prélevés et mélangés à 1 g de billes de verres de 3 mm de diamètre stérilisées, puis étaient agités vigoureusement au vortex, tel que décrit par Dudley et al. (1980). Des dilutions de 10^1 à 10^6 furent réalisées dans une solution d'acide sulfurique à pH 3,5. Un volume de 0,1 ml de ces dilutions était étalé en duplicata, sur des géloses MS-Fe-Ye et MS-Fe-Ye-Glu, lesquelles étaient incubées à 30°C sous atmosphère humide, jusqu'à l'obtention d'un nombre stable de colonies. Des observations en microscopie à contraste de phase des colonies obtenues et des échantillons de boues durant le procédé de biolixiviation ont aussi été réalisées.

4.2.2.2 Étude de la diversité génétique

Pour l'étude de la diversité génétique, des échantillons furent prélevés lors des essais de biolixiviation et furent congelés à -35°C, jusqu'à ce qu'ils soient analysés. Un schéma

global illustrant la procédure d'analyse moléculaire des échantillons est présenté à la Figure 4.1.

4.2.2.2.1 Extraction, purification et amplification de l'ADNr 16S

L'ADN des bactéries fut extrait et purifié selon les techniques décrites à la section 3.2.2. Par la suite, l'amplification partielle du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries a été réalisée, par la technique de PCR décrite à la section 3.2.3.

4.2.2.2.2 Séparation et purification des fragments de PCR sur DGGE

Aprés vérification des réactions et des contrôles sur gel d'agarose 1,5%, un volume de 25 à 40 µl des réactions de PCR était appliqué sur DGGE et la séparation était réalisée selon les conditions précisées à la section 3.3.4. Pour la purification des fragments, les bandes d'ADN colorées au bromure d'éthidium étaient découpées du gel de polyacrylamide, puis incubées une nuit à 37°C avec 200 µl de tampon élution (acétate d'ammonium 0,5 M [pH 8,0], EDTA 1,0 mM) (Ausubel et al. 1994). Les morceaux de gel étaient ensuite rincés avec 50 µl de tampon élution, puis l'ADN était précipitée avec de l'éthanol et resuspendu dans un volume minimal d'eau stérile. L'amplification des fragments purifiés était réalisée de nouveau par PCR, tel que décrit à la section 3.2.3.1 et la pureté de ceux-ci était vérifiée sur DGGE. Cette procédure pouvait être reprise jusqu'à 3 fois, jusqu'à obtention d'une bande unique sur DGGE (cf. Figure 4.1).

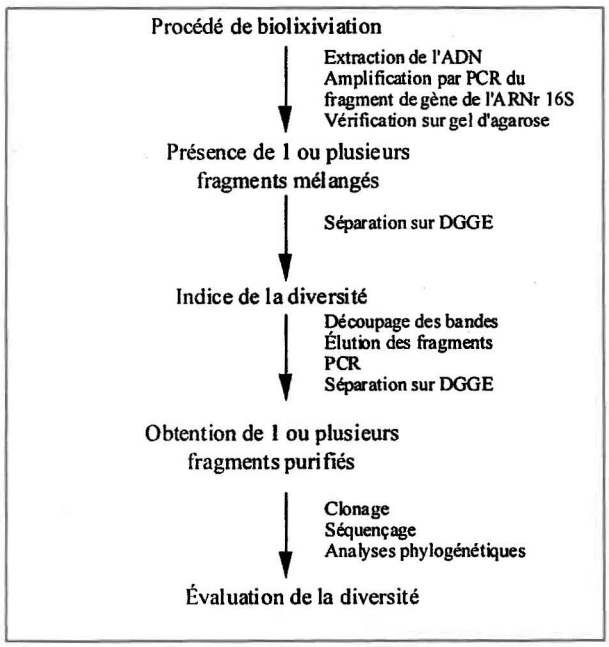


Figure 4.1 Stratégie globale utilisée pour l'analyse de la diversité génétique.

4.2.2.2.3 Clonage et séquençage des fragments de PCR

La stratégie de clonage basée sur la ligation des extrémités franches des produits de PCR, avec celles du vecteur pBlueScript, suivie de la transformation de *E. coli* JM 109 par électroporation, a été utilisée pour la majeure partie des fragments et est détaillée à la section 3.2.5. Toutefois, d'autres stratégies ont été utilisées pour accroître le rendement de clones produits, soit en modifiant les sites de ligation des fragments, soit en modifiant la technique de transformation. La méthode de clonage "T-overhang", qui tire avantage du fait que les extrémités 3' des fragments de PCR amplifiés avec la *Taq* ADN polymérase possèdent typiquement des résidus adénine, a été utilisée à quelques reprises. Cette méthode requiert la linéarisation du vecteur pBlueScript avec l'enzyme *Eco* RV et la modification des extrémités 3' par ajout de résidus thymine, avec de la *Taq* (Ausubel et al. 1994). L'ajout de thymine fut réalisée en mélangeant à 5 µg de vecteur linéarisé, 10 µl de tampon de PCR 10x, 1 µl de dTTp 100 mM et 5 U de *Taq* ADN polymérase; le mélange était alors incubé à 72°C pendant 2 heures. Bien qu'elle fut moins performante que l'approche basée sur la ligation des extrémités franches, cette approche a permis le clonage de quelques fragments de PCR. Cependant, une version commerciale de cette technique (pGEM-T vector system, Promega) s'avéra totalement inefficace. Quelques tentatives furent aussi réalisées dans le but de créer un site cohésif plus important, en exploitant le fait que l'amorce p2 utilisée pour le PCR comprenait un site de restriction SAC II. Cependant, cette approche s'avéra aussi beaucoup moins efficace que celle basée sur la ligation des extrémités franches.

Par la suite, la technique de transformation par électroporation fut changée pour la méthode décrite par Hanahan (1985). Cette méthode est basée sur la perméabilisation de la paroi bactérienne avec des sels de calcium, de rubidium et de cobalt. Son avantage principal est qu'elle permet le traitement de nombreux échantillons à la fois. Des réactions de ligation réalisées avec plusieurs fragments de PCR et réalisées selon différents rapports insert-vecteur, pouvaient être transfectées en même temps. Ainsi, la probabilité de transfecter des réactions de ligation ayant généré les hybrides voulus était accrue. Les étapes de sélections des clones positifs, de purification des plasmides et de révélation des fragments clonés furent réalisées tel que décrit à la section 3.2.5.

La procédure de séquençage fut la même que celle décrite au chapitre III. Mais pour quelques fragments, la séquence a été réalisée par le service de séquençage automatisé

(système ABI 302) du Pavillon Charles-Eugène Marchand de l'Université Laval. Au moins 2 clones ont été séquencés pour chacun des fragments et la plupart des séquences ont été déterminées sur les 2 brins.

4.2.2.3 Analyse des séquences et phylogénie

Pour les analyses phylogénétiques, plusieurs espèces bactériennes ont été utilisées pour constituer le groupe de référence. Tel que recommandé par Stackebrandt et Ludwig (1994), une bonne façon de constituer un groupe de référence est de choisir des espèces apparemment reliées et apparemment non reliées aux organismes dont on veut établir l'affiliation. Le tableau 4.1 rapporte les critères ayant servi à la sélection des espèces. Ainsi, lors de la réalisation des analyses phylogénétiques préliminaires, un important groupe de référence fut utilisé. Toutes les espèces ayant servi aux analyses phylogénétiques sont présentées à l'annexe C.

Tableau 4.1 Critères de sélection des espèces bactériennes utilisées comme groupe de référence pour les études phylogénétiques.

Critères de sélection	Commentaires
Représentation du domaine *Bacteria*	Échantillonnage dans tous les groupes, divisions et subdivisions
Espèces donnant les meilleures homologies de séquence	Espèces obtenues lors de la comparaison des fragments avec la banque de gènes
Espèces ayant une pertinence écologique	Espèces acidophiles, espèces saprophytes des procédés d'assainissement, pathogènes et bactéries indicatrices de pollution, espèces reliées aux cycles du soufre et du fer

Tel que détaillé au chapitre III, les séquences furent alignées avec le programme PILEUP (GCG; Devereux et al. 1984). Celles-ci furent toutes soumises à une analyse pour détecter la présence de molécules chimériques, réalisée avec le programme " Chimera Check" du Ribosomal database Project (Maidak et al. 1994). Ensuite, les comparaisons entre paires d'espèces furent établies selon la méthode de Kimura (1980), qui tient compte des transitions et des transversions, en utilisant le programme MEGA version 1.0 (Kumar et al. 1993). Les matrices de distance obtenues furent ensuite soumises à la méthode de "Neighbor-Joining" pour la reconstruction d'arbres phylogénétiques (Saitou and Nei, 1987). Les niveaux de confiance des topologies résultantes furent estimés en utilisant une procédure de "bootstrap", avec 500 réplications (Felsenstein 1985). Cette méthode statistique évalue la robustesse des noeuds des arbre phylogénétiques en procédant à un

échantillonage des sites avec remise. En fonction d'un échantillon donné, l'arbre est reconstruit et la valeur indique le nombre de fois sur 100 que l'arbre conserve la topologie présentée. Seules les topologies supportées par des valeurs de "bootstrap" supérieures à 50% sont présentées. Dans l'interprétation des résultats, nous avons considéré qu'une valeur de l'ordre de 50% était tout au plus indicatrice, tandis que les valeurs supérieures à 70% sont très stables, donc significatives du point de vue statistique (Hillis et Bull 1993). Lors des analyses préliminaires, les séquences inconnues se sont affiliées à 2 groupes disctincts, soit les espèces Gram positives et les autres espèces. Ces deux groupes furent par la suite traités séparément.

4.3 Résultats

4.3.1 Isolement et culture des micro-organismes

Durant les essais de biolixiviation, la cuture des micro-organismes sur milieux solides MS-Fe-Ye et MS-Fe-Ye-Glu a été réalisée dans le but de connaître la diversité microbienne autotrophe et hétérotrophe et de faire le suivi de la croissance de *T. ferrooxidans* (résultats non montrés). D'abord, les comptes de colonies ne nous ont pas permis d'effectuer le suivi de la croissance de *T. ferrooxidans*. Des colonies jaunes, incrustées de fer ferrique ont poussé sur les géloses MS-Fe-Ye, mais le diamètre de celles-ci était plus important que celui des colonies normalement formées par *T. ferrooxidans*. L'observation microscopique de ces colonies a révélé la présence de bacilles, mais aussi d'un nombre plus important de levures. Ces colonies "mixtes" furent observées non seulement durant la co-culture de *T. ferrooxidans* et de *R. rubra* dans les boues stérilisées, mais aussi chez les cultures de *T. ferrooxidans* dans les boues non stérilisées. Les isolements réalisés sur MS-Fe-Ye-Glu à partir de la co-culture de *T. ferrooxidans* et de *R. rubra* ont mis en évidence la présence des colonies rosées de *R. rubra*. Et comme mentionné au chapitre II, la culture faite à partir du procédé réalisé dans les boues non stérilisées, uniquement inoculées avec *T. ferrooxidans*, a également révélé la présence de colonies rosées, très similaires à celles de *R. rubra*. Les cellules formant ces colonies avaient d'ailleurs une morphologie fortement similaire aux cellules de *R. rubra*. Deux autres types de colonies furent observées sur les milieux additionnés de glucose, soit des colonies blanches formées par des levures, ainsi que de mycéliums, formés par des hyphes segmentés. L'examen microscopique des boues a révélé la présence de nombreux aggrégats cellulaires, formés majoritairement de levures, de filaments et de précipités ferriques.

4.3.2 Diversité bactérienne et purification des fragments de PCR

Afin de connaître l'ampleur de la diversité bactérienne dans le procédé de traitement des boues, des échantillons prélevés lors du procédé de biolixiviation ont été amplifiés par PCR avec des amorces universelles pour l'ADNr 16S des bactéries. Après séparation sur DGGE, une seule bande fut obtenue pour l'échantillon prélevé à partir de la co-culture de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra*, dans les boues stérilisées (résultat non montré). Par contre, la diversité observée a été beaucoup plus importante dans les boues non stérilisées, inoculées avec *T. ferrooxidans* (Figure 4.2). Que ce soit pour la phase de latence, correspondant à quelques heures d'incubation, ou pour la phase logarithmique tardive, correspondant à plus de quatre jours d'incubation en condition acide (Figure 2.7a), le

patron de bandes obtenu fut très similaire (Figure 4.2). En effet, on observe un total d'au moins vingt bandes, dont la moitié sont d'intensité significative. Cependant, la comparaison des deux stades de culture montre quelques différences au niveau de l'intensité des bandes.

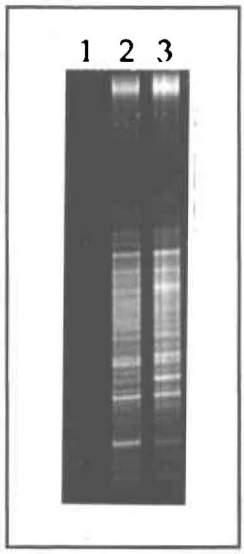


Figure 4.2 Séparation par DGGE des fragments de PCR amplifiés à partir d'ADN isolé du xprocédé de biolixiviation des boues d'épuration. 1, boues stérilisées sans inoculum; 2, échantillon pris lors de la phase de latence; 3, échantillon pris lors de la phase logarithmique.

La purification de 11 bandes générées à partir de l'amplification de l'ADN provenant du procédé en phase logarithmique a été réalisée par cycles successifs de PCR et DGGE (Figure 4.3). Le même nombre de bandes a été purifié pour un second échantillon, prélevé à partir du même stade d'une culture subissant le traitement de biolixiviation, dans les mêmes conditions. Cependant, l'échantillonnage des bandes à partir des DGGE s'est fait de façon aléatoire et les fragments ne sont pas nécessairement les mêmes pour les deux cultures. L'unique fragment obtenu à partir de la co-culture de *T. ferrooxidans* avec *R. rubra* a été purifié.

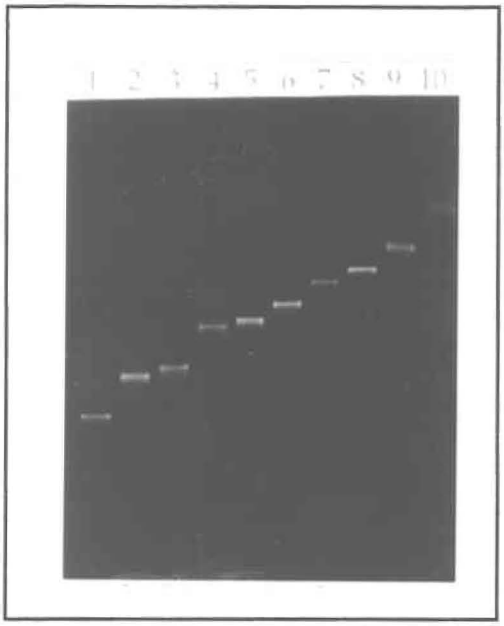


Figure 4.3 Séparation par DGGE des fragments de PCR amplifiés à partir d'ADN isolé durant le procédé de biolixiviation des boues d'épuration. 1-9, souches inconnues nommées Bio1-1 à 1-9; 10, souches Bio1- 10 et 1-11 (de bas en haut).

4.3.3 Clonage et séquençage des fragments de gènes

Les fragments purifiés furent ensuite clonés et séquencés. Le Tableau 4.2 regroupe les fragments de gènes dont la séquence a été déterminée. Les séquences ont été nommées Bio 1-1 à Bio 1-11 et Bio 2-1 à Bio 2-11 pour les fragments obtenus à partir des 2 cultures indépendantes de boues subissant le procédé de biolixiviation. L'échantillon 3 n'inclut que Bio T.-f., fragment obtenu à partir de la co-culture de *T. ferrooxidans* et de *R. rubra* dans des boues stérilisées. Même si la purification par DGGE a permis d'orienter les efforts de clonage et de séquençage, il faut mentionner que à quelques reprises, le séquençage provenant de deux clones générés à partir d'un même fragment a révélé deux séquences différentes. Dans cette situation, un troisième clone était séquencé, puis un quatrième si nécessaire, jusqu'à l'obtention de deux fragments identiques.

Suite à l'analyse des fragments d'ADN avec le programme "Chimera Check", il semble que quatre fragments soient de nature chimérique, soit deux dans chacune des deux cultures analysées (Tableau 4.2). Les résultats obtenus pour Bio 1-2, Bio 1-4, Bio 2-2 et Bio 2-5 sont montrés à l'annexe C. On y observe que ces quatre molécules ont été fragmentés en deux parties. Tandis que la première partie de ces molécules semble similaire avec des espèces connues, la seconde ne semble pas affiliée avec aucune espèce en particulier.

Comme le témoignent les valeurs de similarité indiquées pour la région formée par les 40 premiers nucléotides des fragments Bio 1-4 et Bio 2-5, il semble que ceux-ci ont été formés par des molécules d'ADN "parentales" fortement similaires (annexe C).

Tableau 4.2 Nom des fragments et nombre de clones séquencés pour la caractérisation des bactéries provenant du procédé de biolixiviation.

Nom du fragment et nombre de clones séquencés					
Échantillon 1		**Échantillon 2**		**Échantillon 3**	
Bio 1-1	2	Bio 2-1	4	Bio T.-f.	2
Bio 1-2[1]	3	Bio 2-2[1]	2		
Bio 1-3	2	Bio 2-3	2		
Bio 1-4[1]	2	Bio 2-4	6		
Bio 1-5	2	Bio 2-5[1]	2		
Bio 1-6	2	Bio 2-6	2		
Bio 1-7	2	Bio 2-7	3		
Bio 1-8	3	Bio 2-8	2		
Bio 1-9	2	Bio 2-9	2		
Bio 1-10	2	Bio 2-10	2		
Bio 1-11	2	Bio 2-11	2		

1) Ces fragments sont des molécules de type chimérique.

Afin de mieux préciser ces similarités, une matrice de distances a été réalisée selon la méthode de Kimura, en utilisant ces trois fragments inconnus, de même que les espèces les plus homologues révélées par l'analyse des chimères. Les taux de similarité maximum obtenus pour les 40 premiers nucléotides sont de 96% entre Bio 1-4 et *Bacillus pabuli*, et de 91% entre Bio 2-5, *Bacillus pabuli* et *Peptococcus niger* (résultat non montré). En ce qui concerne le fragment formé par les 80 nucléotides suivants, le fragment Bio 1-2 montre une similarité de 85% avec *Chloroflexux aurantiacus*. Les 80 nucléotides suivants de Bio 2-5 sont très faiblement similaires avec plusieurs espèces, incluant *Chlorobium limnicola* et de l'ADN de chloroplaste. La similarité du fragment formé par les 40 premiers nucléotides de Bio 2-2 est de 96% avec *Spirocheta halophila* et *Treponema denticola* (résultat non montré). Les 80 nucléotides suivants de Bio 2-2 sont très faiblement similaires avec des espèces de *Planctomyces*. La fragmentation de Bio 1-2 indique que ses dix premiers nucléotides se montrent similaires à 100% avec un groupe formé d'espèces Gram positives, incluant *Clostridium* spp. *Eubacterium* spp. et *Streptococcus* spp., qui sont phylogénétiquement reliés (cf. annexe C). Si on considère le fragment formé par les nucléotides 10 à 128, la molécule s'est montrée beaucoup plus faiblement similaire à des

espèces diverses, qui ne présentent pas d'affiliation entre elles. Comme c'est *Chloroflexux aurantiacus* qui semble l'espèce la plus similaire, sa séquence fut soumise à l'analyse "Chimera Check". Le résultat obtenu indique que la molécule est fragmentée en 2 régions qui ont des taux de similarité maximum avec *Chloroflexux aurantiacus* (cf. annexe C).

Par ailleurs, ces quatre fragments ont été intégrés dans une analyse phylogénétique préliminaire. Le fragment Bio 1-2 se regroupe avec *Chloroflexux aurantiacus* avec une faible valeur de bootstrap de 63. Les trois autres fragments, soit Bio 1-4, Bio 2-2 et Bio 2-5 se retrouvent dans une même branche de l'arbre, celle-ci étant reliée à une branche formée par *Planctomyces limnophilus* et *Pirellula sp.*, avec une valeur de bootstrap de 53. Comme il est très difficile de démontrer que ces molécules ne sont pas des artefacts de PCR, celles-ci ont été exclues des analyses phylogénétiques subséquentes. En excluant ces molécules semblant de nature chimérique, un total de 19 séquences, soit 18 inconnus et *T. ferrooxidans* étaient disponibles pour analyse.

4.3.4 Analyses phylogénétiques

Les échantillons ayant été choisis pour l'analyse DGGE et pour le séquençage sont: un témoin négatif (boues stérilisées sans inoculum); un échantillon provenant du procédé normal en phase de latence (DGGE seulement); deux échantillons provenant de deux cultures indépendantes du procédé normal en phase logarithmique tardive (*T. ferrooxidans* inoculé aux boues non stérilisées); un échantillon provenant de la co-culture de *T. ferrooxidans* et *R. rubra* (dans des boues stérilisées).

Les analyses phylogénétiques ont confirmé l'importance de la diversité observée par DGGE, car les 18 inconnus se sont distribués parmi six groupes bactériens majeurs, soit les bactéries Gram positives ayant une forte teneur en G+C, les bactéries Gram positives ayant une faible teneur en G+C, les Protéobactéries des subdivisions α, β, et δ et le groupe des *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*. Pour ce qui est des quatre fragments chimériques, les analyses phylogénétiques préliminaires n'avaient pas permis d'établir leur affiliation avec des groupes taxonomiques connus.

Les fragments de *E. coli*, *T. ferrooxidans* et *T. acidophilus* dont les séquences ont été analysées au chapitre III ont aussi été intégrés lors des analyses phylogénétiques et sont aussi présentés dans les arbres. Comme mentionné à la section 4.2.3.3, l'arbre englobant les espèces Gram positives a été construit séparément, en utilisant *E. coli* comme groupe

externe ("outgroup"). Un second arbre, englobant toutes les autres espèces, a été construit en utilisant *Thermotoga subterannea* comme groupe externe. Ce second arbre sera présenté en deux parties, mettant en évidence la division *Proteobacteria* et le groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*. Le nombre d'espèces composant les groupes de référence ayant servi au calcul des distances était plus important que le nombre d'espèces présenté dans les arbres. Certains taxons ont été enlevés afin de ne pas alourdir inutilement les topologies obtenues, mais ceux-ci sont retrouvés dans les alignements présentés à l'annexe C. Dans le but de présenter les affiliations phylogénétiques le plus clairement possible, les topologies obtenues par la reconstruction des arbres phylogénétiques seront présentées, mais les taux de similarité les plus importants seront également présentés pour chacun des inconnus.

4.3.4.1 Bactéries Gram positives

La Figure 4.4 regroupe dans un arbre phylogénétique, les espèces inconnues qui se sont affiliées aux bactéries Gram positives.

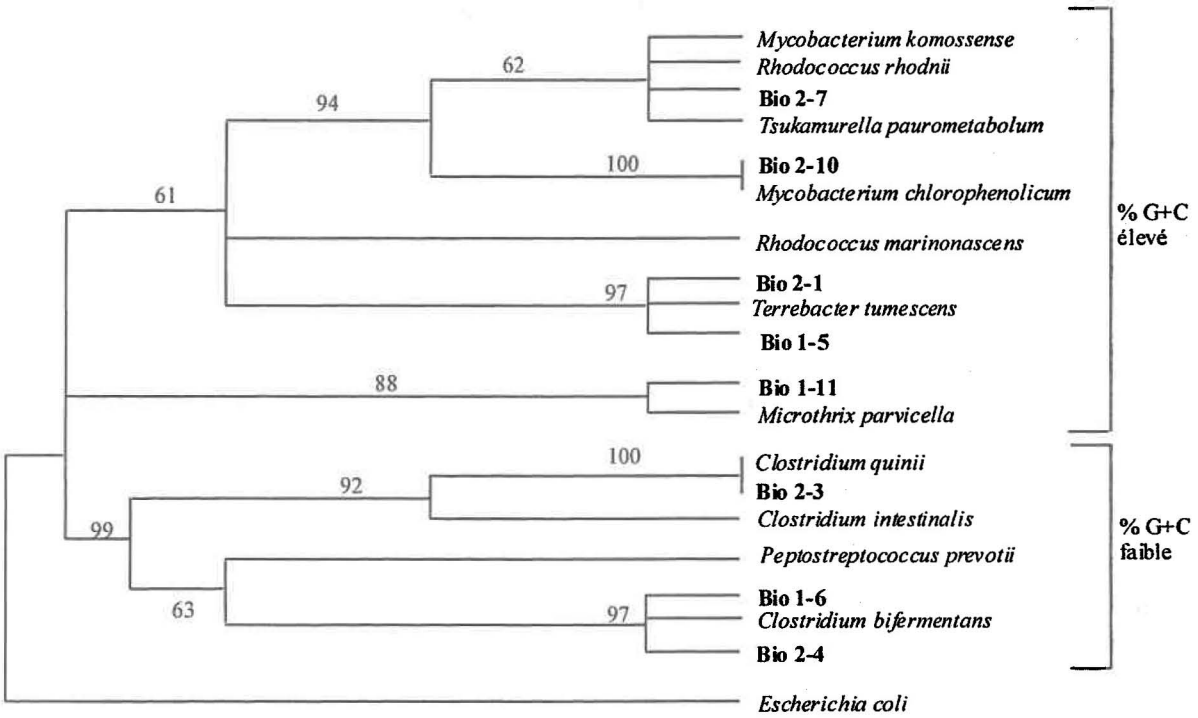


Figure 4.4 Relations phylogénétiques entre les espèces Gram positives et les fragments obtenus à partir du procédé de biolixiviation. L'arbre fut construit selon la méthode de "Neighbor-Joining", sur la base de distances calculées selon la méthode de Kimura.

Les fragments purifiés à partir de l'échantillon 1 ont révélé trois espèces Gram positives, tandis que ceux purifiés à partir de l'échantillon 2 en ont révélé cinq. À l'exception de la branche formée par *Microthrix parvicella* et Bio 1-11, la topologie de l'arbre reconstitue les niveaux taxonomiques supérieurs retrouvés chez les epèces Gram positives. En effet, les espèces se sont classées en deux groupes distincts, incluant les espèces à forte teneur en G+C et les espèces à faible teneur en G+C. Le noeud de la branche formée par les bactéries Gram positives à forte teneur en G+C est supporté par une valeur de "bootstrap" de 61%, tandis que celui reliant les *Clostridium* et espèces reliées est beaucoup plus fort, avec une valeur de "bootstrap" de 99%.

4.3.4.1.1 Bactéries Gram positives ayant une teneur élevée en G+C

La similarité entre les fragments Bio 1-5 et Bio 2-1, est de 100%. Ceux-ci partagent respectivement un taux de similarité de 100% et de 99% avec les actinomycètes *Terrebacter tumescens* et *Streptomyces macrosporus* (Tableau 4.3). L'arbre phylogénétique indique que ces deux fragments sont regroupés avec *Terrebacter tumescens*, avec une très forte valeur de "bootstrap" de 97%. Bio 1-11 partage un taux de similarité de 95% avec *Frankia sp.* et un taux de 94% avec la souche TH3 et *Actinomadura glomerata*. Cependant, il s'est plutôt affilié avec un autre actinomycète, soit *Microthrix parvicella*, avec qui il partage une similarité de 92% ("bootstrap" de 88%). Notons que *M. parvicella* fait partie du groupe des bactéries ayant une forte teneur en G+C élevée. Cependant, la courte longueur des fragments étudiés ne fournit pas assez d'informations pour la relier à cette branche. L'affiliation de Bio 2-7 avec un groupe de bactéries phylogénétiquement reliées, incluant *Mycobacterium komossense*, *Rhodococcus rhodnii* et *Tsukamurella paurometabolum*, est supportée par une valeur de bootstrap de 62%. Par ailleurs, la topologie associant Bio 2-10 avec *Mycobacterium chlorophenolicum* est statistiquement beaucoup plus forte, puisqu'elle est appuyée par une valeur de "bootstrap" de 100%.

4.3.4.1.2 Espèces Gram positives ayant une teneur faible en G+C

Les fragments Bio 1-6 et Bio 2-4, qui sont entre eux similaires à 100%, partagent un taux de similarité de 100% avec *Clostridium bifermentans*. D'ailleurs, l'arbre indique que ces deux inconnus se sont étroitement liés à *Clostridium bifermentans*, avec une valeur de "bootstrap" de 97%. Pour sa part, Bio 2-3 s'est retrouvé plutôt affilié avec *Clostridium quinii*, dont la topologie est soutenue par une valeur de "bootstrap" de 100%.

Tableau 4.3 Meilleurs taux de similarité observés entre les fragments inconnus et les bactéries Gram positives[1].

Nom de l'inconnu	Espèce donnant le meilleur taux	% Similarité	Espèce donnant le 2ème meilleur taux	% Similarité
Bio 1-5	*Terrebacter tumescens*	100	*Streptomyces macrosporus*	99
	Fort % G+C		Fort % G+C	
Bio 1-6	*Clostridium bifermentans*	100	*Clostridium intestinalis*	93
	Faible % G+C		Faible % G+C	
Bio 1-11[2]	*Frankia sp.*	95	Souche TH3	94
	Fort % G+C		Fort % G+C	
Bio 2-1	*Terrebacter tumescens*	100	*Streptomyces macrosporus*	99
	Fort % G+C		Fort % G+C	
Bio 2-3	*Clostridium quinii*	100	*Clostridium intestinalis*	99
	Faible % G+C		Faible % G+C	
Bio 2-4	*Clostridium bifermentans*	100	*Clostridium intestinalis*	93
	Faible % G+C		Faible % G+C	
Bio 2-7	*Mycobacterium komossense*	99	*Rhodococcus rhodnii*	98
	Fort % G+C		Fort % G+C	
Bio 2-10	*Mycobacterium chlorophenolicum*	100	*Rhodococcus rhodnii*	97
	Fort % G+C		Fort % G+C	

1) Les taux de similarité ont été obtenus avec les distances évaluées selon la méthode de Kimura.
2) Le fragment Bio 1-11 partage également un taux de similarité de 94% avec *Actinomadura glomerata.*

4.3.4.2 Division *Proteobacteria*

L'arbre phylogénétique présenté à la Figure 4.5 regroupe les séquences provenant d'espèces inconnues, qui se sont affiliées à la division des Protéobactéries.

Tel qu'attendu, l'arbre phylogénétique indique que *T. ferrooxidans* et Bio T.-f., qui est la souche ATCC 19859 ayant été inoculée aux boues, furent regroupés ensemble. Par ailleurs, la fragment Sed 1 provenant de la souche de *T. ferrooxidans* isolée à partir de sédiments lagunaires fut aussi regroupée dans cette branche (résultat non montré). Comme en témoigne le taux de similarité de 100% obtenu entre Bio T.-f. et *T. ferrooxidans* N-Fe3, ces fragments furent très étroitement associés dans l'arbre, avec une valeur de "bootstrap" de 99%. À un niveau taxonomique supérieur, ces fragments se sont regroupés avec *Thiobacillus thiooxidans*, avec une topologie appuyée par une valeur de "bootstrap" de 100%.

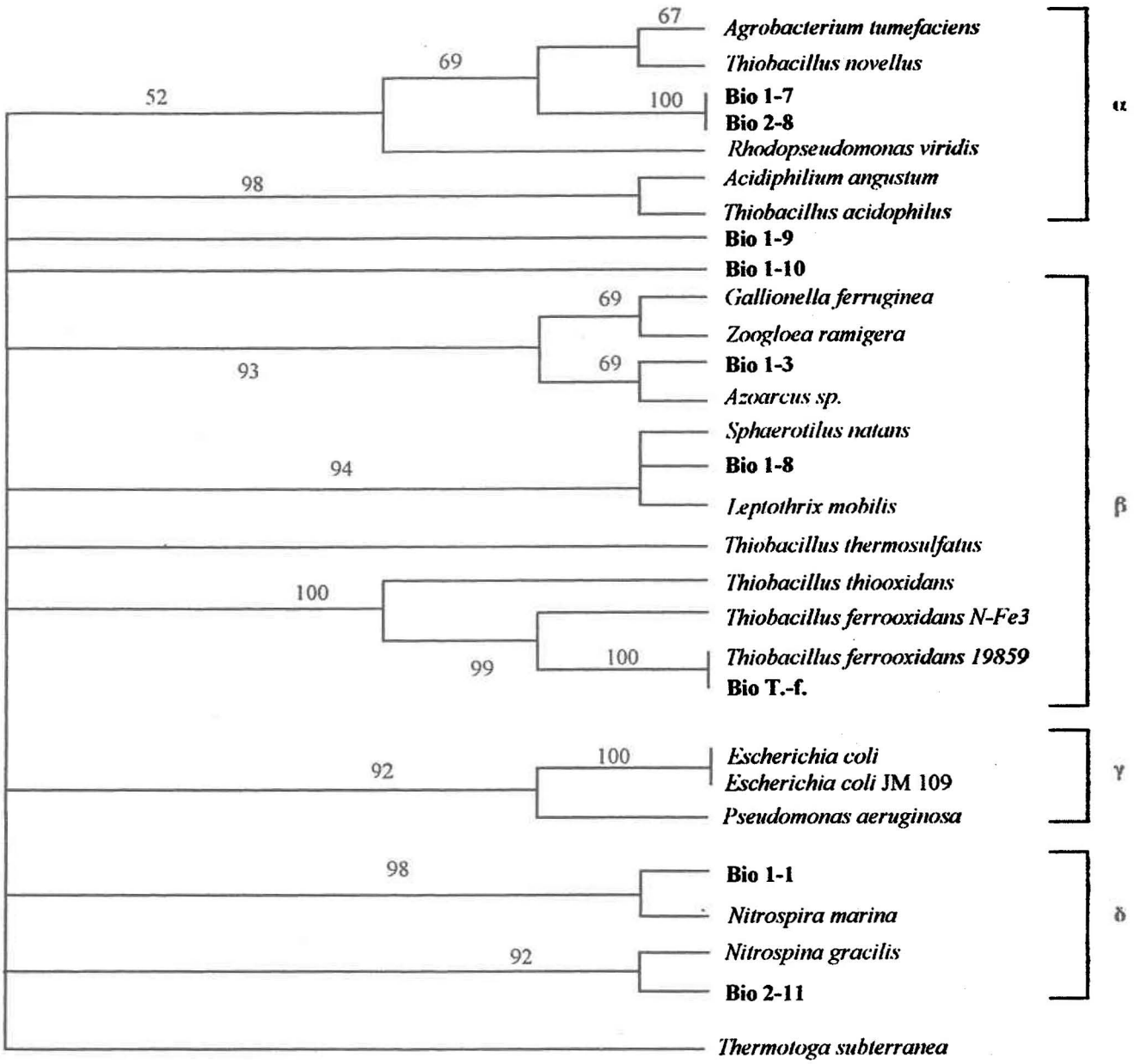


Figure 4.5 Relations phylogénétiques entre les Protéobactéries et les fragments obtenus à partir du procédé de biolixiviation. L'arbre fut construit selon la méthode de "Neighbor-Joining", sur la base de distances calculées selon la méthode de Kimura.

Le fragment Bio 1-10 partage un taux de similarité de 92% avec *Rhodopseudomonas viridis* de la subdivision α, et un taux de 91% avec deux espèces de la subdivision β, soit *Neisseria weaveri*, et *Telluria chytinolytica* (Tableau 4.4). L'arbre phylogénétique n'a pas

pu regrouper Bio 1-10 avec des espèces connues. Le fragment Bio 1-3 se montre fortement lié à un groupe d'espèces incluant *Azoarcus sp.*, *Gallionella ferruginea* et *Zoogloea ramigera*, car le noeud de la branche possède une valeur de "bootstrap" de 93%. La situation est similaire pour le fragment Bio 1-8 dont la séquence a permis son regroupement avec *Sphaerotilus natans* et *Leptothrix mobilis*, avec un degré de confiance élevé ("bootstrap" de 94%).

Thiobacillus acidophilus ATCC 27807 fut tel qu'attendu, regroupé avec *Acidiphilium angustum* de la subdivision α, avec la forte valeur de "bootstrap" de 98%. Les fragments Bio 1-7 et Bio 2-8 sont similaires à 100% et les comparaisons de séquences ont révélé des taux de similarité maximum de 98% avec *Xanthobacter flavus* et de 97% avec *Agrobacterium tumefaciens* de la subdivision α des Protéobactéries (Tableau 4.4). L'arbre phylogénétique est consistant avec ces données et regroupe ces fragments dans une branche supportée par une valeur de "bootstrap" de 69%. Le fragment Bio 1-9, affiche une similarité maximale avec ces deux mêmes espèces, mais les taux sont beaucoup plus faibles (Tableau 4.4). Ce fragment n'a pas pu être affilié à aucune subdivision des Protéobactéries.

En accord avec les taux de similarité présentés au Tableau 3.3, la topologie obtenue pour *E. coli* JM 109 indique que cette espèce se retrouve dans la même branche qu'une souche de *E. coli* provenant de la banque de gènes ("bootstrap" de 100%). On notera qu'aucune séquence obtenue à partir du procédé de biolixiviation ne s'est affiliée à la subdivision γ, qui regroupe les entérobactéries.

Le fragment Bio 1-1 partage un taux de similarité de 87% et 81% avec deux espèces de la subdivision δ, soit respectivement *Nitrospira marina* et *Nitrospina gracilis*. Il s'est affilié avec *Nitrospira marina* avec une valeur de "bootstrap" de 98%. Pour sa part, le fragment Bio 2-11 partage aussi une forte similarité avec des espèces de la subdivision δ, soit 89% avec *Nitrospina gracilis* et 87% avec *Polyangium cellulosum.* Dans l'arbre phylogénétique, cet inconnu s'est affilié avec *Nitrospina gracilis*, avec une valeur de "bootstrap" de 92%.

Tableau 4.4 Meilleurs taux de similarité observés entre les fragments inconnus avec les Protéobactéries[1].

Nom de l'inconnu	Espèce donnant le meilleur taux	% Similarité	Espèce donnant le 2ème meilleur taux	% Similarité
Bio 1-1	*Nitrospira marina* Subdivision δ	87	*Nitrospina gracilis* Subdivision δ	81
Bio 1-3	*Azoarcus sp.* Subdivision β	95	*Gallionella ferruginea* Subdivision β	91
Bio 1-7	*Xanthobacter flavus* Subdivision α	98	*Agrobacterium tumefaciens* Subdivision α	97
Bio 1-8	*Leptothrix mobilis* Subdivision β	92	*Sphaerotilus natans* Subdivision β	91
Bio 1-9	*Agrobacterium tumefaciens* Subdivision α	70	*Xanthobacter flavus* Subdivision α	69
Bio 1-10[2]	*Rhodopseudomonas viridis* Subdivision α	92	*Neisseria weaveris* Subdivision β	91
Bio 2-8	*Xanthobacter flavus* Subdivision α	98	*Agrobacterium tumefaciens* Subdivision α	97
Bio 2-11	*Nitrospina gracilis* Subdivision δ	89	*Polyangium cellulosum* Subdivision δ	87
Bio T.-f-	*Thiobacillus ferrooxidans* N- Fe3 Subdivision β	100	*Thiobacillus thiooxidans* Subdivision β	95

1) Les taux de similarité ont été obtenus à partir des distances évaluées selon la méthode de Kimura.

2) Le fragment Bio 1-10 partage également un taux de similarité de 91% avec *Telluria chytinolytica* de la subdivision β.

4.3.4.3 *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

La Figure 4.6 présente les deux espèces inconnues qui se sont affiliées au groupe *Cytophaga-Bacteroides-Flexibacter*. En général, on observe dans ce groupe une variabilité assez importante au niveau des homologies de séquences. Une matrice de distance, qui a été calculée pour un plus grand échantillon de genres bactériens faisant partie de ce groupe, tels que *Prevotella* et *Porphyromonas*, a confirmé cette forte variabilité, faisant en sorte que les taux de similarité se situent entre 70 et 80% (résultats non montrés).

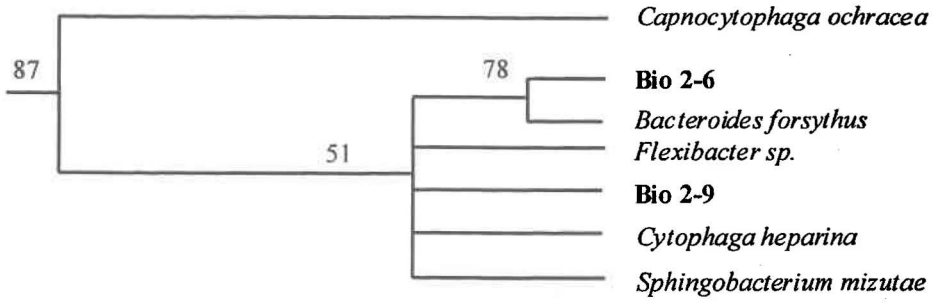


Figure 4.6 Relations phylogénétiques entre le groupe *Cytophaga-Bacteroides-Flexibacter* et les fragments obtenus à partir du procédé de biolixiviation. L'arbre fut construit selon la méthode de "Neighbor-Joining", sur la base de distances calculées selon la méthode de Kimura.

Le fragment Bio 2-6, qui partage un taux de similarité de 81% avec *Bacteroides forsythus* (Tableau 4.5), se retrouve phylogénétiquement affilié à cette espèce avec une valeur de "bootstrap" de 78%. Le fragment Bio 2-9 se montre plutôt affilié à un groupe incluant *Flexibacter sp.*, *Sphingobacterium mizutae* et *Cytophaga heparina*, entre lesquels les liens phylogénétiques sont mal résolus.

Tableau 4.5 Meilleurs taux de similarité observés entre les fragments inconnus et le groupe *Cytophaga-Bacteroides-Flexibacter*[1].

Nom de l'inconnu	Espèce donnant le meilleur taux	% Similarité	Espèce donnant le 2ème meilleur taux	% Similarité
Bio 2-6	*Bacteroides forsythus*	82	*Sphingobacterium mizutae*	78
Bio 2-9	*Flexibacter sp.*	81	*Sphingobacterium mizutae*	81

1) Les taux de similarité ont été obtenus à partir des distances évaluées selon la méthode de Kimura.

4.3.5 Bilan de la diversité totale

L'analyse par DGGE nous a révélé un minimum de 20 bandes, indiquant qu'au moins 20 espèces bactériennes sont présentes lors du procédé de biolixiviation. Cependant, d'après la Figure 4.2, il ressort que la résolution du DGGE a été limitante. Il est donc très probable que la diversité soit plus importante que les 20 bandes comptées. La séquence des neuf fragments purifiés à partir des deux cultures différentes a indiqué trois fragments identiques. De façon arithmétique, il est possible de calculer une "diversité minimale" de 15 espèces, correspondant à 9 fragments x 2 cultures= 18, nombre auquel on retranche les 3 "doublets".

Mais également, il est possible d'approximer la diversité totale selon une approche statistique. En effet, l'application de la loi hypergéométrique nous permet d'obtenir une distribution de probabilités pour le nombre total de fragments (Scherrer 1984). Pour appliquer la loi hypergéométrique, nous avons assumé que la composition bactérienne dans les deux cultures était identique. Cette distribution de probabilités a été calculée et est présentée à la figure C3 (annexe C). Les résultats indiquent une probabilité maximale de 33,3%, pour un nombre total de 26 ou de 27 bandes. Ainsi, la diversité totale la plus probable serait d'environ 26 ou 27 espèces.

4.4 Discussion

Mis à part *T. ferrooxidans*, la culture des micro-organismes réalisée à partir d'échantillons de boues prélevés durant le procédé de biolixiviation, a essentiellement révélé la présence de deux souches de levures et d'une souche de champignon. Tel que mentionné au chapitre II, une des levures formait, sur milieu MS-Fe-Ye-Glu, des colonies roses très semblables à celles formées par *R. rubra*. Dans un procédé de biolixiviation similaire à celui étudié, une espèce de *Rhodotorula* fut aussi mise en évidence, mais seulement lors de la phase de latence (Gamache 1996). Sur milieu MS-Fe-Ye, les cellules de *R. rubra* formaient, au lieu des colonies roses typiques, des colonies jaunes, recouvertes de dépôts ferriques. L'examen microscopique de ces colonies a révélé, en plus des cellules de levures, des bacilles, suggérant la présence de *T. ferrooxidans*. Lors de la co-culture de *R. rubra* et de *T. ferrooxidans* dans les boues stérilisées, ce même type de colonies "mixtes" fut observé. Les aggrégats cellulaires observés dans les boues, incluaient peut-être ces espèces, ce qui expliquerait la formation de telles colonies. Et même en brisant les aggrégats avant l'étalement sur milieux solides, l'examen microscopique indiquait que plusieurs de ceux-ci restaient plus ou moins intacts. D'ailleurs, la résistance de tels aggrégats fut rapportée comme un facteur limitant de façon importante la distribution uniforme des cellules lors de l'analyse des boues activées par hybridation *in situ* et par cytofluorométrie (Manz et al. 1994; Wallner et al. 1995).

Mais l'existence de ces colonies "mixtes" suggère que l'association des levures avec les thiobacilles dans les aggrégats multispécifiques pourrait servir à optimiser les interactions discutées au chapitre II. Dans d'autres procédés biotechnologiques, des flocs microbiens incluant des espèces dont les fonctions métaboliques sont complémentaires, furent mis en évidence. Par exemple, lors de procédés de digestion anaérobie, on a observé une juxtaposition des espèces acétogènes, avec les bactéries méthanogènes et les bactéries réductrices de soufre (Schink et Thauer 1988; Thiele et Zeikus 1988; Harmsen et al. 1996). De plus, lors du processus de nitrification-dénitrification, on a aussi noté une organisation particulière entre *Nitrosomonas sp.* et *Nitrobacter sp.*, qui dépendent l'une de l'autre du point de vue métabolique (Mobarry et al. 1996).

Les deux autres espèces de champignons ne furent pas identifiées, mais notons qu'il n'est pas surprenant de retrouver ces espèces eucaryotes, étant donné la versatilité de leur métabolisme, de même que leur importante tolérance à l'acidité. Par ailleurs, nos tentatives

de culture n'ont pas pu mettre en évidence d'autre espèce bactérienne que *T. ferrooxidans*. Ceci est en accord avec les résultats de Gamache (1996), qui a analysé un procédé similaire. La culture sur milieux solides a donc révélé une diversité bactérienne très limitée.

Les résultats de l'analyse moléculaire par PCR/DGGE sont totalement en désaccord avec ceux obtenus par culture, puisque cette approche a révélé une diversité bactérienne très importante. Cette observation corrobore d'autres travaux ayant rapporté une divergence entre les analyses de la diversité bactérienne faites par la méthode de culture et celles par une approche moléculaire (Giovannoni et al. 1990; Ward et al. 1990; DeLong et al. 1992; Liesack et Stackebrandt 1992; Stackebrandt et al. 1993; Barns et al. 1994). Lors de la phase de latence, on dénombre une vingtaine de produits de PCR différents. Pour ce qui est de la phase logarithmique du procédé, le patron de bandes obtenu sur DGGE ne semble que très légèrement différent. Étant donné le nombre de fragments amplifiés, ces différences mineures pourraient être attribuables aux variations qui peuvent survenir lors de la réaction d'amplification par PCR.

L'analyse DGGE révèle un minimum de 20 espèces présentes lors du procédé. Cependant, plusieurs facteurs peuvent interférer avec l'évaluation de la diversité par DGGE. Premièrement, étant donné le nombre important de produits de PCR formés, le pouvoir de résolution du DGGE semble avoir été limitant, car des fragments différents ont pu migrer à la même position sur le gel. Ceci fut révélé lorsque nous avons obtenu des séquences différentes provenant d'une même bande. La résolution pourrait être accrue par l'utilisation d'un gradient de dénaturants encore plus étroit, ou par un système de "DGGE double", combinant un gradient de polyacrylamide au gradient de dénaturants (Cremonesi et al. 1997). Le second facteur nuisant à l'évaluation de l'indice de diversité par DGGE fut la formation de molécule de type chimérique lors de l'amplification par PCR. Ce phénomène, qui a été discuté au chapitre précédent, revêt dans le contexte actuel une importance majeure, car la diversité génétique des boues est très importante. Il semble que nous ayons obtenu quatre molécules chimériques sur un nombre total de 22 fragments inconnus, ce qui correspond à la fréquence de 10 à 30% rapportée par Liesack et al. (1991). Nous devons toutefois mentionner qu'il y a une possibilité que ces fragments correspondent à des espèces ou même à des branches de bactéries non encore caractérisées phylogénétiquement. L'hybridation *in situ* serait un moyen efficace de prouver que ces fragments correspondent à des bactéries des boues. Mais dans les limites de ce travail,

l'affiliation de ces fragments semble tellement incertaine que nous les avons plutôt considérés comme des artefacts de PCR. On sait peu de choses à propos des mécanismes de formation de ces molécules et comme nous ne disposons d'aucune solution pour éliminer ce problème, la détection de ce type d'artefact est importante (Kopczynski et al. 1994). En plus de ces deux facteurs, on peut citer la possibilité d'erreurs de la polymérase de *Thermus aquaticus* (1 erreur sur $1,7x10^4$ nucléotides). Afin d'éviter l'introduction de telles erreurs dans les séquences dérivées d'un clonage, il aurait été préférable d'analyser les séquences provenant de deux amplifications distinctes. Toutefois l'approche basée sur l'analyse de deux cultures indépendantes, où on a obtenu trois séquences identiques, compense un peu cette lacune. Enfin, on peut noter qu'il existe une variation génétique existant entre les différentes copies de gènes codant pour l'ARNr 16S (Arnheim et Ehrlich 1992). Cette hétérogénéité entre les différents gènes est généralement faible (<0,5%), mais on a observé une différence de 5% entre les deux gènes d'une archaébactérie (Mylvaganam et Dennis 1992).

Ces limitations technologiques indiquent que la diversité observée est probablement sous-estimée quoique déjà très importante. Contrairement à ce que nous avions anticipé, la pression de sélection engendrée par les conditions fortement acides du procédé n'a pas éliminé la majeure partie des espèces de bactéries. Du moins, leur matériel génétique est resté intact, puisque leur amplification par PCR a été possible. La détection génétique des bactéries n'implique pas nécessairement que celles-ci étaient en croissance ou métaboliquement actives dans les conditions du procédé. Par contre, il est fort probable que sous l'action d'exoenzymes microbiennes et des conditions physico-chimiques du milieu, les bactéries non viables soient lysées et leur matériel génétique hydrolysé. Par exemple, on a rapporté qu'en milieu aquatique naturel, les bactéries Gram positives métabolisent les espèces Gram négatives non viables (Barcina et al. 1987). Et lors du traitement des boues par digestion aérobie ou anaérobie, la destruction des bactéries non viables par des micro-organismes actifs s'avère un processus très important.

La comparaison des séquences partielles du gène 16S obtenues a confirmé l'importante diversité bactérienne, non révélée par les méthodes de culture. Étant donné que trois séquences sur neuf étaient identiques pour chacune des cultures analysées, il a aussi été possible d'estimer que la diversité totale la plus probable était de 26 ou 27 bandes. Comme suspecté plus haut, il appert que la diversité bactérienne est encore plus importante que celle indiquée par les 20 bandes comptées sur DGGE.

Les analyses phylogénétiques nous ont permis d'établir des affilations entre les inconnus et les bactéries de référence, qui nous permettront d'approfondir l'analyse de la diversité. Certaines espèce se retrouvent peut-être sous forme de spores, d'autres possèdent peut-être une paroi les rendant tout au plus tolérantes aux conditions du procédé. Mais si plusieurs espèces évoluent dans ce milieu, la formation d'aggrégats pourrait constituer un mécanisme adaptatif, permettant de constituer des micro-habitats capables de protéger les bactéries contre des conditions adverses, accroître les interactions et favoriser l'activité métabolique (Smith et al. 1992). À titre d'exemple les résultats présentés au chapitre II ont démontré qu'un mécanisme synergique entre les espèces était nécessaire à la croissance de *T. ferrooxidans* dans les boues.

Parmi les 18 produits de PCR non chimériques formés, huit ont été associés aux bactéries Gram positives. Plus particulièrement, cinq de ceux-ci se sont retrouvés dans le groupe dont la teneur en guanine et cytosine est forte. On a pu établir que deux de ces fragments étaient étroitement apparentés au groupe des mycobactéries, ou espèces possédant une membrane contenant de l'acide mycolique. Ce groupe taxonomique comprend huit genres incluant *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* et *Nocardia.* Leurs affiliations phylogénétiques furent récemment étudiées par le biais de l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S (Chun et al. 1996). Mis à part *Rhodococcus marionascens* (absent des arbres construits par Chun et al. 1996), l'arbre phylogénétique des bactéries Gram positives présenté dans ce travail est en accord avec cette classification phylogénétique, car les genres *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella* se sont retrouvés dans une même branche, dont le noeud est supporté par une valeur de bootstrap de 94%. Étant donné la courte taille des fragments étudiés, nous n'avons pas pu établir l'affiliation des inconnus au niveau de l'espèce. Cependant, le fragment Bio 2-10 semble particulièrement affilié à *Mycobacterium chlorophenolicum* (Figure 4.4).

Plusieurs espèces de ce groupe taxonomique furent à maintes reprises retrouvées dans divers procédés de traitement des eaux usées (Lechevalier et Lechevalier 1974; Eikelboom 1975; Lemmer et Kropenstedt 1984; Blackall et al. 1989a, 1989b; Sodell et Seviour 1990; Blackall 1993; Stratton et al. 1996). Plus particulièrement, *Nocardia sp.* est largement responsable de la formation de mousse à la surface des bassins de boues activées, causant des problèmes dans des procédés de traitement biologique des eaux usées. Mais aussi, l'analyse microbiologique d'un procédé de boues activées par hybridation *in situ* a révélé

que les actinomycètes formaient un groupe dominant, probablement impliqué dans l'enlèvement du phosphate (Wagner et al. 1994). Mais comme mentionné au chapitre I, ce groupe renferme aussi des espèces opportunistes et pathogènes, dont la persistance dans l'environnement pourrait engendrer des problèmes de santé publique (Dudley et al. 1980; Wallace 1987; Scarpino et al. 1988; von Reyn et al. 1994; Stratton et al. 1996).

Tout comme les autres actinomycètes, les espèces faisant partie du groupe des mycobactéries partagent plusieurs caractéristiques communes, tel que la sécrétion d'exoenzymes (cellulase, lysozyme, protéase) pouvant hydrolyser de la matière organique complexe provenant de composés ligneux ou de bactéries mortes. Mais également plusieurs espèces manifestent la capacité de croître en milieu acide (Lemmer 1986; Ensign 1992; Goodfellow et al. 1996; Jiang et Xu 1996). Il est fort probable qu'en exploitant cette niche écologique particulière, les inconnus identifiés soient viables et même actifs dans le procédé de traitement des boues par biolixiviation. Enfin, la raison majeure expliquant notre incapacité à retrouver de telles espèces en culture est sans doute leur faible taux de croissance par rapport aux autres espèces présentes dans le milieu. Tel que recommandé précédemment, l'incorporation d'agents sélectifs comme la cycloheximide, aurait évité l'épuisement du milieu par les champignons (Sodell et Seviour 1990; Goodfellow et al. 1996).

Bien qu'elle ne soit pas une espèce faisant partie du groupe des mycobactéries, *Microthrix parvicella*, avec laquelle le fragment Bio 1-11 est associé, est aussi une bactérie filamenteuse faisant partie des actinomycètes. *Microthrix parvicella* est très fréquemment retrouvé dans les boues activées et est aussi identifié comme un agent causant la formation de mousse induisant le fonctionnement suboptimal des procédés de traitement des eaux usées (Slijkhuis et Deinema 1982; Sodell et Seviour 1990; Blackall et al. 1996). La culture de *Microthrix parvicella* est très fastidieuse, puisque les maintes tentatives réalisées jusqu'à maintenant n'ont pu supporter la croissance que de deux souches isolées par micro-manipulation (Blackall et al. 1996). En attendant la possibilité de cultiver cette espèce en quantités suffisantes pour permettre de mieux définir ses caractères, son phénotype demeure associé à celui de *Candidatus Microthrix parvicella* (Blackall et al. 1996). À la lumière de ces informations, on comprend mieux pourquoi cette espèce ne fut pas détectée lors des tentatives de culture. Il est intéressant de noter que le fragment Bio 1-11 est aussi fortement similaire (94%) avec la souche TH3, qui est une bactérie Gram positive acidophile, modérément thermophile et qui tire son énergie à partir de l'oxydation du fer

ferreux (Brierley 1978b; Lane et al. 1992). Une souche appartenant à la même espèce que TH3, soit la souche ICP, a été récemment caractérisée. La souche ICP est capable de croître de façon autotrophe en présence de fer ferreux, mais aussi en hétérotrophie avec de l'extrait de levure. Elle semble encore plus performante que d'autres espèces autotrophes acidophiles au niveau de la fixation du CO_2 et a été nommée *Acidimicrobium ferrooxidans* (Clark et Norris 1996).

Deux autres fragments ayant été amplifiés à partir des deux cultures indépendantes, ont été associés aux bactéries Gram positives ayant une forte teneur en guanine et cytosine. Ces fragments sont très fortement similaires à *Streptomyces macrosporus* (99%) et *Terrebacter tumescens* (100%). Typiquement, ces espèces sont plutôt retrouvées dans les sols, mais des études ont démontré que les streptomycètes constituaient un groupe d'importance majeure dans l'eau et dans les sédiments (Barcina et al. 1987; Collins et al. 1989; Stackebrandt et al. 1993; Jiang et Xu 1996).

Trois inconnus ont été affiliés avec les bactéries Gram positives comprenant une faible teneur en guanine et cytosine soit la branche des *Clostridium-Bacillus*. Ces trois inconnus se sont très étroitement affiliés avec des espèces de *Clostridium*, soit *C. bifermentans* pour les fragments identiques amplifiés à partir des deux cultures et *C. quinii* pour le troisième fragment. Du point de vue écologique, il n'est pas surprenant de retrouver des *Clostridium*, car ils sont pratiquement toujours retrouvés dans les eaux usées et les boues d'épuration et ce, à forte densité (Dudley et al. 1980; Scarpino et al. 1988; Hill et al. 1996; Grant et al. 1996). Le genre *Clostridium* comprend essentiellement des espèces anaérobies strictes, dont la croissance ne peut s'amorcer que lorsque la tension en oxygène est en-deçà d'un certain seuil, correspondant à un potentiel d'oxydoréduction inférieur à 150 mV (Hippe et al. 1992). Comme dans la phase logarithmique du procédé de biolixiviation, le potentiel d'oxydoréduction dépasse 550 mV (Figure 2.7), ces espèces ne peuvent pas croître et l'ADN amplifié par PCR pourrait provenir des spores formées par ces organismes. Les spores sont très résistantes à l'oxygène, à la dessication, aux traitements de digestion des boues, de même qu'à la prédation par les protozoaires (Dudley et al. 1980; Davies et al. 1995). Nous savions toutefois que la méthode de lyse cellulaire utilisée était en mesure d'extraire des spores (Moré et al. 1994). Étant donné leur résistance, il a été souvent recommandé d'utiliser les spores de *Clostridium* comme indicateurs de pathogènes, pour détecter la pollution à long terme, ou pour signaler la présence de kystes de protozoaires, dont le potentiel de survie est aussi très important (Payment et Franco 1993; Takizawa et

al. 1993; Hill et al. 1996). La présence de *Streptococus sp.*, bactérie utilisée de routine comme indicateur de pathogène n'a pas été détectée. Ceci est en accord avec les expériences de Blais et al. 1992.

Pour ce qui est des Protéobactéries, les analyses phylogénétiques (Figure 4.5) sont aussi en accord avec les résultats de Blais et al. (1992), puisque aucun des huit inconnus ne s'est associé à la subdivision γ, qui regroupe les genres *Salmonella, Escherichia, Shigella* et plusieurs autres coliformes (Tableau 1.1). Les bactéries indicatrices de pathogènes semblent donc être éliminées lors du traitement des boues par le procédé de biolixiviation.

Nous avons analysé avec le programme FASTA (GCG; Devereux et al. 1984), des séquences d'ADN 16S bactérien non publiées, mais identifiées comme provenant de boues activées (Vainio et Hantula, GenBank, 1996). Ces séquences de 362 pb correspondent à la région comprise entre les position 962 et 1324 selon la numérotation de *E. coli*. L'analyse a révélé que plusieurs de celles-ci étaient similaires avec les Protéobactéries trouvées dans ce travail. Ces similitudes seront donc soulignées dans les paragraphes qui suivent.

Les analyses indiquent que quatre espèces se sont regroupées avec la subdivision β des Protéobactéries. En premier lieu, on dénote la présence du fragment Bio T.-f., correspondant à *T. ferrooxidans* ATCC 19859 en co-culture avec *R. rubra* dans des boues stérilisées. Dans les cultures réalisées dans les boues non stérilisées, plusieurs analyses DGGE ont indiqué qu'un fragment migrait à la même position que *T. ferrooxidans* sur le gel (résultat non montré). Cependant, aucune bande correspondant à *T. ferrooxidans* n'a été purifiée à partir de ces cultures.

Il fut particulièrement intéressant de voir que deux fragments se sont affiliés avec un groupe de bactéries incluant les genres *Leptothrix* et *Sphaerotilus*. Le groupe *Leptothrix-Sphaerotilus* comporte des bactéries qui synthétisent autour d'elles une sorte de gaine, qui leur permet de se fixer en milieu aquatique et qui les protège de la prédation (Mulder et Deneima 1992; Emerson et Ghiorse 1993). Ces enveloppes accumulent à leur surface des précipités de fer et de manganèse et la présence de ces bactéries est associée à des environnements présentant une importante activité d'oxydation biologique du fer (Emerson et Revsbech 1994a, 1994b). Par ailleurs, certaines espèces de *Leptothrix*, mais surtout *Sphaerotilus natans*, sont typiquement retrouvées dans des milieux aquatiques très chargés en matière organique, comme des eaux usées municipales ou des effluents provenant de

l'industrie laitière (Mulder et Deneima 1992). Dans les prodécés de traitement par boues activées, *S. natans* peut croître sous forme de filaments et causer le foisonnement des boues (bulking), entraînant une mauvaise décantation de celles-ci (Eikelboom 1975; Kohno 1988; Howgrave-Graham et Stein 1988; Amann et al. 1996). La diversité de ce groupe ne se limite pas aux genres *Leptothrix* et *Sphaerotilus*, car des travaux récents ont indiqué que celle-ci est encore plus importante que ce que l'on croyait (Siering et Ghiorse 1997). Même si les organismes décrits ont des pH optimum de croissance situés entre 6,5 et 7,5, on peut penser qu'il existe des espèces acidophiles. En effet, des travaux ont rapporté l'isolement et la caractérisation partielle d'une bactérie fortement apparentée au groupe *Leptothrix-Sphaerotilus* du point de vue morphologique, qui nécessite la présence de fer pour amorcer sa croissance (Johnson et al. 1992). Cependant, son pH optimal de croissance est de 3,0. L'arbre de la figure 4.5 indique qu'une branche reliée à ce groupe inclut *Gallionnella ferruginea*, qui est aussi impliqué dans l'oxydation du fer, mais qui contrairement à *T. ferrooxidans*, est neutrophile et peut croître lorsque la concentration d'oxygène dissous est faible (Hanert 1981; Emerson et Revsbech 1994a et 1994b). Enfin, l'arbre a aussi mis en évidence l'affiliation des inconnus avec *Zoogloea ramigera*. Cette espèce est aussi typiquement retrouvée dans les procédés de traitement des eaux usées, et sa paroi riche en polysaccharides favorise la formation d'aggrégats (Hirashi et Kitamura 1989; Shin et al. 1993; Rossello-Mora et al. 1995). Enfin, l'analyse par le programme FASTA des séquences de Vainio et Hantula (GenBank 1996) révèle aussi de fortes similarités avec *Gallionnella ferruginea* (91%), *Azoarcus sp.* (91%), *Leptothrix spp.* (94-98%) et *Zoogloea ramigera* (97%).

Les fragments Bio 1-7 et Bio 2-8 qui sont identiques entre eux, se sont retrouvés dans la subdivision α. L'analyse phylogénétique les a révélés distincts de *Xanthobacter flavus* et d'*Agrobacterium tumefaciens*, avec qui ils partagent un important taux de similarité. Les séquences de Vainio et Hantula (GenBank 1996) indiquent aussi une forte similarité avec diverses espèces de cette subdivision, incluant aussi *A. tumefaciens* (90%), *Rhodopseudomonas palustris* (98%) *Nitrobacter winogradsky* (98%) et *Rhizobium spp.* (89%). De façon générale, les bactéries de la subdivision α ayant été retrouvées dans les boues activées sont, comme *Rhodopseudomonas sp.*, des espèces phototrophes (Hirashi et Kitamura 1984; Wagner et al. 1993; Manz et al. 1994; Bond et al. 1995). Dans certains types de traitement des eaux usées, comme les lagunes exposées au soleil, leur rôle dans l'abattement de la demande biologique en oxygène (DBO) peut être très important (Siefert et al. 1978). Un autre genre bactérien de la subdivision α est communément retrouvé dans

les procédés de traitement des eaux. Il s'agit de *Nitrobacter sp.*, qui est impliqué dans le processus d'oxydation du nitrite (Teske et al. 1994; Mobarry et al. 1996). Cependant, les espèces de *Nitrobacter* sont très sensibles à l'acidité.

Les fragments Bio 1-1 et Bio 2-11 se sont associés avec d'autres espèces oxydatrices de nitrite, soit *Nitrospira marina* et *Nitrospina gracilis*, de la subdivision δ. L'analyse phylogénétique effectuée avec le gène complet indique, comme l'arbre présenté à la Figure 4.5, que ces genres forment deux branches distinctes non reliées à d'autres espèces de cette subdivision (Teske et al. 1994). Lors du traitement des eaux et en milieu naturel, ces bactéries jouent, avec les espèces oxydatrices d'ammoniaque, un rôle important pour la réduction de l'azote (Hiorns et al. 1995). Cependant, ces genres ne comportent aucune espèce acidophile connue.

Enfin, deux produits de PCR se sont regroupés avec le groupe *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*. Le genre *Bacteroides* comporte des espèces anaérobies strictes non sporulantes, dont plusieurs, telle que *B. fragilis*, sont des marqueurs de pollution fécale, souvent retrouvées dans les boues activées (Hirashi et al. 1989; Shah 1992; Manz et al. 1994; Wagner et al. 1994; Bond et al. 1995). Les bactéries faisant partie des genres *Cytophaga* et *Flexibacter* furent aussi retrouvées dans les eaux usées et les boues d'épuration (Hirashi et al. 1989; Manz et al. 1994; Wagner et al. 1994; Bond et al. 1995; Manz et al. 1996). En milieu aquatique naturel, les espèces de ce groupe jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique, car elles sont caractérisées par leur capacité à dégrader, via la production d'exoenzymes, de nombreux types de polymères, incluant des protéines, des polysaccharides, de la chitine et des acides nucléiques (Reichenbach 1992; DeLong et al. 1993; Bennloch et al. 1995). La majeure partie de ces espèces sont actives à des pH proches de la neutralité, mais on a rapporté l'activité de *Cytophaga sp.* dans des lacs acides (Hoeningen 1986). Il est donc possible que les inconnus retrouvés puissent être des souches capables de tolérer l'acidité engendrée par le procédé de biolixiviation. De plus, la tendance bien connue de ces espèces à s'associer en aggrégats, pourrait créer des zones anoxiques leur conférant ainsi un avantage adaptatif (DeLong et al. 1993; Manz et al. 1996).

Cette section du projet nous permet de dégager plusieurs conclusions.
En ce qui concerne l'analyse de la diversité par la culture des micro-organismes:
1) L'obtention de colonies mixtes formées par *T. ferrooxidans* et *R. rubra* renforce l'hypothèse d'une association entre ces deux espèces et la présence d'interactions métaboliques entre celles-ci.
2) La diversité bactérienne "cultivable" s'est limitée à ne révéler que *T. ferrooxidans*.

Pour ce qui est de l'analyse moléculaire, on peut tirer les conclusions suivantes:
3) Les résultats obtenus par l'approche PCR/DGGE contredisent ceux obtenus par la culture, car ils indiquent une diversité bactérienne composée d'au moins 20 espèces. Cette diversité est tout aussi importante en phase de latence qu'en phase logarithmique du procédé.
5) L'utilisation du DGGE comme méthode de purification s'est avérée très efficace. Cette procédure a permis d'orienter les efforts de clonage et de séquençage.
6) La comparaison des séquences obtenues confirme l'importance de la diversité bactérienne. Une estimation statistique nous a permis d'évaluer que la diversité la plus probable est de 26 ou 27 espèces différentes.
7) Les analyses phylogénétiques ont permis d'établir l'affiliation des espèces. Plusieurs affiliations sont pertinentes du point de vue écologique. La plupart des inconnus semble relié à la microflore des eaux usées et du traitement de celles-ci par le procédé des boues activées. Ceci nous laisse croire que plusieurs bactéries pourraient jouer, de concert avec les levures et champignons, un rôle synergique sur la croissance de *T. ferrooxidans*.
8) Comme démontré précédemment, le procédé semble détruire efficacement les bactéries indicatrices de pathogènes comme les coliformes, les salmonelles et les streptocoques. Mais en contre-partie, des espèces potentiellement pathogènes semblent être récalcitrantes au traitement. Il s'agit de *Mycobacterium sp.*, *Nocardia sp.*, *Clostridium sp.* et *Bacteroides sp.*

À la lumière des affiliations trouvées, il serait possible d'utiliser des milieux plus appropriés, pour obtenir certaines espèces en culture. C'est pourquoi l'analyse moléculaire est de plus en plus considérée comme une étape préliminaire à toute étude d'écologie microbienne (Stackebrandt et al. 1993). De façon générale, les défis posés par l'obtention de bactéries en culture pure restent très importants. Certains inconnus analysés dans ce travail pourraient constituer de nouvelles espèces ou de nouvelles affiliations. Du point de vue fondamental, cette éventualité est sans doute la plus fascinante, car la découverte de

nouvelles bactéries, maintenant facilitée par l'universalité de l'approche moléculaire, nous permettra de mieux comprendre le rôle des micro-organismes dans la transformation de la matière. Jusqu'à maintenant, on n'a caractérisé que 4000 espèces bactériennes, tandis que plusieurs millions de plantes et d'animaux sont répertoriés (Bull et al. 1992). Du point de vue appliqué, de meilleures connaissances au sujet de la biodiversité microbienne seront en mesure de contribuer à optimiser et élargir le champ d'action des biotechnologies.

CHAPITRE V: CONCLUSION

Le premier objectif de ce travail était de mieux comprendre comment *T. ferrooxidans* pouvait être responsable du processus de biolixiviation dans les boues d'épuration même si cette espèce est caractérisée par son intolérance à la matière organique. Nous voulions d'abord vérifier l'hypothèse que *T. ferrooxidans* nécessite la présence d'autres micro-organismes pour croître dans le milieu des boues. Cette hypothèse s'inspire des interactions microbiennes ayant lieu lors des procédés de digestion anaérobie. Dans ce type de procédé, il est bien connu que les micro-organismes sont répartis en groupes trophiques qui dépendent les uns des autres pour leur croissance. En milieu synthétique, nous avons démontré que des espèces hétérotrophes acidophiles avaient un effet synergique sur la croissance de *T. ferrooxidans*. Le type d'interaction survenant entre les micro-organismes hétérotrophes et *T. ferrooxidans* demeure obscur. Par contre, nos résultats nous permettent de croire que selon les conditions de culture, le rôle des hétérotrophes se situerait à deux niveaux. Dans les milieux comportant une forte concentration de composés inhibiteurs, les hétérotrophes agiraient en tant "qu'organismes épurateurs", en réduisant la concentration des composés organiques, potentiellement toxiques pour *T. ferrooxidans*. Et dans des milieux non inhibiteurs, les hétérotrophes produiraient des facteurs stimulant le démarrage de la croissance de *T. ferrooxidans*. Le CO_2 produit lors de la minéralisation de la matière organique, pourrait bien être un de ces facteurs. En effet, son importance est majeure pour *T. ferrooxidans*, qui doit fixer ce composé comme unique source de carbone. Ces deux mécanismes synergiques sont cependant non spécifiques et c'est probablement pourquoi on a retrouvé de nombreuses espèces, bactériennes et eucaryotes, capables de les accomplir.

Dans le procédé de biolixiviation des boues d'épuration, la croissance de *T. ferrooxidans* n'a été possible que lorsque la communauté microbienne des boues était présente. En effet, lors de l'inoculation de *T. ferrooxidans* dans des boues stérilisées, le fer ferreux n'a pas été oxydé et les boues ne se sont pas acidifiées. La levure *R. rubra* isolée à partir de sédiments en association avec *T. ferrooxidans* a eu le même effet synergique que la communauté microbienne des boues. Mais en plus, cette co-culture s'est montrée plus performante que la culture réalisée avec le consortium microbien des boues. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en milieu synthétique et vérifient l'hypothèse de base. Mais aussi, ils

mettent encore plus d'emphase sur l'importance des interactions microbiennes pour le fonctionnement efficace du procédé.

Une levure fortement similaire à *R. rubra* fut isolée à partir des boues subissant le traitement. La culture sur gélose de *T. ferrooxidans* et de *R. rubra* provenant des boues nous a fourni une autre évidence quant à la synergie existant entre ces deux espèces. En effet, nous avons observé la présence de colonies "mixtes" formées par ces deux espèces. Cette observation suggère l'existence d'un arrangement particulier entre ces deux espèces lors du procédé, indiquant que tout comme dans les procédés de fermentation anaérobie, les espèces dont le métabolisme est complémentaire ont tendance à s'associer.

Cette complémentarité indique que contrairement aux stratégies précédentes, basées sur l'inoculation de *T. ferrooxidans* et de *T. thiooxidans*, l'inoculation de *Rhodotorula sp.* avec *T. ferrooxidans* pourrait accroître la vitesse avec laquelle s'amorce le procédé de biolixiviation dans les boues. Lorsque d'importants volumes doivent être traités, la diminution du temps de rétention est un facteur qui peut réduire significativement les coûts d'exploitation. Cependant, le potentiel lié à l'inoculation concomitante de ces espèces devrait être vérifié par d'autres travaux. En effet, des expériences de biolixiviation supplémentaires devraient être réalisées dans des volumes plus importants, afin de se rapprocher des conditions réelles. En plus de paramètre mesurés dans ce travail, le dosage des métaux permettrait de mieux caractériser les performances de solubilisation en fonction de ce nouvel inoculum.

Cependant, étant donné l'importante diversité microbienne retrouvée dans les eaux usées et dans les boues d'épuration, nous pensions que le procédé de biolixiviation pouvait aussi résulter de l'activité de plusieurs autres populations microbiennes, impliquées dans la transformation du carbone, du fer, de soufre, etc. Mais comme les méthodes de culture biaisent fortement la diversité dans les communautés microbiennes complexes, une approche moléculaire a été développée et validée pour permettre une analyse robuste de la diversité bactérienne dans les boues. Cette approche moléculaire, basée sur le PCR/DGGE a été appliquée à l'étude de la diversité bactérienne dans le procédé de biolixiviation. Tandis que la culture révélait la présence d'une seule espèces bactérienne, soit *T. ferrooxidans*, la méthode moléculaire faisait état d'une diversité étonnante, composée d'au moins 20 espèces. Ceci vérifie notre seconde hypothèse, à savoir que la diversité bactérienne génétique serait beaucoup plus grande que la diversité cultivable. L'ampleur

de la diversité obtenue est très étonnante, compte-tenu des conditions extrêmes du procédé (pH<2,5). Nous avons donc procédé à l'identification partielle des micro-organismes par l'analyse de séquences d'une région de l'ADNr 16S pour en savoir plus à propos de la pertinence écologique et du rôle possible de tant d'espèces lors du procédé.

Des fragments ont été échantillonnés et purifiés à partir du DGGE et leur séquence a été déterminée. Les séquences partielles furent soumises à une analyse phylogénétique. Les espèces se sont affiliées à six groupes taxonomiques, soit les Gram positives ayant une forte et une faible teneur en G+C, les Protéobactéries des subdivisions α, β, et δ, de même que des espèces du groupe *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*. L'analyse phylogénétique appuie donc l'extraordinaire diversité obtenue par DGGE et nous a permis d'estimer que la diversité totale la plus probable est de 26 ou 27 espèces. Cette diversité, qui semble à priori déconcertante, fait surgir une question majeure quant à la signification biologique des espèces retrouvées. Des travaux supplémentaires pourraient nous permettre d'obtenir une réponse à cette question, qui aura des répercussions tant au niveau appliqué qu'au niveau fondamental. Ceux-ci sont suggérés ci-bas.

Premièrement, cette analyse a confirmé l'efficacité du procédé de biolixiviation à détruire les bactéries indicatrices de pathogènes. Ceci corrobore des résultats précédemment rapportés, mais n'écarte toutefois pas les risques microbiologiques associés à l'épandage des boues traitées par le procédé de biolixiviation. En effet, nos résultats indiquent qu'il semble persister des bactéries potentiellement pathogènes comme *Clostridium sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Nocardia sp.* et *Bacteroides sp.* Pour s'assurer de l'innocuité de l'épandage des boues traitées par biolixiviation, des contrôles supplémentaires devraient être réalisés. L'identification exacte des espèces et le dénombrement de celles-ci nous renseignerait quant à leur potentiel pathogène et leur capacité de survie dans l'environnement.

Deuxièmement, même si la plupart des autres affiliations trouvées semble avoir une pertinence écologique, nous ne savons pas quelles sont les espèces qui jouent un rôle biologique significatif dans le procédé. De plus, les méthodes utilisées ne nous ont pas permis de dénombrer les bactéries. Mais à la lumière des informations obtenues par cette étude, l'hybridation *in situ* combinée à une analyse par cytofluorométrie nous permettrait d'énumérer les groupes taxonomiques visés. L'utilisation de sondes ribosomiques nous

permettrait aussi de déterminer, selon l'intensité de la fluorescence émise, le degré d'activité métabolique de chacun des groupes analysé.

Enfin, le fait de connaître les affiliations pourrait nous permettre d'obtenir certaines espèces en culture pure. Cette condition est essentielle pour mieux caractériser les bactéries du point de vue physiologique et pour savoir si nous avons à faire à de nouvelles espèces. Cependant, plusieurs affiliations trouvées regroupent des espèces dont la croissance est très fastidieuse. Du point de vue fondamental, des efforts de recherche devraient donc se concentrer sur la conception de milieux permettant la culture de ces espèces. Il semble curieux que 100 ans après l'établissement des principes de base de la microbiologie, 80% des micro-organismes restent inconnus. Mais du point de vue historique, ceci s'explique par les besoins de la microbiologie clinique, qui a requis une concentration des efforts de recherche sur une part restreinte de la diversité. Mais de plus en plus, le souci pour la qualité de l'environnement, l'engouement pour la caractérisation de la biodiversité et le besoin de biotechnologies d'assainissement ouvrent de nouveaux horizons de recherche. En ce sens, la diversité que met en évidence l'approche moléculaire relance des défis importants, notamment au niveau de la découverte d'espèces nouvelles. La réponse à ces défis nous aidera à mieux comprendre les processus microbiologiques de transformation de la matière dans l'environnement, ce qui aura sans doute beaucoup de répercussions dans le domaine des biotechnologies.

CHAPITRE VI: BIBLIOGRAPHIE

Adamu, C. A., P. F. Bell et C. Mulchi (1989). Residual metal concentrations in soils and leaf accumulations in tobacco a decade following farmland application of municipal sludge. *Envir. Pollut.* **56** : 113-126.

Ahonen, L. et O. H. Tuovinen (1989). Microbiological oxidation of ferrous iron at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 312-316.

Alexander, B, S. Leach et W. J. Ingledew (1987). The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1171-1179.

Amann, R. I., L. Krumholz et D. A. Stahl (1990a). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**: 762-770.

Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux et D. A. Stahl (1990b). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.

Amann, R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key et D. A. Stahl (1992). Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 614-623.

Amann, R., J. Snaidr, M. Wagner, W. Ludwig et K.-H. Schleifer (1996). In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* **178**: 3496-3500.

Amann, R., N. Springer, W. Ludwig, H.-D. Görtz et K.-H. Schleifer (1991). Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbiont. *Nature.* **351**: 161-164.

Apel W. A., P. R. Dugan, J. A. Filppi et M. S. Rheins (1976). Detection of *Thiobacillus ferrooxidans* in acid mine environments indirect fluorescent antibody staining. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 159-165.

APHA (1989). *Standard methods for examination of water and wastewaters.* 17th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. U.S.A.

Arkesteyn, G. J. M. W. et J. A. M. deBont (1980). *Thiobacillus acidophilus*: a study of its presence in *Thiobacillus ferrooxidans* cultures. *Can. J. Microbiol.* **26**: 1057-1065.

Arnheim, N. et H. A. Ehrlich (1992). Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 131-156.

Arredondo, R. et C. A. Jerez (1989). Specific dot-immunobinding assay for detection and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2025-2029.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. More, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (1994). *Current protocols in molecular biology.* John Wiley and Sons Inc., Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, U.S.A.

Baker K. H. et A. L. Mills (1982). Determination of the number of respiring *Thiobacillus ferrooxidans* cells in water samples by using combined fluorescent antibody tetrazolium chloride staining. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 338-344.

Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jefferies et N. R. Pace (1994). Remarkable archaeal diversity in Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 1609-1613.

Bennloch, S., F. Rondriguez-Valera et A. J. Martinez-Murcia (1995). Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**: 267-280.

Berg, G. et D. Berman (1980). Destruction by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion of viruses and indicator bacteria indigenous to domestic sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 361-368.

Bhattacharyya, S., B. K. Chakrabarty, A. Das, P. N. Kundu et P. C. Banerjee (1991). *Acidiphilium symbioticum* sp. nov., an acidophilic heterotrophic bacterium from *Thiobacillus ferrooxidans* cultures isolated from Indian mines. *Can. J. Microbiol.* **37**: 78-85.

Blackall, L. L. (1993). Molecular identification of activated sludge foaming bacteria. Dans: *Les micro-organismes dans les boues activées et les biofilms*, proceedings of the first international symposium. 27-28 septembre, Paris. pp. 39-46.

Blackall, L. L., A. E. Harbers, P. F. Greenfield et A. C. Hayward (1989a). Actinomycete scum problems in Australian activated sludge plants. *Wat. Sci. Technol.* **20**: 493-495.

Blackall, L. L., J. H. Parlett, A. C. Hayward, D. E. Minnikin, P. F. Greenfield et A. E Harbers (1989b). *Nocardia pinesis* sp. nov., and actinomycete found in activated sludge foams in Australia. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1547-1558.

Blackall, L. L., H. Stratton, D. Bradford, T. D. Dot, C. Sjörup, E. M. Seviour et R. J. Seviour (1996). Candidatus *Microthrix parvicella*, a filamentous bacterium from activated sludge sewage treatment plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 344-346.

Blais, J.-F. et J.-L. Sasseville (1997). Analyse technico-économique des procédés de décontamination des boues d'épuration municipales. Soumis pour publication.

Blais, J.-F., R. D. Tyagi et J. C. Auclair (1993). Bioleaching of metals from sewage sludge: microorganisms and growth kinetics. *Wat. Res.* **27**: 101-110.

Blais, J.-F., R. D. Tyagi, J. C. Auclair et M. C. Lavoie (1992). Indicator bacteria reduction in sewage sludge by a metal bioleaching process. *Wat. Res.* **26**: 487-495.

Blake II, R. C., E. A. Shute, M. M. Greenwood, G. H. Spencer et W. J. Ingledew (1993). Enzymes of aerobic respiration of iron. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**: 9-18.

Boivin-Jahns, V., A. Bianchi, R. Ruimy, J. Garcin, S. Daumas et R. Christen (1995). Comparison of phenotypical and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3400-3406.

Bond, P. L., P. Hugenholtz, J. Keller et L. L. Blackall (1995). Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1910-1016.

Borichewski, R.M. (1967). Keto acids as growth-limiting factors in autotrophic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **93**: 597-599.

Brierley, C. L. (1978a). Bacterial leaching. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **5**: 207-262.

Brierley, J. A. (1978b). Thermophilic iron-oxidizing bacteria found in copper leach dumps. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 523-525.

Brigmon, R. L., G. Bitton, S. G. Zam et B. O'Brien (1995). Development and application of a monoclonal antibody against *Thiothrix spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 13-20.

Brock, T. D. (1978). *Thermophilic microorganisms and life at high temperature.* Springer-Verlag, New York. p. 174.

Brown M. J. et J. N. Lester (1979). Metal removal in activated sludge: The role of bacterial extracellular polymers. *Wat. Res.* **13**: 817-837.

Brown, J. R. et W. F. Doolittle (1995). Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 2441-2445.

Bryant, R. D., K. M. McGroarty, J. W. Costerton et E. J. Laishley (1983). Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). *Can. J. Microbiol.* **29**: 1159-1170.

Bull, A. T., M. Goodfellow et J. H. Slater (1992). Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 219-252.

Burgstaller, W. et F. Schinner (1993). Leaching of metals with fungi. *J. Biotechnol.* **27**: 91-116.

Butler, B. J. et A. G. Kempton (1987). Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid media containing heterotrophic bacteria. *J. Ind. Microbiol.* **2**: 41-45.

Chang, A.C., J. E. Warneke, A. L. Page et L. J. Lund (1984). Accumulation of heavy metals in sewage sludge-treated soils. *J. Environ. Qual.* **13** : 87-91.

Chatton, E. (1938). *Titres et travaux scientifiques (1906-1937) de Édouard Chatton.* E. Sottano, Sète, France.

Chun, J., S.-O. Kang et M. Goodfellow (1996). Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 205-213.

Cilia, V., B. Lafay et R. Christen (1996). Sequences heterogeneities among ribosomal RNA sequences and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 451-461.

Clark, D. A. et P. R. Norris (1996). *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology.* **142**: 785-790.

Cobley, J. G. et B. A. Haddock (1975). The respiratory chain of *Thiobacillus ferrooxidans*: the reduction of cytochromes by Fe^{2+} and the preliminary characterization of rusticyanin a novel "blue" copper protein. *FEBS Lett.* **60**: 29-33.

Cobley, J. G. et J. C. Cox (1983). Energy conservation in acidophilic bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**: 579-595.

Collins, M. D., M. Dorsch et E. Stackebrandt (1989). Transfer of *Pimelobacter tumescens* to *Terrabacter* gen. nov. as *Terrabacter tumescens* comb. nov. and of *Pimelobacter jensenii* to *Nocardioides* as *Nocardioides jensenii* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 1-6.

Colmer, A. R. et M. E. Hinkle (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science.* **106**: 253-256.

Colwell, R. R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* **704**: 410-433.

Couillard, D. et G. Mercier (1991). Optimum residence time (in CSTR and airlift reactor) for bacterial leaching of metals from anaerobic sewage sludge. *Wat. Res.* **25**: 211-218.

Couillard, D. et G. Mercier (1993). Removal of metals and fate of N and P in the bacterial leaching of aerobically digested sewage sludge. *Wat. Res.* **27**: 1227-1235.

Couillard, D. et G. Mercier (1994). An economic evaluation of biological removal of heavy metals from wastewater sludge. *Wat. Environ. Res.* **66**: 32-39.

Couillard, D. et Y. Grenier (1990). Évaluation des risques environnementaux concernant la présence de composés synthétiques organiques toxiques dans les boues résiduaires municipales lors de leur valorisation. *Wat. Pollut. J. Canada.* **25**: 109-130.

Couillard, D., P. Chouinard, E. Cormier, D. Fournier, G. Mercier, M. Roy, M. Dubé, M. Létourneau, A. Pesant et J. P. Renaud (1995). *Détermination de l'influence de différentes pratiques de valorisation des boues d'épuration des eaux usées urbaines sur la productivité des érablières et des plantations d'arbres de Noël et évaluation*

des risques de contamination du sol et des ressources hydriques. Rapport final présenté à la direction de la recherche et des technologie environnementales du Ministère de l'environnement et de la faune du Québec, INRS-Eau, Ste-Foy. 386 p.

Cox, J. C., Nicholls, D. G. et W. J. Ingledew (1979). Transmembrane electrical potential and transmembrane pH gradient in the acidophile *Thiobacillus ferro-oxidans*. *Biochem. J.* **178**: 195-200.

Craun, G. F. (1991). Causes of waterborne outbreaks in the United States. *Wat. Sci. Technol.* **24**: 17-20.

Cremonesi, L., S. Firpo, M. Ferrari, P. G. Righetti et C. Gelfi (1997). Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *BioTechniques.* **22**: 326-330.

Das, A., S. Bhattacharyya et P. C. Banerjee (1989). Purification of *Thiobacillus ferrooxidans* cultures by single colony isolation and influences of agarose on the colony morphology. *J. Microbiol. Methods.* **10**: 281-287.

Davies, C. M., J. A. H. Long, M. Donald et N. J. Ashbolt (1995). Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1888-1896.

Davis, R. D. (1987). Use of sewage sludge on land in the United Kingdom. *Wat. Sci. Technol.* **19**: 1-8.

De los Reyes, F. L., W. Ritter et L. Raskin (1997). Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1107-1117.

DeBruyn J. C., F. C. Boogerd, P. Bros et J. G. Kuenen (1990). Floating filters, a novel technique for isolation and enumeration of fastidious, acidophilic, iron-oxidizing, autotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2891-2894.

DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 5685-5689.

DeLong, E. F., Franks, D. G. et A. L. Alldredge (1993). Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs free-living marine bacterial assemblage. *Limnol. Oceanogr.* **38**: 924-934.

DeLong, E. F., G. S. Wickham and N. R. Pace (1989). Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science.* **243**: 1360-1363.

Devereux, J., P. Haeberli, et O. Smithies (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**: 387-395.

Drebnot, M. A., M. N. Mulders, J. J. Campbell, O. M. Kew, K. Fonseca, D. Strong et S. H. S. Lee (1997). Molecular detection of an importation of type 3 wild poliovirus into Canada from The Netherlands in 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 519-523.

Drobner, E., H. Huber et K. O. Stetter (1990). *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2922-2923.

Dudley, D. J., M. N. Guentzel, M. J. Ibarra, B. E. Moore et B. P. Sajik (1980). Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 118-126.

Ekendahl, S., J. Arlinger, F. Stahl et K. Pedersen (1994). Characterization of attached bacterial populations in deep granitic groundwater from the Stripa research mine by 16S rRNA gene sequencing and scanning electron microscopy. *Microbiology.* **140**: 1575-1583.

Eikelboom, D. H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Wat. Res.* **9**: 365-388.

Emerson, D. et N. P. Revsbech (1994a). Investigation of an iron-oxidizing microbial mat community located near Aarhus, Denmark: Field studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4022-4030.

Emerson, D. et N. P. Revsbech (1994b). Investigation of an iron-oxidizing microbial mat community located near Aarhus, Denmark: Laboratory studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4032-4038.

Emerson, D. et W. C. Ghiorse (1993). Ultrastructure and chemical composition of the sheath of *Leptothrix discophora*. *J. Bacteriol.* **175**: 7808-7818.

Ensign, J. C. (1992). Introduction to the Actinomycetes. Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York. pp. 811-815.

Environnement Canada (1985). *L'épandage des eaux usées traitées et des boues d'épuration d'origine urbaine.* Environnement Canada, SPE 6-EP-84-1. 190p.

Farrelly, V., F. A. Rainey, et E. Stackebrandt (1995). Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes form a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2798-2801.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.

Ferris, M. J. et D. M. Ward (1997). Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1375-1381.

Ferris, M. J., G. Muyzer et D. M. Ward (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 340-346.

Fischer, S. G. et L. S. Lerman (1979a). Lenght-independent separation of DNA-restriction fragments into two dimensional gel electrophoresis. *Cell.* **16**: 191-200.

Fischer, S. G. et L. S. Lerman (1979b). Two-dimensional electrophoretic separation of restriction enzyme fragments of DNA. *Methods Enzymol.* **68**: 183-191.

Fischer, S. G. et L. S. Lerman (1983). DNA fragments differing by single cell base pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondance with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 1579-1583.

Fitch, W. M. et E. Margoliash (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science.* **155**: 279-284.

Forterre, P., N. Benachenhou-Lafha et B. Labedan (1993). Universal tree of life. *Nature.* **362**: 795.

Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen et C. R. Woese (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science.* **209**: 457-463.

Fox, G. E., J. D. Wisotzkey et P. Jurtshuk (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 166-170.

Gale, N. L. et J. V. Beck (1967). Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans. J. Bacteriol.* **94**: 1052-1059.

Gamache, M. (1996). *Caractérisation de la microflore hétérotrophe impliquée dans le procédé simultané de biolixiviation des métaux et de la digestion des boues d'épuration.* Mémoire de maitrise. INRS-Eau, Université du Québec, Sainte-Foy. 116 p.

Gates J. E. et K. D. Pham (1979). An indirect fluorescent antibody staining technique for determining population level of *Thiobacillus ferrooxidans* in acid mine drainage waters. *Microbial Ecol.* **5**: 121-127.

Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen et N. R. Pace (1988). Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**: 720-726.

Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer et K. G. Field (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature.* **345**: 60-63.

Goebel, B. M. et E. Stackbrandt (1994). Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1614-1621.

Goodfellow, M., R. Davenport, F. M. Stainsby et T. P. Curtis (1996). Actinomycete diversity associated with foaming in activated sludge plants. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 268-280.

Gouvernement du Québec (1991). *Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales. Guide des bonnes pratiques.* Ministère de

l'Environnement du Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation. Juillet (1991). 91 p.

Graff, J., J. Ticehurst, et B. Flehmig (1993). Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3165-3170.

Grant, S. B., C. P. Pendroy, C. L. Mayer, J. K. Bellin et C. L. Palmer (1996). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3466-3469.

Green, C. J., G. C. Stewart, M. A. Hollis, B. S. Vold et K. F. Bott (1985). Nucleotide sequence of *Bacillus subtilis* ribosomal RNA operon, *rrn* B. *Gene.* **37**: 261-266.

Grompe, M. (1993). The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics.* **5**: 111-117.

Gruber, T. M. et D. A. Bryant (1997). Molecular systematic studies of eubacteria, using σ^{70}-type sigma factors of group 1 and group 2. *J. Bacteriol.* **179**: 1734-1747.

Guay, R. et M. Silver (1975). *Thiobacillus acidophilus* sp. nov.; isolation and some physiological characteristics. *Can. J. Microbiol.* **21**: 281-288.

Haekel, E. (1866). *Generelle Morphologie der Organismen.* Verlag Georg Reimer, Berlin.

Hanahan, D. (1985). Technique for transformation of *E. coli.* Dans: D. M. Glover (éd.), *DNA cloning, a practical approach.* IRL Press, Oxford. pp. 109-135.

Hanert, H. H. (1992). The Genus *Gallionella.* Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York. pp. 4082-4088.

Harmsen, H. J. M., H. M. P. Kengen, A. D. L. Akkermans, A. J. M. Stams et W. M. de Vos (1996). Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1656-1663.

Harrison, A. P. Jr. (1981). *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**: 327-332.

Harrison, A. P. Jr. (1982). Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparaison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch. Microbiol.* **131**: 68-76.

Harrison, A. P. Jr. (1984). The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 265-292.

Harrison, A.P. Jr. (1978). Microbiol sucession and mineral leaching in an artificial coal spoil. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 861-869.

Havelaar, A. H. (1984). Sludge desinfection- An overview of methods and their effectiveness. Dans: A. Bruce et E. Hozwood (éds), *Sewage sludge stabilization and disinfection.* pp. 48-60.

Hays, B. D. (1977). Potential for parasitic disease transmission with land application of sewage plant effluents and sludges. *Wat. Res.* **11**: 583-595.

Hazeu, W., W. Bijleveld, J. T. C. Grotenhuis, E. Kakes et J. G. Kuenen (1986). Kinetics and energetics of reduced sulfur oxidation by chemostat cultures of *Thiobacillus ferrooxidans. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **52**: 507-518.

Head, I. M., W. D. Hiorns, T. M. Embley, A. J. McCarthy and J. R. Saunders (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1147-1153.

Hedberg, C. W. et M. T. Osterholm (1993). Outbreaks of food-borne and water borne viral gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 199-210.

Henry, G., D. Prasad et W. Lohasa (1988). Survival of indicator bacteria during leaching. A.S.C.E. Nat. Conf. Env. Eng., Compte rendu, 13-15 juillet, Vancouver, Canada. pp. 369-376.

Hill, R. T., W. L. Straube, A. C. Palmisano, S. L. Gibson et R. R. Colwell (1996). Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1741-1746.

Hillis, D. D. et J. J. Bull (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**: 182-193.

Hiorns, W. D., R. C. Hastings, I. M. Head, A. J. McCarthy, J. R. Saunders, R. W. Pickup et G. H. Hall (1995). Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Microbiology.* **141**: 2793-2800.

Hippe, H., J. R. Andreesen et G. Gottshalk (1992). The genus *Clostridium*-Nonmedical. Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York. pp. 1800-1866.

Hirashi, A., et H. Kitamura (1984). Distribution of phototrophic purple nonsulfur bacteria in activated sludge systems and other aquatic environments. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **50**: 1929-1937.

Hirashi, A., K. Masamune et H. Kitamura (1989). Characterization of the bacterial population structure in ana anaerobic-aerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 897-901.

Hoeninger, J. F. M. (1986). Decomposition studies in two Central Ontario lakes having surficial pHs of 4.6 and 6.6. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 489-497.

Holuigue, L., L Herrera, O. M. Phillips, M. Young et J. E. Allende (1987). CO_2 fixation by mineral-leaching bacteria: characteristics of the ribulose biphosphate

carboxylase-oxygenase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**: 497-505.

Horan N. J. et C. R. Eccles (1986). Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Wat. Res.* **20**: 1427-1432.

Hovi, T. M. Stenvik et M. Rosenlew (1996). Relative abundance of enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. *Epidemiol. Infect.* **116**:91-97.

Howgrave-Graham, A. R. et P. L. Stfyn (1988). Application of the fluorescent-antibody technique for the detection of *Sphaerotilus natans* in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 799-802.

Huber, H. et K. O. Stetter (1989). *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal molbilizing bacteria isolated from a marine geothermal field. *Arch. Microbiol.* **151**: 479-485.

Huber, H. et K. O. Stetter (1990). *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 315-322.

Huber, H., G. Huber et K.O. Stetter (1985). A modified DAPI fluorescence staining procedure suitable for the visualization of lithotrophic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 105-106.

Huber, T. F., C. Ras, N. W. F. Kossen (1984). Design and scale up of a reactor for the microbial desulphurization of coal: a kinetic model for bacterial growth and pyrite oxidation. Dans: *Proceedings of the Third European Congress on Biotechnology*, München, Germany, September 10-14. Verlag Chemie **3**: 151-159.

Hutchins, S. R., M. S. Davidson, J. S. Brierley et C. L. Brierley (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 311-336.

Hutchinson, M., K. I. Johnstone et D. White (1966). Taxonomy of the acidophilic thiobacilli. *J. Gen. Microbiol.* **44**: 373-381.

Ingledew W.J. et J. G. Cobley (1980). A potentiometric and kinetic study on the respiratory chain of ferrous-iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **590**: 141-158.

Ingledew, W. J. (1982). *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta.* **683**: 89-117.

Ingledew, W. J., J. C. Cox, et P. J. Halling (1977). A proposed mechanism for energy conservation during Fe^{2+} oxidation by *Thiobacillus ferro-oxidans*: chemiosmotic coupling to net H^+ influx. *FEMS Microbiol. Lett.* **2**: 193-197.

Itaya, M. et T. Tanaka (1991). Complete physical map of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome constructed by a gene-directed mutagenesis method. *J. Mol. Biol.* **220**: 631-648.

Jiang, C.-L. et L.-H. Xu (1996). Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 249-253.

Johnson D. B. et W. I. Kelso (1983). Detection of heterotrophic contaminants in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and their elimination by sulbculturing in media containing copper sulphate. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2969-2972.

Johnson D. B., M. A. Ghauri et M. F. Said (1992). Isolation and characterization of an acidophilic, heterotrophic bacterium capable of oxidizing ferrous iron. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1423-1428.

Johnson, D. B. (1995). Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **23**: 205-218.

Johnson, D. B. et S. McGinness (1991). A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing, acidophilic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **13**: 113-122.

Johnson, D. B. et W. I. Kelso (1983). Detection of heterotrophic contaminants in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and their elimination by sulbculturing in media containing copper sulphate. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2969-2972.

Johnson, D. B., J. H. M. Macvicar et S. Rolfe (1987). A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **7**: 9-18.

Johnson, D. B., P. Bacelar-Nicolau, D. F. Bruhn et F. F. Roberto (1995). Iron-oxidizing heterotrophic acidophiles: ubiquitous novel bacteria in leaching environments. Dans: T. Vargas, C. A. Jerez, J. V. Wiertz et H. Toledo (éds), *Biohydrometallurgical processing vol. I*, Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS-95, Viña del Mar, Chile, November 19-22. University of Chile. pp. 47-56.

Jothikumar, N., K. Aparna, S. Kamatchiammal, P. Paulmurugan, S. Saravanadevi et P. Khanna (1993). Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2558-2562.

Kanungo, J. et K. N. Pandey (1993). Kinasing PCR products for efficient blunt-end cloning and linker addition. *BioTechniques.* **14**: 912-913.

Kaplan, J.-C. et M. Delpech (1993). *Biologie moléculaire et médecine*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. pp. 759-773.

Katayama-Fujimura, Y., N. Tsuzaki et H. Kuraishi (1982). Ubiquinone, fatty acid and DNA base composition determination as a guide to the taxonomy of the genus *Thiobacillus*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1599-1611.

Keene, W. E., J. M. McAnulty et F. C. Howsly (1994). A swimming-associated outbreak of hemorragic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Engl. J. Med.* **331**: 579-584.

Kelly, D. P. et A. P. Harrison (1989). Genus *Thiobacillus*. Dans: J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig et J. G. Holt (éds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 3*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 1842-1858.

Khalid, A. M., Bhatti, T. M. et M. Umar (1993). An improved solid medium for isolation, enumeration and genetic investigations of autotrophic iron- and sulphur-oxidizing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 259-263.

Khalid, Z. M. et K. A. Malik (1987). Isolation and characterization of some acidophilic thiobacilli from sewage waters. *Pakistan. J. Sci. Ind. Res.* **30**: 905-908.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 11-20.

Kohno, T. (1988). Morphology, physiology, and nutrition of a sulphur- oxidizing filamentous organism isolated from activated sludge. *Wat. Sci. Technol.* **20**: 241-247.

Kopczynski, E. C., M. M. Bateson et D. M. Ward (1994). Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 746-748.

Kowalchuk, G. A., J. R. Stephen, W. de Boer, J. I. Prosser, T. M. Embley et J. W. Woldentorp (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1489-1497.

Kuenen, J. G., L. A. Robertson et O. H. Tuovinen (1992). The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, and *Thiosphaera*. Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York. pp. 2638-2657.

Kumar, S., K. Tamura et M. Nei (1993). MEGA- *Molecular evolutionary genetics analysis*. V. 1.0. Institute of molecular evolutionary genetics, Penn. State Univ.

LaCombe Barron, J. et D. R. Lueking (1990). Growth and maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2801-2806.

Lafleur, R., E. D. Roy, D. Couillard D. et R. Guay (1992). Determination of iron oxidizing bacteria numbers by a modified MPN procedure. Dans: A. E. Torma, M. L. Apel et C. L. Brierley (éds), *Biohydrometallurgical technologies vol. II*, Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS-93, Jackson Hole, Wyoming, U.S.A, August 22-25. pp. 443-441.

Lake D. L., P. W. W. Kirk and J. N. Lester (1989). Heavy metals solids association in sewage sludges. *Wat. Res.* **23**: 285-291.

Lane, D. J., A. P. Harrison Jr., D. Stahl, B. Pace, S. J. Giovannoni, G. J. Olsen et N. R. Pace (1992). Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 269-278.

Lane, D. J., D. A. Stahl, G. J. Olsen, D. J. Heller et N. R. Pace (1985a). Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **163**: 75-81.

Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. Stahl, M. L. Sogin et N. R. Pace (1985b). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 6955-6959.

Lawrence, R. W. et R. Poulin (1995). The demand for biotechnology in mining in the 21st century. Dans: Vargas, T., C. A. Jerez, J. V. Wiertz et H. Toledo (éds) *Biohydrometallurgical processing vol. I*, Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS-95, Viña del Mar, Chile, November 19-22. University of Chile pp. 185-195.

Lechevalier, M. P. et H. A. Lechevalier (1974). *Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foaming activated sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**: 278-288.

Lee, D.-H., Y.-G. Zo et S.-J. Kim (1996a). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3112-3120.

Lee, S.-Y., J. Bollinger, D. Bezdicek et A. Ogram (1996b). Estimation of the abundance of an unculture soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3787-3793.

Lemmer, H. (1986). The ecology of scum causing actinomycetes in sewage treatment plants. *Wat. Res.* **20**: 531-535.

Lemmer, H. et M. Baumann (1988). Scum actinomycetes in sewage treatment plants-part 3. Synergisms with other sludge bacteria. *Wat. Res.* **22**: 765-767.

Lemmer, H. et R. M. Kroppenstedt (1984). Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**: 124-135.

Leser, T. D., M. Boye et N. B. Hendriksen (1995). Survival and activity of *Pseudomonas sp.* strain B13(FR1) in a marine microcosm determined by quantitative PCR and rRNA-targeting probe and its effect on the indigenous bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1201-1207.

Lester, J. N. (1987). *Heavy metals in wastewater and sludge treatment processes*. J. N. Lester (éd), CRC Press, Boca Raton, Fla, U.S.A.

Lester, J. N. , R. M. Sterrit et P. W. W. Kirk (1983). Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment process. II. Sludge treatment and disposal. *Sci. Total Envir.* **30**: 45-83.

Levine, M. B., A. T. Hall, G. W. Barrett et D. H. Taylor (1989). Heavy metal concentrations during ten years of sludge treatment to an old-field community. *J. Environ. Qual.* **18**: 411-418.

Liesack, W. et E. Stackebrandt (1992). Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* **174**: 5072-5078.

Liesack, W., H. Weyland et E. Stackebrandt (1991). Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbiol. Ecol.* **21**: 191-198.

Lobos, J. H., T. E. Chisolm, L. H. Bopp et D. S. Holmes (1986). *Acidiphilium organovorum* sp. nov., an acidophilic heterotroph isolated from a *Thiobacillus ferrooxidans* culture. *Int. J. Syst. Bacteriol* **36**: 139-144.

Lodder, J. et N. J. W. Kreger-van Rij (1967). *The Yeasts: a taxonomic study*. North-Holland Pub., Amsterdam.

López-Archilla, A. I., I. Marin, R. Amils (1995). Microbial ecology of an acidic river: biotechnological applications. Dans: C. A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo et J. V. Wiertz (éds) *Biohydrometallurgical processing vol. II*, Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS-95, Viña del Mar, Chile, November 19-22. University of Chile. pp. 63-73.

Lundgren, D. G. et M. Silver (1980). Ore leaching by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 263-283.

Maciag, W. J. et D. G. Lundgren (1964). Carbon dioxide fixation in the chemoautotroph *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**: 603-607.

MacNicol, R. D., et P. H. T. Beckett (1989). The distribution of heavy metals between the principal components of digested sewage sludge. *Wat. Res.* **23**: 199-206.

Maidak, B. L., N. Larsen, G. J. Olsen, M. J. McCaughey, R,. Overbeek, T. J. Macke, K. Fogel, J. Blandy et C. R. Woese (1994). The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* **22**: 3485-3487.

Manning, H. L. (1975). New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidophilic bacteria from acid mine drainage. *Appl. Microbiol.* **30**: 1010-1016.

Manz, W., M. Wagner, R. Amann et K.-H. Schleifer (1994). In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.* **28:** 1715-1723.

Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt et K.-H. Schleifer (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environement. *Microbiology.* **142**: 1097-1106.

Manz, W., U. Szewzyk, P. Ericsson, R. I. Amann, K.-H. Schleifer et T.-A. Stenström (1993). In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2293-2298.

Markosyan, G. E. (1972). A new iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* gen. sp. nov. *Biol. Zh. Arm.* **25**: 26.

Martin, M. T., I. G. Rivera, D. L. Clarck, et B. H. Olson (1992). Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal *o*-nitrophenol- ß-D-galactopyranoside-4-methylumbelliferyl- ß-D-glucoronide media. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3095-3100.

Mayer, C. L. et C. J. Palmer (1996). Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2081-2085.

McGrath, S. P. et P. W. Lane (1989). An explanation for the apparent losses of metals in a long-term field experiment with sewage sludge. *Envir. Pollut.* **60**: 235-245.

Medlin, L., H. J. Elwood, S. Stickel et M. L. Sogin (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions. *Gene.* **71**: 491-499.

Meyerhans, A., J. Yartanian et S. Wain-Hobson (1990). DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1687-1691.

Ministère de l'environnement (1987). *Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales. Guide des bonnes pratiques.* Gouvernement du Québec. QEN/QE/AE/56/1. 60 p.

Mishra, A. K., P. Roy et S. S. Roy Mahapatra (1983). Isolation of *Thiobacillus ferrooxidans* from various habitats and their growth pattern on solid medium. *Curr. Microbiol.* **8**: 147-152.

Mitchell, P. (1966). Chemoisosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev.* **41**: 445-504.

Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann et D. A. Stahl (1996). Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2156-2162.

Moré, M. I., J. B. Herrick, M. C. Silva, W. C. Ghiorse et E. L. Madsen (1994). Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1572-1580.

Morel, F. M. M. (1983). *Principles of Aquatic Chemistry.* Wiley-Interscience, New-York, NY, 301 p.

Muir, M. K. et T. Andersen (1977). Determination of ferrous iron in copper-process metallurgical solutions by the *o*-phenanthroline colorimetric method. *Metall. Trans.* **8B**: 517-518.

Mulder, E. G. et M. H. Deinema (1992). The sheated bacteria. Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York. pp. 2612-2624.

Murray, A. E., J. T. Hollibaugh et C. Orrego (1996). Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2676-2680.

Muyzer, G., de Bruyn, A. C., Schmedding, D. J. M., Bos, P., Westbroek, P. et G. J. Kuenen (1987). A combined immunofluorescence-DNA-fluorescence staining technique for enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* in a population of acidophilic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 660-664.

Muyzer, G., E. DeWall et A. G. Uitterlinden (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.

Myers, R. M., L. S. Lerman et T. Maniatis (1985). A general model for saturation mutagenesis of cloned DNA fragments. *Science.* **229**: 242-247.

Myers, R. M., S. C. Fischer, L. S. Lerman et T. Maniatis (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res.* **13**: 3131-3145.

Myers, R. M., T. Maniatis et L.S. Lerman (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **155**: 501-527.

Myerson, A. S. et P. C. Kline (1984). Continuous bacterial coal desulfurization employing *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 92-99.

Mylvaganam, S. et P. P. Dennis (1992). Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaebacterium *Haloarcula marismortui*. *Genetics.* **130**: 399-410.

Nagpal S. et D. Dahlstrom (1993). Effect of carbon dioxide concentration on the biolaching of a pyrite-arsenopyrite ore concentrate. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 459-464.

Neef, A., A. Zaglauer, H. Meier, R. Amann, H. Lemmer et K.-H. Schleifer (1996). Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus denitrificans* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:** 4329-4339.

Nerkar D. P., U. S. Kumta et N. F. Lewis (1977). Pyruvate inhibition of *Ferrobacillus ferrooxidans* reversed by *Rhodotorula* yeast. *J. Appl. Bacteriol.* **43**: 117-121.

Norberg, A. et S. Rydin (1984). Development of a continuous process for metal accumulation by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 265-268.

O'Donnell, C. J., K. B. Meyer, J. V. Jones, T. Benton, E. S. Kaneshiro, J. S. Nichols, et F. W. Schaefer (1984). Survival of parasite eggs upon strorage in sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 618-625.

Ogram, A., G. S. Sayler et T. Barkay (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods.* **7**: 57-66.

Onysko, S. J., R. L. P. Kleinmann et P. M. Erickson (1984). Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: Inhibition with benzoic acid, sorbic acid, and sodium lauryl sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 229-231.

Ottolenghi, A. C. et V. V. Hamparian (1987). Multiyear study of sludge application to farmland: Prevalence of bacterial enteric pathogens and antibody status of families. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1118-1124.

Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane et G. J. Olsen (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. Dans: K.C. Marshall (éd.), *Advances in microbial ecology, Vol. 9*. Plenum Press, New York. pp.1-55.

Parmelee, M. A. (1990). Outbreak reveals vulnerability of water operations. *Am. Water Works Assoc. MainStream.* **34**: 1-9.

Payment, P. (1993). *Risques d'exposition des travailleurs à des virus entériques à la suite de l'épandage de boues provenant de stations d'épuration d'eau usées municipales.* Rapport émis pour le Ministère des Forêts du Québec. Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, 21 p.

Payment, P. et E. Franco (1993). *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2418-2424.

Pillai, S. D., K. L. Josephson, R. L. Bailey, C. P. Gerba et I. L. Pepper (1991). Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2283-2286.

Pizarro, J., E. Jedlicki, O. Orellana, J. Romero et R. T. Espejo (1996). Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1323-1328.

Porter, J., C. Edwards, J. A. Morgan et R. W. Pickup (1993). Rapid, automated separation of specific bacteria from lake water ansd sewage by flow cytometry and cell sorting. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3327-3333.

Poulsen, L. K., G. Ballard et D. A. Stahl (1993). Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1354-1360.

Prakasam, T. S. B. et N. C. Dondero (1967). Aerobic heterotrophic populations of sewage and activated sludge. I. Enumeration. *Appl. Microbiol.* **15**: 461-467.

Pronk, J. T., J. C. de Bruyn et J. G. Kuenen (1992). Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2227-2230.

Pronk, J. T., W. M. Meijer, W. Hazeu, J. P. van Dijken, P. Bos et J. G. Kuenen (1991a). Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2057-2062.

Pronk, J. T., K. Liem, P. Bos et J. G. Kuenen (1991b). Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2063-2068.

Pronk, J. T., R. Meulenberg, D. J. C. van den Berg, W. Batenburg-van der Vegte, P. Bos et J. G. Kuenen (1990). Mixotrophic and autotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* on glucose and thiosulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3395-3401.

Ramalingaswami, V. et R. H. Purcell (1988). Waterborne non-A, non-B hepatitis. *Lancet.* **ii**: 571-573.

Raskin, L., D. Zheng, M. E. Griffin, P. G. Stroot et P. Misra (1995). Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **68**: 297-308.

Raskin, L., R. I. Amann, L. K. Poulsen, B. E. Rittmann et D. A. Stahl (1995). Use of ribosomal RNA-based molecular probes for characterization of complex microbial communities in anaerobic biofilms. *Wat. Sci. Technol.* **31**: 262-272.

Ratnaningsih, E., S. Dharmsthiti, V. Krishnapillai, A. Morgan, M. Sinclair et B. W. Holloway (1990). A combined physical and genetic map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2351-2357.

Reichenbach, H. (1992). The order Cytophagales. Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York. pp. 3631-3675.

Risatti, J. B., W. C. Capman et D. A. Stahl (1994). Community structure of a microbial mat: the phylogenetic dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 10173-10177.

Römling, U., D. Grothues, W. Bautsch et B. Tymmler (1989). A physical genome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *EMBO J.* **8**: 4081-4089.

Rossello-Mora, R. A., M. Wagner, R. Amann et K.-H. Schleifer (1995). The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 702-707.

Rossi, G. (1990). *Biohydrometallurgy*. McGraw-Hill, New York.

Sagredo, B., E. Jedlicki et O. Orellana (1992). Organization of the 16S-23S intergenic spacer region of the two rRNA operons from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. J.* **10**: 239-247.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis et H. A. Ehrlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**: 487-491.

Saitou, N. et M. Nei (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

Sambrook, J., E. F. Fritsch et T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.

Sand, W., K. Rohde, B. Sobotke et C. Zenneck (1992). Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 85-92.

Sandén, B., C. Grunditz, Y. Hansson et G. Dalhammar (1993). Quantification and characterization of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* using monoclonal antibodies. Dans: *Les micro-organismes dans les boues activées et les biofilms*, proceedings of the first international symposium. 27-28 septembre, Paris. pp. 13-18.

Sanger, F., S. Nicklen et A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.

Santegoeds, C. M., S. C. Nold et D. M. Ward (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3922-3928.

Scarpino, P. V., L. Fradkin, C. Scott Clark, N. E. Kowal, E. Lomnitz, M. Baseheart, J. M. Peterson, R. L. Ward et M. Hesford (1988). Microbiological risk assessment for land application of municipal sludge. Dans: J. J. Lichtenberg, J. A. Winter, C. I. Weber et L. Fradkin (éds.), *Chemical and biological characterization sludges, sediments, dredge spoils, and drilling muds*. ASTM STP 976, American Society for Testing and Materials, Philadelphia. pp. 480-488.

Scheltinga, H. M. J. (1987). Sludge in agriculture: the european approach. *Wat. Sci. Technol.* **19**: 9-18.

Scherrer, B. (1984). *Biostatistique*. G. Morin (éd.), Chicoutimi, Canada. 850 p.

Schink, B. (1992). Syntrophism among prokaryotes. Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York. pp. 277-299.

Schink, B., et R. K. Thauer (1988). Energetics of syntrophic methane formation and the influence of aggregation. Dans: G. Lettinga, A. J. B. Zehnder, J. T. C. Grotenhuis et L. W. Hulshoff Pol (éds), *Granular anaerobic sludge: microbiology and biotechnology*. Pudoc, Wageningen, Germany. pp. 5-17.

Schippers, A., R. Hallmann, S. Wentzien et W. Sand (1995). Microbial diversity in uranium mine waste heap. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2930-2935.

Schmidt, T. M., E. F. DeLong et N. R. Pace (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* **173**: 4371-4378.

Schuppler, M., F. Mertens, G. Schön et U. B. Göbel (1995). Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis. *Microbiology.* **141**: 513-521.

Shafia F. et R. F. Wilkinson Jr. (1969). Growth of *Ferrobacillus ferrooxidans* on organic matter. *J. Bacteriol.* **97**: 256-260.

Shafia, F., K. R. Brinson, M. W. Heinzman et J. M. Brady (1972). Transition of chemolithotroph *Ferrobacillus ferrooxidans* to obligate organotrophy and metabolic capabilities of glucose-grown cells. *J. Bacteriol.* **111**: 56-65.

Shah, H. N. (1992). The Genus *Bacteroides* and related taxa. Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York. pp. 3593-3607.

Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman et R. M. Myers (1989). Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 232-236.

Shin, Y., A. Hirashi et J. Sugiyama (1993). Molecular systematics of the genus *Zoogloea* and emendation of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 826-831.

Shooner, F. et R. D. Tyagi (1996). Thermophilic microbial leaching of heavy metals from municipal sludge using indigenous sulphur-oxidizing microbiota. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 440-446.

Shooner, F., J. Bousquet, et R. D. Tyagi (1996). Isolation, phenotypic characterization, and phylogenetic position of a novel, facultatively autotrophic, moderately thermophilic bacterium, *Thiobacillus thermosulfatus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 409-415.

Shuldiner, A. R., A. Nirula, et J. Roth (1989). Hybrid DNA artifact from PCR of closely related target sequences. *Nucleic Acids Res.* **17**: 4409.

Shuler, M. L. et H. M. Tsuchiya (1975). Determination of cell number and cell size for *Thiobacillus ferrooxidans* by the electrical resistance method. *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 621-624.

Shuttleworth, K. L. et R. F. Unz (1993). Sorption of heavy metals to the filamentous bacterium *Thiothrix* strain A1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1274-1282.

Siefert, E., R. L. Irgens et N. Pfennig (1978). Phototrophic purple and green bacteria in a sewage treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 38-44.

Siegel, S. M., M. Galun et B. Z. Siegel (1990). Filamentous fungi as metal biosorbents: A review. *Wat. Air Soil Pollut.* **53**: 335-344.

Siering, P. L. et W. C. Ghiorse (1997). Development and application of 16S rRNA-targeted probes for detection of iron and manganese-oxidizing sheated bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 644-651.

Silver, M., P. Margalith et D. G. Lundgren (1967). Effect of glucose on carbon dioxide assimilation and substrate oxidation by *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **93**: 1765-1769.

Simon L., M. Lalonde et T. D. Bruns (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 291-295.

Singer, P. C. et W. Stumm (1970). Acid mine drainage: the rate determining step. *Science.* **167**: 1121-1123.

Slijkhuis, H. et M. H. Deinema (1982). The physiology of *Microthrix parvicella*, a filamentous organism isolated from activated sludge. Dans: B. Chambers et E. J. Tomlinson (éds), *Bulking in activated sludge: preventative and remedial methods.* Ellis Horwood Ltd., Chichester, U. K. pp. 75-83.

Smith, D. C., M. Simon, A. L. Alldredge et F. Azam (1992). Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature.* **359**: 139-142.

Soddell, J. A. et R. J. Seviour (1990). Microbiology of foaming in activated sludge. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 145-176.

Southam, G. et T. J. Beveridge (1993). Examination of lipolysaccharide (O-antigen) populations of *Thiobacillus ferrooxidans* from two mine tailings. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1283-1288.

St-Yves, A., et R. Beaulieu (1988). *Caractérisation des boues de 34 stations d'épuration des eaux usées municipales*. Ministère de l'Environnement du Québec. 11 p.

Stackbrandt, E. et B. M. Goebel (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.

Stackbrandt, E. et W. Ludwig (1994). The importance of choosing outgroup reference organism in phylogenetic studies: the *Atopium* case. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**: 39-43.

Stackbrandt, E., W. Liesack et B. M. Goebel (1993). Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J.* 7: 232-236.

Stackebrandt, E. (1992). Unifying phylogeny and phenotypic diversity. Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York. pp. 19-47.

Sterritt, R. M. et J. N. Lester (1980). The value of sewage sludge to agriculture and effects of the agricultural use of sludges contaminated with toxic elements: a review. *Sci. Total Environ.* **16**: 55-90.

Stoner, D. L., C. K. Browning, D. K. Bulmer, T. E. Ward et M. T. MacDonell (1996). Direct 5S rRNA assay for monitoring mixed-culture bioprocesses. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1969-1976.

Storey, G. W. (1987). Survival of tapeworm eggs, free and in proglottids, during simulated sewage treatment processes. *Wat. Res.* **21**: 199-203.

Stratton, H. M., R. J. Seviour, J. A. Soddell, L. L. Blackall et D. Muir (1996). The opportunistic pathogen *Nocardia farcinica* is a foam-producing bacterium in activated sludge plants. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 342-346.

Straub, T. M., I. L. Pepper, et C. P. Gerba (1992). Persistence of viruses in desert soils amended with anaerobically digested sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 636-641.

Straub, T. M., I. L. Pepper, M. Abbaszadegan et C. P. Gerba (1994). A method to detect enteroviruses in sewage sludge-amended soil using the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1014-1017.

Sykes, P. J., S. H. Neoh, M. J. Brisco, E. Hughes, J. Condon et A. A. Morley (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques.* **13**: 444-449.

Tabita, R. et D. G. Lundgren (1971a). Heterotrophic metabolism of the chemolitotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **108**: 334-342.

Tabita, R. et D. G. Lundgren (1971b). Utilization of glucose and the effect of organic compounds on the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **108**: 328-333.

Takizawa, M., Straube, W. L., Hill, R. T. et R. R. Colwell (1993). Near-bottom pelagic bacteria at a deep-water sewage sludge disposal site. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3406-3410.

Tebbe, C. C. et W. Vahjen (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2657-2665.

Temple, K. L. et A. R. Colmer (1951). The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **62**: 605-611.

Teske, A. , E. Alm, J. M. Regan, S. Toze, B. E. Rittmann et D. A. Stahl (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* **176**: 6623-6630.

Teske, A., P. Sigalevich, Y. Cohen et G. Muyzer (1996). Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal

DNA fragments as a tool for isolation in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4210-4215.

Thiele, J. H. et J. G. Zeikus (1988). Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion. The role of formate versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 20-29.

Tjell, J. C. (1986). Trace metal regulations for sludge utilization in agriculture: a critical review. Dans: P. L'Hermite (éd.), *Processing and use of organic sludge an liquid agricultural wastes*, Commission of the European Communities, Compte rendu, 8-11 octobre, Rome. D. Reidel Publishing Co., Italie. pp. 348-361.

Trivedi, N. C. et H. M. Tsuchiya (1975). Microbial mutualism in leaching of Cu-Ni sulphide concentrate. *Int. J. Miner. Process.* **2**:1-14.

Tsai, Y.-L. et B. H. Olson (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1070-1074.

Tsai, Y.-L. et B. H. Olson (1992a). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2292-2295.

Tsai, Y.-L. et B. H. Olson (1992b). Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 754-757.

Tsai, Y.-L., C. J. Palmer et L. R. Sangermano (1993). Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 353-357.

Tsuchiya, H. M. , N. C. Trivedi et M. L. Schuler (1974). Microbial mutualism in ore leaching. *Biotechnol. Bioeng.* **16**:991-995.

Tuovinen O. H. et D. J. Nicholas (1977). Transition of *Thiobacillus ferrooxidans* KG-4 from heterotrophic groth on glucose to autotrophic growth on ferrous-iron. *Arch. Microbiol.* **114**: 193-195.

Tuovinen, O. H. et D. P. Kelly (1973). Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron-agar to determine viable numbers, and comparison with $^{14}CO_2$-fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Mikrobiol.* **88**: 285-298.

Tuovinen, O. H., S. I. Niemela et H. G. Gyllenberg (1971). Effect of mineral nutrients and organic substances on the development of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.* **13**: 517-527.

Tuttle, J. H. et P.R. Dugan (1976). Inhibition of growth, iron, and sulfur oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans* by simple organic compounds. *Can. J. Microbiol.* **22**: 719-730.

Tuttle, J. H., P. R. Dugan et W. A. Apel (1977). Leakage of cellular material from *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of organic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 459-469.

Tyagi, R. D. et D. Couillard (1987). Bacterial leaching of metal from digested sewage sludge. *Proc. Biochem.* **22**: 114-117.

Tyagi, R. D., J.-F. Blais et J.-C. Auclair (1993). Bacterial leaching of metals from sewage sludge by indigenous iron-oxidizing bacteria. *Envir. Pollut.* **82**: 9-12.

U.S. Environmental Protection Agency (1989). *Environmental regulations and technology: control of pathogens in municipal wastewater sludge*, EPA/625/10-89/006.

Valkova-Valchanova, M. B. et S. H. P. Chan (1994). Purification and characterization of two new c-type cytochromes involved in Fe^{2+} oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 61-70.

Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters et J. Swings (1997). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407-438.

Vernon, L. P., Mangum, J. H., Beck, J. V. et F. M. Shafia (1960). Studies on a ferrous-ion-oxidizing bacterium. Cytochrome composition. *Arch. Biochem. Biophys.* **88**: 227-231.

Vesilind, P. A (1980). *Treatment and disposal of wastewater sludges*. P. A. Vesilind (éd.). Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Michigan, U. S. A. 323 p.

Visca P., E. Bianchi, M. Polidoro, V. Buonfiglio, P. Valenti et N. Orsi (1989). A new solid medium for isolating and enumerating *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **35**: 71-81.

Völsch, A., W. F. Nader, H. K. Geiss, G. Nebe et C. Birr (1990). Detection and analysis of two serotypes of ammonia-oxidizing bacteria in sewage plants by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2430-2435.

von Reyn, C. F., J. N. Maslow, T. W. Barber, J. O. Falkinham III et R. D. Arbeit (1994). Persistent colonization of potable water as a source of *Mycobacterium avium* in AIDS. *Lancet.* **343**: 1137-1141.

Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer et K.-H. Schleifer (1993). Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1520-1525.

Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi et K.-H. Schleifer (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 792-800.

Wakao, N., Hanada, K., Takahashi, A., Sakurai, Y. et H. Shiota (1991). Morphological, physiological, and chemotaxonomical characteristics of iron-and sulfur-oxidizing bacteria isolated from acid mine drainage waters. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**: 35-48.

Waksman, S. A. et J. S. Joffe (1921). Acid production by a new sulfur oxidizing bacterium. *Science.* **53**: 216.

Wallace, R. Jr. (1987). Nontuberculous mycobacteria and water: a love affair with increasing clinical importance. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **1**: 677-686.

Wallner, G., R. Erhart, et R. Amann (1995). Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1859-1866.

Ward, D. M., R. Weller et M. M. Bateson (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* **345**: 63-65.

Ward, R. L. et C. S. Ashley (1977). Inactivation of enteric viruses in wastewater sludge through dewatering by evaporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 564-570.

Ward, R. L., J. G. Yeager, et C. S. Ashley (1981). Response of bacteria in wastewater sludge to moisture loss by evaporation and effect of moisture content on bacterial inactivation by ionizing radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1123-1127.

Watanabe, K. et S. Hino (1996). Identification of a functionally important population in phenol-digesting activated sludge with antisera raised against isolated bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3901-3904.

Wawer, C. et G. Muyzer (1995). Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2203-2210.

Way, J. S., K. L. Josephson, S. D. Pillai, M. Abbaszadegan, C. P. Gerba et I. L. Pepper (1993). Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1473-1479.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. et H. G. Trüper (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches of bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 463-464.

Webber, M. D. (1986). *Épandage des boues d'épuration sur les terres agricoles- une évaluation.* Direction générale de la recherche, Agriculture Canada. 42 p.

Whittaker, R. H. (1969). New concepts of kingdoms organisms. *Science.* **163**: 150-160.

Wichlacz, P. L. et D. L. Thompson (1988). The effect of acidophilic heterotrophic bacteria on the leaching of cobalt by *Thiobacillus ferrooxidans*. Dans: P. R. Norris, D. P. Kelly (éds.), *Biohydrometallurgy*, Proceedings of the International Symposium, Warwick, U.K. pp. 77-86.

Wichlacz, P. L. et R. F. Unz (1981). Acidophilic, heterotrophic bacteria of acidic mine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1254-1261.

Wichlacz, P. L., R. F. Unz et T. A. Langworthy (1986). *Acidiphilium angustum* sp. nov., *Acidiphilium facilis* sp. nov., and *Acidiphilium rubrum* sp. nov.: acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 197-201.

Wiley, B. B. et S. C. Wasterberg (1969). Survival of human pathogens in composted sewage. *Appl. Microbiol.* **18**: 994-1001.

Williams, T. M. et R. F. Unz (1985). Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: Characterization of *Thiothrix*, *Beggiatoa*, and Eikelboom type 021N strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 887-898.

Wilson, A. C., L. R. Maxson, V. M. Sarich (1974). Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**: 2843-2847.

Woese, C. R., O. Kandler et M. L. Wheelis (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archae, bacteria and eukarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 4576-4579.

Woese, C. R., R. Gutell, R. Gupta et H. F. Noller (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **47**: 621-669.

Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.

Woese, C.R. (1994). There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.* **60**: 1-9.

Wong, L, et J. G. Henry (1988). Bacterial leaching of heavy metals from anaerobically digested sludge. Dans: D. L. Wise (éd.), *Biotreatment Systems vol. II.* CRC Press, Boca Raton, Fla, U.S.A. pp 125-169.

Wong, L. et J. G. Henry (1984). Decontaminating biological sludge for agriculture use. *Wat. Sci. Technol.* **17**: 575-586.

Yeager, J. G. et R. L. Ward (1981). Effect of moisture contents on long-term survival and regrowth of bacteria in wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1117-1122.

Yeh, T. Y., J. R. Godshalk, G. J. Olson et R. M. Kelly (1987). Use of epifluorescence microscopy for characterizing the activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on iron pyrite. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 138-146.

Young, C. C., R. L. Burghoff, L. G. Keim, V. Minak-Bernero, J. R. Lute et S. M. Hinton (1993). Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1972-1974.

Zavarzin, G. A. (1972). A heterotrophic satellite of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology*. **41**: 323-324.

Zeikus, J. G. (1977). The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**: 514-541.

Zheng, D., E. W. Alm, D. A. Stahl et L. Raskin (1996). Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4504-4513.

Zuckerkandl, E. et L. Pauling (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **8**: 357-366.

ANNEXE A: INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES AU CHAPITRE II

A.1 Méthode de dosage des ions ferreux

Pour réaliser ce dosage, un tampon acétate à pH 3,3 était préparé comme suit: 125 g de $NH_4C_2H_3O_2$ étaient dissous dans 75 ml d'eau déminéralisée et ensuite, 350 ml d'acide acétique concentré étaient ajoutés; enfin, 900 ml d'acide acétique concentré étaient ajoutés à 400 ml de cette solution. Pour la mesure des ions ferreux (Fe^{2+}), 1 ml d'échantillon dilué était mélangé avec 3 ml de tampon acétate dilué 1:3. Ensuite, 1 ml de solution de 1,10 ortho-phenanthroline 0,1% (poids/vol, Sigma) était ajouté et la densité optique était mesurée à 510 nm après 1 heure d'incubation. La mesure du fer total se faisait de façon similaire, sauf que 1 ml d'échantillon était mélangé avec 2 ml de tampon acétate dilué 1:2 et ensuite, 1 ml d'hydroxylamine 10% (poids/vol) était ajouté pour la réduction complète des ions. Les étapes subséquentes étaient les mêmes que pour la mesure des ions ferreux. Le dosage d'une solution standard de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ était réalisé à chaque analyse et une droite de calibration est présentée à la figure A.1. Les concentrations de fer ferrique (Fe^{3+}) ont été obtenues par soustraction (Fe_{total} - Fe^{2+}).

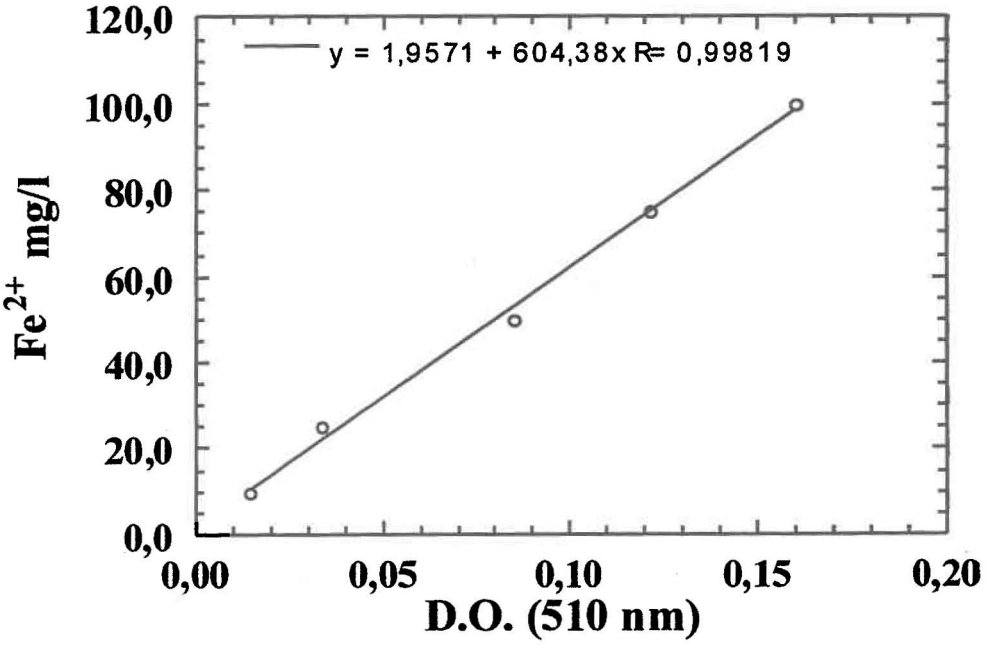
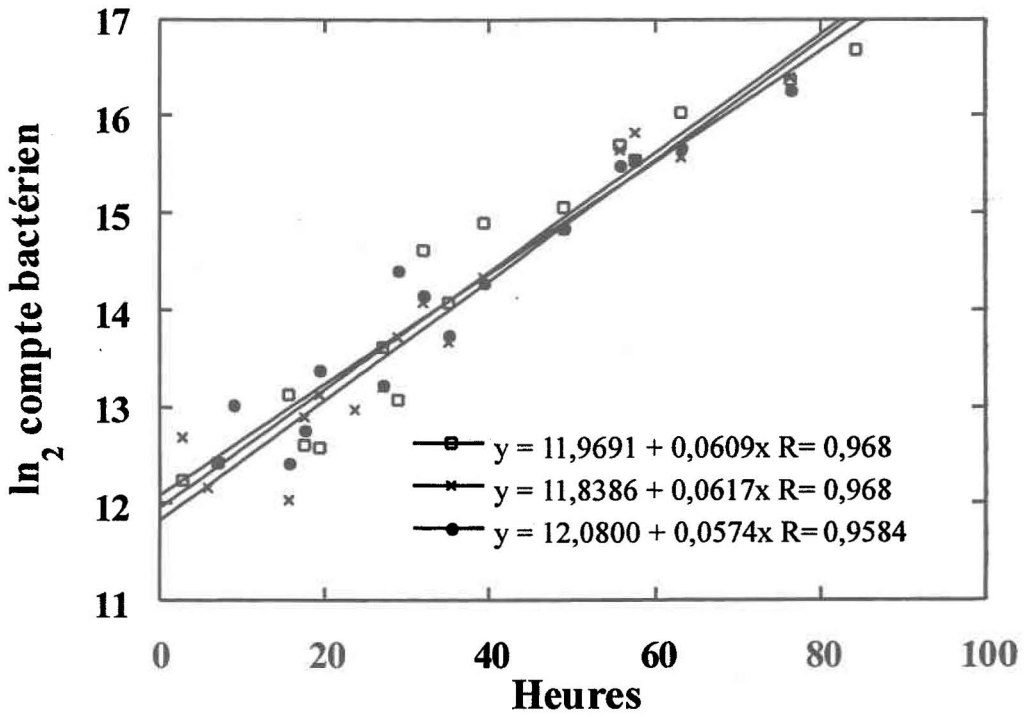


Figure A.1 Droite de calibration lors du dosage selon la méthode de l'*o*-phénanthroline.

A.2 Évaluation des taux de croissance maximum (μ_{max}).

Les figures A.2 et A.3 montrent les graphiques ayant servi à l'évaluation du μ_{max} pour les cultures de *T. ferrooxidans* réalisées en milieu liquide. Les concentrations cellulaires furent évaluées par comptage microscopiques.

(a)



(b)

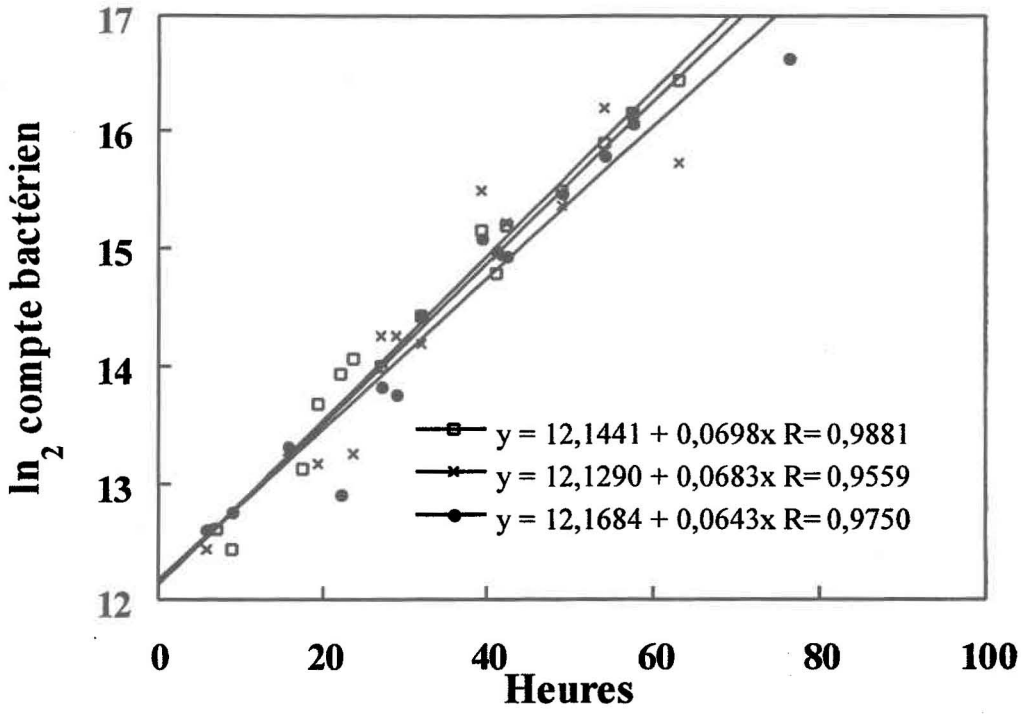
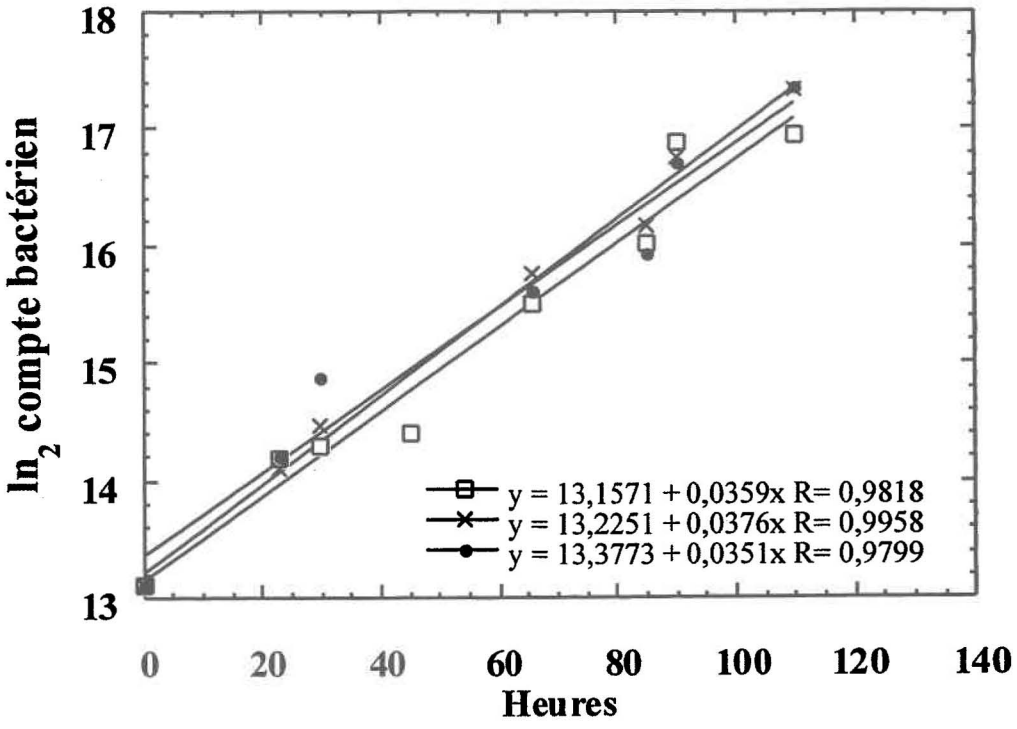


Figure A.2 Calcul du taux de croissance (μ) de *T. ferrooxidans* dans le milieu MS-Fe-Ye-Glu à 25°C (a) en culture pure et (b) en culture mixte avec *R. rubra*. Essai no. 1 (□); Essai no. 2 (×); Essai no. 3 (●).

(a)



(b)

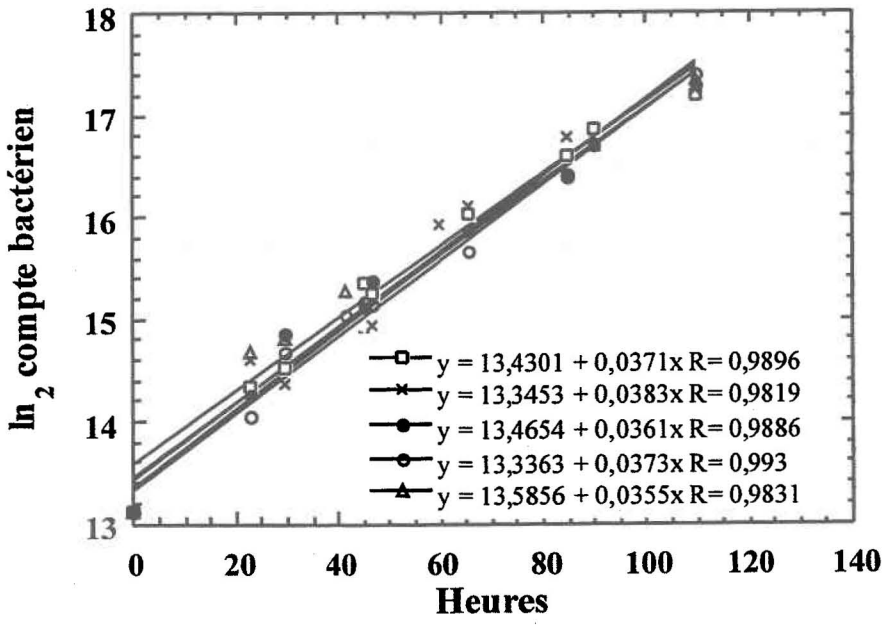


Figure A.3 Calcul du taux de croissance (μ_{max}) de *T. ferrooxidans* en culture pure à 20°C dans les milieux: (a) MS-Fe; (b) MS-Fe-Ye. Essai no. 1 (□); Essai no. 2 (×); Essai no. 3 (●); Essai no. 4 (○); Essai no. 5 (△).

ANNEXE B: INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES AU CHAPITRE III

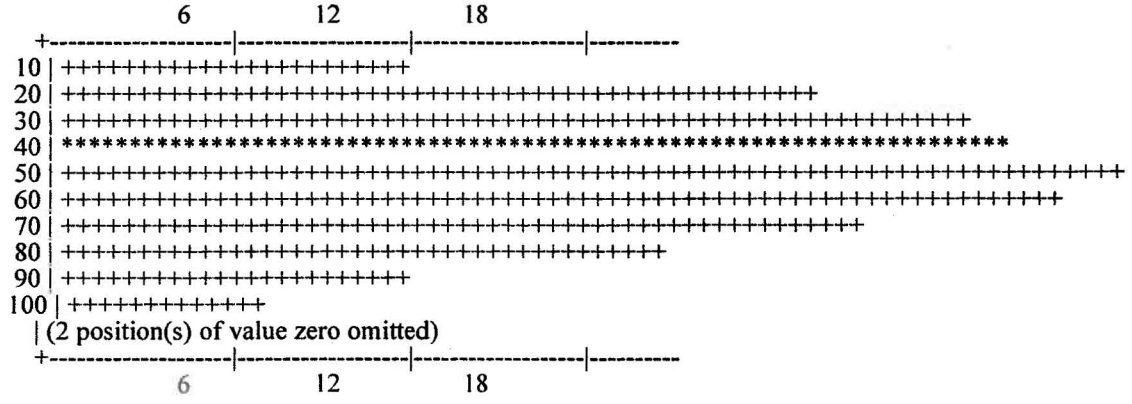
B.1 Détection des molécules chimériques

La détection de molécules chimériques a été réalisée avec le programme "Chimera Check" du Ribosomal database Project (Maidak et al. 1994). Les résultats obtenus pour Sed 2, sont présentés ci-bas. La méthode consiste à fragmenter les molécules et à comparer les fragments avec des espèces connues. On reconnaît les molécules chimériques lorsque les fragments sont plus fortement reliés à des espèces connues que ne l'est la séquence entière. Les molécules chimériques comportent donc clairement deux régions distinctes, qui sont représentées par les histogrammes horizontaux. C'est le cas pour la molécule Sed 2, présentée ci-bas. Les séquences de Sed 1 et de *A. cryptum* sont présentées à titre informatif, pour montrer l'absence d'une telle fragmentation.

Analysis Results

Chimera Check

CHECK_CHIMERA version 2.5
Niels Larsen, niels@darwin.life.uiuc.edu
Date : Fri Apr 18 18:08:48 1997
Short-ID : **Sed 2**
RDP data : SSU_Prok
Comments : A minimum of 50 unique oligos required
: A total of 0 sequences were excluded
: 2849 sequences were included in the search
: The screening was based on 7-base oligomers
CPU time : 0.57 seconds



FRAGMENT 1, approximate sequence positions 1 to 40:
40 Sed 2 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
1.000	1255	Thb.thioo4	Thiobacillus thiooxidans str. isolate B-53.
1.000	1186	Thb.thioo2	Thiobacillus thiooxidans.
1.000	1359	Thb.caldus	Thiobacillus caldus.
1.000	1254	Thb.ferro9	Thiobacillus ferrooxidans str. isolate N-Fe4.
1.000	1253	Thb.ferr10	Thiobacillus ferrooxidans str. isolate N-Fe2.
1.000	1254	Thb.ferr12	Thiobacillus ferrooxidans str. isolate N-Fe3.
0.850	992	Thb.thioo3	Thiobacillus thiooxidans str. 3/TA.
0.850	1031	Thb.ferro3	Thiobacillus ferrooxidans.
0.800	873	Thb.ferro5	Thiobacillus ferrooxidans str. F221.
0.800	898	Thb.ferro2	Thiobacillus ferrooxidans.

89 Sed 2 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
1.000	1294	Acdp.cryp3	Acidiphilium cryptum.
1.000	1296	Acdp.organ	Acidiphilium organovorum.
0.955	1183	Acdp.cryp2	Acidiphilium cryptum str. isolate B-Het4.
0.787	1036	env.MC74	str. MC 74.
0.775	1328	Acdp.rubr2	Acidiphilium rubrum.
0.775	1328	Acdp.angu2	Acidiphilium angustum.
0.775	1313	Acdp.spC1	Acidiphilium sp. str. C-1.
0.674	923	Thb.acidop	Thiobacillus acidophilus.
0.652	1361	Rpl.globif	Rhodopila globiformis str. 7950.
0.652	867	Acdp.spQBP	Acidiphilium sp. str. QBP.

FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 129:
129 Sed 2 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.814	1294	Acdp.cryp3	Acidiphilium cryptum.
0.814	1296	Acdp.organ	Acidiphilium organovorum.
0.783	1183	Acdp.cryp2	Acidiphilium cryptum str. isolate B-Het4.
0.705	1328	Acdp.angu2	Acidiphilium angustum.
0.705	1328	Acdp.rubr2	Acidiphilium rubrum.
0.674	1313	Acdp.spC1	Acidiphilium sp. str. C-1.
0.651	1036	env.MC74	str. MC 74.
0.620	923	Thb.acidop	Thiobacillus acidophilus.
0.612	1254	Thb.ferr12	Thiobacillus ferrooxidans str. isolate N-Fe3.
0.605	1253	Thb.ferr10	Thiobacillus ferrooxidans str. isolate N-Fe2.
0.597	1186	Thb.thioo2	Thiobacillus thiooxidans.
0.597	1359	Thb.caldus	Thiobacillus caldus.
0.589	1361	Rpl.globif	Rhodopila globiformis str. 7950.
0.589	1254	Thb.ferro9	Thiobacillus ferrooxidans str. isolate N-Fe4.
0.574	867	Acdp.spQBP	Acidiphilium sp. str. QBP.
0.566	1385	Aba.paster	Acetobacter pasteurianus str. isolate LMD 22.1.
0.558	1384	Aba.methan	Acetobacter methanolicus.
0.550	1310	Acdp.alyti	Acidiphilium aminolytica str. 101.
0.550	1322	Aba.aceti	Acetobacter aceti.
0.543	1332	Acdp.faci2	Acidiphilium facilis.

Analysis Results

Chimera Check

CHECK_CHIMERA version 2.5
Niels Larsen, niels@darwin.life.uiuc.edu
Date : Fri Apr 18 18:31:07 1997
Short-ID : **Acidiphilium cryptum**
RDP data : SSU_Prok
Comments : A minimum of 50 unique oligos required
: A total of 0 sequences were excluded
: 2849 sequences were included in the search
: The screening was based on 7-base oligomers
CPU time : 0.52 seconds

FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 129:
129 Acidiphilium cryptum Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
1.000	1294	Acdp.cryp3	Acidiphilium cryptum.
1.000	1296	Acdp.organ	Acidiphilium organovorum.
0.969	1183	Acdp.cryp2	Acidiphilium cryptum str. isolate B-Het4.
0.806	1313	Acdp.spC1	Acidiphilium sp. str. C-1.
0.798	1036	env.MC74	str. MC 74.
0.775	1328	Acdp.rubr2	Acidiphilium rubrum.
0.775	1328	Acdp.angu2	Acidiphilium angustum.
0.721	1361	Rpl.globif	Rhodopila globiformis str. 7950.
0.713	804	env.MC106	str. MC 106.
0.705	923	Thb.acidop	Thiobacillus acidophilus.
0.705	1310	Acdp.alyti	Acidiphilium aminolytica str. 101.
0.698	1332	Acdp.faci2	Acidiphilium facilis.
0.690	1360	sym.Hthsvi	endosymbiont of Heliothis virescens testis
0.674	1374	str.Hyp353	str. US-353.
0.659	1371	Aba.diaztr	Acetobacter diazotrophicus.
0.651	1392	Aba.europa	Acetobacter europaeus str. isolate DES11.
0.636	1385	Aba.paster	Acetobacter pasteurianus str. isolate LMD 22.1.
0.628	1384	Aba.methan	Acetobacter methanolicus.
0.620	1322	Aba.aceti	Acetobacter aceti.
0.620	867	Acdp.spQBP	Acidiphilium sp. str. QBP.

Analysis Results

Chimera Check

CHECK_CHIMERA version 2.5
Niels Larsen, niels@darwin.life.uiuc.edu
Date : Fri Apr 18 18:38:57 1997
Short-ID : **Sed 1**
RDP data : SSU_Prok
Comments : A minimum of 50 unique oligos required
: A total of 0 sequences were excluded
: 2849 sequences were included in the search
: The screening was based on 7-base oligomers
CPU time : 0.39 seconds

=

FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 117:
116 Sed 1 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
1.000	1254	Thb.ferr12	Thiobacillus ferrooxidans str. isolate N-Fe3.
0.905	1254	Thb.ferro9	Thiobacillus ferrooxidans str. isolate N-Fe4.
0.845	1031	Thb.ferro3	Thiobacillus ferrooxidans.
0.784	774	Thb.ferro4	Thiobacillus ferrooxidans.
0.767	1359	Thb.caldus	Thiobacillus caldus.
0.759	898	Thb.ferro2	Thiobacillus ferrooxidans.
0.716	873	Thb.ferro5	Thiobacillus ferrooxidans str. F221.
0.707	1255	Thb.thioo4	Thiobacillus thiooxidans str. isolate B-53.
0.698	1253	Thb.ferr10	Thiobacillus ferrooxidans str. isolate N-Fe2.
0.655	812	Thb.ferro6	Thiobacillus ferrooxidans str. LM2.
0.560	1186	Thb.thioo2	Thiobacillus thiooxidans.
0.500	819	Thb.ferro7	Thiobacillus ferrooxidans.
0.500	1373	Pas.BTax06	Pasteurella sp. str. Bisgaard Taxon 6.
0.474	1380	H.aegyptiu	Haemophilus aegyptius.
0.474	1373	H.actin523	Haemophilus actinomycetemcomitans.
0.474	1381	H.actin522	Haemophilus actinomycetemcomitans.
0.474	1384	H.actinoY4	Haemophilus actinomycetemcomitans str. FDC Y4.
0.474	1390	Pas.mair89	Pasteurella mairi.
0.474	1352	H.haemolyt	Haemophilus haemolyticus.
0.474	1386	H.actin524	Haemophilus actinomycetemcomitans.

ANNEXE C: INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES AU CHAPITRE IV

C.1 Espèces utilisées lors des analyses phylogénétiques

Comme mentionné à la section 4.2, plusieurs espèces bactériennes ont été inclues dans les analyses phylogénétiques préliminaires. Ces espèces ont été choisies en fonction des critères mentionnés au Tableau 4.1. Celles-ci ont servi à la réalisation de matrices de distances et d'arbres phylogénétiques. Cependant, plusieurs de ces espèces ont été enlevées lorsqu'elles n'aportaient pas d'informations supplémentaires quant à la topologie est arbres et quant à l'identification des séquences inconnues. Afin de présenter toutes les espèces bactériennes analysées lors de l'étude phylogénétique, celles-ci sont présentées dans les tableaux suivants. Les numéros d'accession de GenBank sont aussi indiqués.

Tableau C.1 Liste des espèces Gram positives ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques.

Espèce	No. GenBank	Espèce	No. GenBank
Actinokineospora riparia	x76953	*Micrococcus lylae*	x80750
Actinomadura glomerata	d50660	*Micromonospora yugolensis*	x92626
Amycolatopsis orientalis	x81573	*Mycobacterium chlorophenolicum*	x81926
Arthrobacter aurescens	x83405	*Mycobacterium komossense*	x55591
Atopobium rimae	x67149	*Nocardia calcarea*	x80618
Bacillus megaterium	d16273	*Peptococcus niger*	x55797
Bacillus pabuli	x60630	*Peptostreptococcus prevotii*	d14153
Brachybacterium alimentarium	x91031	*Rhodococcus erythreus*	x79289
Cellulomonas gelida	x83800	*Rhodococcus marionascens*	x91933
Clostridium bifermentans	x73437	*Rhodococcus rhodnii*	x80622
Clostridium ghoni	x73451	*Rhodococcus rhodochrous*	x79288
Clostridium intestinalis	x76740	*Saccharothrix longispora*	x76964
Clostridium irregularis	x73447	*Saccharothrix mutabilis*	x76966
Clostridium quinii	x76745	*Souche TH3*	m79434
Corynebacterium bovis	d38575	*Streptomyces macrosporus*	x68099
Frankia sp.	l18982	*Sulfobacillus disulfidooxidans*	u34974
Lentzea albidocapillata	x84321	*Terrebacter tumescens*	x53215
Microthrix parvicella	x89561	*Tsukamurella paurometabolum*	z36933

Tableau C.2 Liste des Protéobactéries de la subdivision α ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques.

Espèce	No. GenBank	Espèce	No. GenBank
Acetobacter acetii	d30768	*Glucobacter oxydans*	x73820
Acidiphilium aminolytica	d30771	*Mycoplana ramosa*	d13944
Acidiphilium angustum	d30772	*Nitrobacter winogradskyi*	l35507
Acidiphilium cryptum	d30773	*Ochrobactrum anthropi*	d12794
Acidiphilium facilis	d30774	*Pseudomonas riboflavina*	d49423
Acidiphilium organovorum	d30775	*Rhodopseudomonas viridis*	d25314
Acidiphilium rubrum	d30776	*Rhodospirillum photometricum*	d30777
Acidomonas methanolica	d30770	*Thiobacillus acidophilus*	m79399
Agrobacterium tumefaciens	d14506	*Thiobacillus novellus*	d32247
Azorhizobium caulinodans	x67221	*Xanthobacter flavus*	x94205
Brucella suis	l26169		

Tableau C.3 Liste des Protéobactéries de la subdivision β ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques.

Espèce	No. GenBank	Espèce	No. GenBank
Azoarcus communis	x85433	*Polynucleobacter necessarius*	x93019
Azoarcus sp.	x85434	*Rhodocyclus tenuis*	d16209
Bordetella avium	u04947	*Rubrivivax gelatinosus*	d16213
Burkholderia solanacearum	x67041	*Sphaerotilus natans*	z18534
Gallionella ferruginea	l07897	*Thiobacillus ferrooxidans* N-Fe3	x75268
Ideonella dechloratans	x72724	*Thiobacillus thiooxidans*	u27839
Leptothrix discophora	z18533	*Thiobacillus thermosulfatus*	x75269
Leptothrix mobilis	x97071	*Telluria chitinolytica*	x65590
Magnetobacterium bavaricum	x71838	*Zoogloea ramigera*	x74913
Neisseria weaveri	l10738	*Zoogloea sp.*	d84582
Nitrosomonas eutropha	m96402		

Tableau C.4 Liste des Protéobactéries de la subdivision γ ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques.

Espèce	No. GenBank	Espèce	No. GenBank
Aeromonas hydrophila	x74676	*Proteus vulgaris*	x07652
Escherichia coli	x80731	*Pseudomonas aeruginosa*	x06684
Klebsiella pneumoniae	x87276	*Salmonella choleraesuis*	x80682
Legionella sp.	x97363	*Shigella sonnei*	x96964
Leucothrix mucor	x87277		

Tableau C.5 Liste des Protéobactéries la subdivision δ ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques.

Espèce	No. GenBank	Espèce	No. GenBank
Chondromyces apiculatus	m94274	*Geobacter sulfurreducens*	u13928
Desulfovibrio desulfuricans	m34113	*Lawsonia intracellularis*	u30147
Desulfovibrio longreachii	z24450	*Nitrospina gracilis*	x80682
Desulfovibrio sp.	x93147	*Nitrospira marina*	x82559
Desulfovibrio termitidis	x87409	*Polyangium cellulosum*	m94282
Desulfuromonas acetesigens	u23140	*Polyangium sp.*	m94280
Geobacter hydrogenophilus	u28173		

Tableau C.6 Liste des espèces du groupe *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques.

Espèce	No. GenBank	Espèce	No. GenBank
Bacteroides forsythus	x73962	*Flavobacterium thalpophilum*	x67851
Bacteroides fragilis	m11656	*Flavobacterium heparinum*	m11657
Candidatus comitans	x91814	*Flexibacter sp.*	d84586
Capnocytophaga granulosa	u41348	*Porphyromonas gingivalis*	l16492
Capnocytophaga ochrracea	u41353	*Prevotella oralis*	l16480
Capnocytophaga sputigena	x67609	*Sphingobacterium mizutae*	x67853

Tableau C.7 Liste des autres espèces ayant été utilisées lors des analyses phylogénétiques.

Espèce	No. GenBank	Espèce	No. GenBank
Chloroflexus aurantiacus	d38365	*Spirochaeta sp.*	u40791
Deinococcus radiodurans	m21413	*Spirulina sp.*	x75045
Leptospirillum ferrooxidans	x86776	*Thermus aquaticus*	l09663
Pirellula sp.	x81938	*Thermotoga subterranea*	u22664
Planctomyces limnophilus	x62911	*Treponema denticola*	d85438
Planctomyces sp.	x81951		

C.2 Présentation des alignements

Les 2 prochaines figures montrent les alignements des séquences réalisés pour le calcul des distances. Les alignements ont été réalisés avec le programme PILEUP (GCG) et ont été revisés visuellement. Les séquences correspondent à la région amplifiée par PCR, sans les amorces.

```
Bio 2-4              TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGA
Bio 1-6              ?GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGA
C. bifermentans      TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGA
Bio 2-3              TGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGA
C. quinii            TGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGA
P. prevotii          TGGGGAATATTGCACAATGGAGGAAACTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
Bio 2-1              TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAG-CTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
Bio 1-5              TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAG-CTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
Bio 2-10             TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
M chlorophenolicum   TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
M komossense         TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT?ATGCAGCGACGCCGCGTGA
R. rhodnii           TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
T. paurometabolum    TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
Bio 2-7              TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGG
R. marionascens      TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
T. tumescens         TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCT?ATGCAGCGACGCCGCGTGA
Bio 1-11              nnGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAn-TGACGCAGCAACGCCGCGTGC
M. parvicella        TAGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAATGCCGCGTGC
E. coli              TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT

Bio 2-4              GCGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTCCTCAAGGAAGA-----T
Bio 1-6              GCGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTCCTCAAGGAAGA-----T
C. bifermentans      GCGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTCCTCAAGGAAGA-----T
Bio 2-3              GTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTCTTCAGGGACGA-----T
C. quinii            GTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTCTTCAGGGACGA-----T
P. prevotii          GCGATGAAGGCCTTCGAGTCGTAAAGCTCTGTCCTATGGGAAGA-----T
Bio 2-1              GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAA
Bio 1-5              GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAA
Bio 2-10             GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCCAGGGACGAAGCGCA
M chlorophenolicum   GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCCAGGGACGAAGCGCA
M komossense         GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGCA
R. rhodnii           GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGGTAGGGACGAAGCGCA
T. paurometabolum    GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGCA
Bio 2-7              GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGTA
R. marionascens      GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTG
T. tumescens         GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAA
Bio 1-11             GG-ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGACGAA-----
M. parvicella        GGGACGAAGGCCCTAGGGTCGTAAACCGCTTTCAGTAGGGACGAA-----
E. coli              ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAG
```

```
Bio 2-4              A-------------------ATGACGGTACTTGAGGAGGAAGCCCCGGC
Bio 1-6              A-------------------ATGACGGTACTTGAGGAGGAAGCCCCGGC
C. bifermentans      A-------------------ATGACGGTACTTGAGGAGGAAGCCCCGGC
Bio 2-3              A-------------------ATGACGGTACCTGAGGAGGAAGCCACGGC
C. quinii            A-------------------ATGACGGTACCTGAGGAGGAAGCCACGGC
P. prevotii          A-------------------ATGACGGTACCATAGGAGGAAGCCCCGGC
Bio 2-1              A-------------------GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGC
Bio 1-5              A-------------------GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGC
Bio 2-10             A-------------------GTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGC
M chlorophenolicum   A-------------------GTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGC
M komossense         A-------------------GTGACGGTACCTATAGAAGAAGCACCGGC
R. rhodnii           A-------------------GTGACGGTACCTATAGAAGAAGCACCGGC
T. paurometabolum    A-------------------GTGACGGTACCTACAGAAGAAGCACCGGC
Bio 2-7              A-------------------GTGACGGTACCTATAGAAGAAGCACCGGC
R. marionascens      A-------------------GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGC
T. tumescens         A-------------------GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGC
Bio 1-11             A-------------------ATGACGGTACCTGCAGAAGAAGCCCCGGC
M. parvicella        A-------------------ATGACGGTACCTGCAGAAGAAGCTCCGGC
E. coli              TAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGC

Bio 2-4              TAACTACGTG
Bio 1-6              TAACTACGTG
C. bifermentans      TAACTACGTG
Bio 2-3              TAACTACGTG
C. quinii            TAACTACGTG
P. prevotii          TAACTACGTG
Bio 2-1              TAACTACGTG
Bio 1-5              TAACTACGTG
Bio 2-10             CAACTACGTG
M chlorophenolicum   CAACTACGTG
M komossense         CAACTACGTG
R. rhodnii           CAACTACGTG
T. paurometabolum    CAACTACGTG
Bio 2-7              CAACTACGTG
R. marionascens      TAACTACGTG
T. tumescens         TAACTACGTG
Bio 1-11             TAACTACGTG
M. parvicella        CAACTACGAG
E. coli              TAACTCCGTG
```

Figure C.1 Alignement des séquences partielles de l'ADNr 16S provenant des bactéries Gram positives ayant servi aux calculs des distances et à la reconstruction d'arbres.

```
Bio 2-6                 TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGTAAGCCTGAACCAGCCATCCCGCGTGC
B. forsythus            TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCGTGA
F. heparinum            TAAGGAATATTGGTCAATGGAGGGAACTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGC
S. mizutae              TAAGGAATATTGGTCAATGGGGGCAACCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGC
Bio 2-9                 TAAGGAATATTGGACAATGGCCGCAAGGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGC
Flexibacter sp.         TGAGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGC
C. ochracea             TGAGGAATATTGGACAATGGTCGGAAGACTGATCCAGCCATGCCGCGTGC
Pirellula sp.           TCGAGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCGATGCCGCGTGC
P. limnophilus          TCGAGAATCTTCGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCGAGCGATGCCGCGTGC
Bio T.-f.               nnnnnAATTTTTCGCAATGGGGGCAACCCTGACGAAGCAATGCCGCGTGG
Sed 1                   nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnCAATGCCGCGTGG
T. ferrooxidans N-Fe3   TGGGGAATTTTTCGCAATGGGGGCAACCCTGACGAAGCAATGCCGCGTGG
T. thiooxidans          TGGGGAATTTTTCGCAATGGGGGCAACCCTGACGAAGCAATGCCGCGTGG
Bio 1-1                 TAAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGG
N. marina               TGAGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGG
N. gracilis             TGGGGAATTTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGA
Bio 2-11                TGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGA
A. angustum             TGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGG
T. acidophilus          TGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGG
Sed 2                   TGGGGAATTTTTCGCAATGGGGGCAACCCTGACGAAGCAATGCCGCGTGG
A. tumefaciens          TGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGA
R. viridis              TGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGA
T. novellus             TGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGA
Bio 1-7                 TGGGGAATCTTGGACAATGGGCGCAA--CTGATCCAGCCATGCCGCGTGA
E. coli                 TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
E. coli JM109           TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
P. aeruginosa           TGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT
Bio 1-8                 nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnCCGCGTGC
S. natans               TGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT-ACGCGTGC
G. ferruginea           TGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGA
Z. ramigera             TGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGA
Bio 1-10                TGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATTCCGCGTGA
Bio 1-3                 TGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGA
Azoarcus sp.            TGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGA
L. mobilis              TGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGC
T. thermosulfatus       TGGGGAATCTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGT
T. subterannea          TGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCGACGCCGCGTGA
Bio 1-9                 TTTCGAATCATTCACAATGGGCGAAAG-CTGATGGTGCGACGCCGCGTGA

Bio 2-6                 AGGAAGAAGGCGCTATGCGTCGTAAACTGCTTTTCCAGGGGAAGAAAATC
B. forsythus            AGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTACAGGGGAATAAAATG
F. heparinum            AGGAAGACAGCCCTCTGGGTCGTAAACTGCTTTTATTCGGGAATAAACCT
S. mizutae              AGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTGTTAGGGAATAAACCC
Bio 2-9                 AGGATGAAGGTGCTCTGCATTGTAAACTGCTTTTGTTCGGGAATAAACCC
Flexibacter sp.         AGGATGACGGTCCTATGGATTGTAAACTGCTTTTGTACGAGAAGAAACAC
C. ochracea             AGGATGAAGGTCTTATGGATTGTAAACTGCTTTTGTAAGGGAAGAATAAG
Pirellula sp.           GGGATGAAGGCCCTC-GGGTTGTAAACCGCTGTCAGTTGTTAGGAAATGC
P. limnophilus          GGGATGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAACCGCTGTCGGAGGGGATGAAGTGT
Bio T.-f.               ATGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGTCCTTTCGTGGAGGACGAAAAGG
Sed 1                   ATGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGTCCTTTCGTGGAGGACGAAAAGG
T. ferrooxidans N-Fe3   ATGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGTCCTTTCGTGGAGGACGAAAAGG
T. thiooxidans          ATGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGTCCTTTCGTGGGGGACGAAAAGG
Bio 1-1                 GGGATGAAGGTCTTC-GGATTGTAAACCCCTTTCGGGAGGGAAGATGGAA
N. marina               GGGATGAAGGTTTTC-GGATTGTAAACCCCTTTCATGAGGAAAGATAAAG
N. gracilis             GCGATGAAGGnCTTC-GGGTCGTAAAGCTCTGTCGGGTGGGAAGAACAnA
Bio 2-11                GTGATGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGCTCTGTGGGGAGAGAAGAA--TA
A. angustum             GTGAAGAAGGTTTTC-GGATTGTAAAGCCCTTTTGGCGGGGACGA-----
T. acidophilus          GTGAAGAAGGTTTTC-GGATTGTAAAGCCCTTTTGGCGGGGACGA-----
Sed 2                   ATGAAGAAGGTCTTC-GGATTGTAAAGTCCTTTTGGCGGGGACGA-----
A. tumefaciens          GTGATGAAGGCCTTA-GGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGA-----
R. viridis              GTGATGAAGGCCTTA-GGGTTGTAAAGCTCTTTCGACGGGGAAGA-----
T. novellus             GTGATGAAGGCCTTA-GGGTTGTAAAGCTCTTTCTCCGACGAAGA-----
Bio 1-7                 GTGAAGAAGGCCTTA-GGGTTGTAAAACTCTTTCGCCGGtGAAGA-----
E. coli                 ATGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGA
E. coli JM109           ATGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGA
P. aeruginosa           GTGAAGAAGGTCTTC-GGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGC
Bio 1-8                 G-GAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAACCGCTTTTGTCAGGGAAGAAGCGG
S. natans               G-GGAAGAAGGCTTC-GGGTTGTAAACCGCTTTTGTCAGGGAAGAAATAC
```

```
G. ferruginea              GTGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCCGGAAAGAAATTG
Z. ramigera                GTGAACAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGCTCTTTCAGGTGGAAAGAAATCG
Bio 1-10                   GTGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCAGGGAAGAAACAG
Bio 1-3                    GTGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCCGGGAAGAAATCG
Azoarcus sp.               GTGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAAGCTCTTTCGGACGGAAAGAAATCG
L. mobilis                 GGGAAGAAGGCCTTC-GGGTTGTAAACCGCTTTTGTCAGGGAAGAAATCT
T. thermosulfatus          GGGATGAAGGCCCTC-GGGTTGTAAACCACTTTnGGCGGGGACGAAATAA
T. subterannea             GGGACGAAGCCCTTC-GGGGTGTAAACCTCTGTTGTGAGGGACGAATAAG
Bio 1-9                    GGGACGAAGGCCTTC-GGGTCGTAAACCTCTGTCACCGGGGAAGAAACGC

Bio 2-6                    TGATACGT-------GTATCGGCTTGCCGGTACCCTGGGAATAAGCATCG
B. forsythus               AGATACGT-------GTATTTTATTGCATGTACCTTGTGAATAAGCATCG
F. heparinum               ACTTACGT-------GTAAGTAGCTGAATGTACCGAAGGAATAAGGATCG
S. mizutae                 CGCTACGT-------GTAGCGGGCTGAATGTACCnnAAGAATAAGGATCG
Bio 2-9                    TTTCACGT-------GTGAGAGGTTGAATGTACCGAAAGAATAAGGGACG
Flexibacter sp.            TCCTTCGT-------GAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCG
C. ochracea                -nCTACGC-------GTnGTTTGATGACGGTACCTTAnGAATAAGCATCG
Pirellula sp.              ATGGTGGTTA----TCCATCATGTTTGACCGATCTTCAGAGGAAGGACGG
P. limnophilus             ATGGGAGCAA----TCTCCTGTATTTGACAGAGCCTCGGAGGAAGCACGG
Bio T.-f.                  TG-GGTTCTAATACAATCTGCTATTGACGTGAATCCAAGAAGAAGCACCG
Sed 1                      TG-GGTTCTAATACAATCTGCTATTGACGTGAATCCAAGAAGAAGCACCG
T. ferrooxidans N-Fe3      TG-GGTTCTAATACAATCTGCTATTGACGTGAATCCAAGAAGAAGCACCG
T. thiooxidans             CG-GATCCGAATACGGTCTGCTATTGACGTGAACCCAAGAAGAAGCACCG
Bio 1-1                    CG-----------AGCAATCGTTCGGACGGTACCTCCAGAAGCAGCCACG
N. marina                  TG-----------GGTAACCACTCAGACGGTACCTCAAGAAGAAGCCACG
N. gracilis                ----------------------ATGACGGTACCnCCAAAGGAAGCCCCG
Bio 2-11                   AGTCGTAGTGAATATCTACGATGATGACGGTATCTCCTTAGCAAGCACCG
A. angustum                ---------------------TGATGACGGTACCCGCAGAATAAGCTCCG
T. acidophilus             ---------------------TGATGACGGTACCCGCAGAATAAGCTCCG
Sed 2                      ---------------------TGATGACGGTACCCGCAGAATAAGCTCCG
A. tumefaciens             ---------------------TAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCG
R. viridis                 ---------------------TAATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCG
T. novellus                ---------------------TAATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCCG
Bio 1-7                    ---------------------TAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCG
E. coli                    GTAAA-GTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCG
E. coli JM109              GTAAA-GTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCG
P. aeruginosa              AGTAA-GTTAATACC-TTGCTGTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCG
Bio 1-8                    TCTGG-GTTAATGCCCTGGGCTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCG
S. natans                  TCCGG-GCTAATACCCTGGGGTGATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCG
G. ferruginea              CACTT-CTTAATACGAAGTGTAGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCG
Z. ramigera                CATCT-TTTAATACAGGGTGTGGATGACGGTACCATCAGAAGAAGCACCG
Bio 1-10                   TTGAG-GCTAATATCCTTGACCAATGACGGTACCTGAAGAAGAAGCACCG
Bio 1-3                    CATGG-GTTAATACCCTGTGTGGATGACGGTACCGGAATAAGAAGCACCG
Azoarcus sp.               TAnGG-GCTAATACCCTATCTGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGCACCG
L. mobilis                 TCTGG-GCTAATACCCTGGGAGGATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCG
T. thermosulfatus          CGAGT-GCGAATACCACTTGGTGATGACGGTACCCGCAGAATAAGCACCG
T. subterannea             ATCTG-GAGGAAATGCCAGATCGATGACGGTACCTCACGAGAAAGCCCCG
Bio 1-9                    TACGT--TTTAATAGAACGTAGCCTGACTTAACCCGGAGAGGAAGCAGTG

Bio 2-6                    GCTAACTCCGTG
B. forsythus               GCTAACTCCGTG
F. heparinum               GCTAACTCCGTG
S. mizutae                 GCTAACTCCGTG
Bio 2-9                    GCTAACTTCGTG
Flexibacter sp.            GCTAACTCCGTG
C. ochracea                GCTAACTCCGTG
Pirellula sp.              GCTAAGTACGTG
P. limnophilus             GCTAAGTTCGTG
Bio T.-f.                  GCTAACTCCGTG
Sed 1                      GCTAACTCCGTG
T. ferrooxidans N-Fe3      GCTAACTCCGTG
T. thiooxidans             GCTAACTCCGTG
Bio 1-1                    GCCAACTTCGTG
N. marina                  GCTAACTTCGTG
N. gracilis                GCTAACTCCGTG
Bio 2-11                   GCTAACTCTGTG
A. angustum                GCTAACTTCGTG
T. acidophilus             GCTAACTTCGTG
Sed 2                      GCTAACTTCGTG
A. tumefaciens             GCTAACTTCGTG
```

```
R. viridis              GCTAACTTCGTG
T. novellus             GCTAACTTCGTG
Bio 1-7                 GCTAACTTCGTG
E. coli                 GCTAACTCCGTG
E. coli JM109           GCTAACTCCGTG
P. aeruginosa           GCTAACTTCGTG
Bio 1-8                 GCTAACTACGTG
S. natans               GCTAACTACGTG
G. ferruginea           GCTAACTACGTG
Z. ramigera             GCTAACTACGTG
Bio 1-10                GCTAACTnnGTG
Bio 1-3                 GCTAACTACGTG
Azoarcus sp.            GCTAACTACGTG
L. mobilis              GCTAACTACGTG
T. thermosulfatus       GCTAACTACGTG
T. subterranea          GCTAACTACGTG
Bio 1-9                 GCTAACTCTGTG
```

Figure C.2 Alignement des séquences partielles de l'ADNr 16S provenant des autres espèces ayant servi aux calculs des distances et à la reconstruction d'arbres.

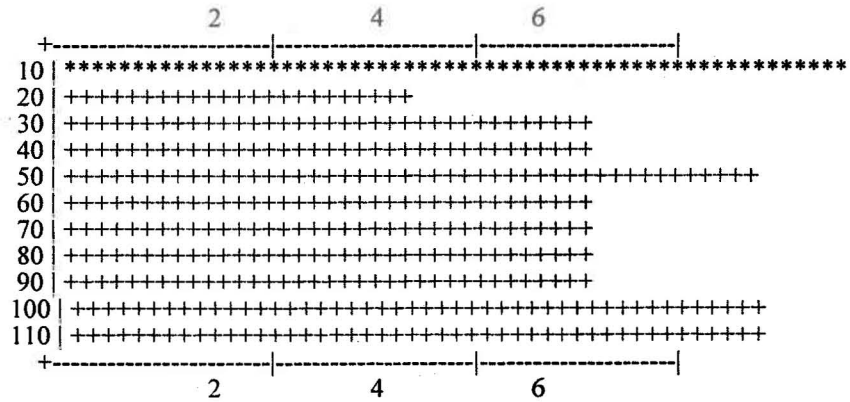
C.3 Détection des molécules chimériques

La détection de molécules chimériques a été réalisée avec le programme "Chimera Check" du Ribosomal database Project (Maidak et al. 1994). Les résultats obtenus pour Bio 1-2, Bio 1-4, Bio 2-2 et Bio 2-5 sont présentés ci-bas. La méthode consiste à fragmenter les molécules et à comparer les fragments avec des espèces connues. On reconnaît les molécules chimériques lorsque les fragments sont plus fortement reliés à des espèces connues que ne l'est la séquence entière. Les molécules chimériques comportent donc clairement deux régions distinctes, qui sont représentées par les histogrammes horizontaux.

Analysis Results

Chimera Check

CHECK_CHIMERA version 2.5
Niels Larsen, niels@darwin.life.uiuc.edu
Date : Fri Apr 18 18:36:27 1997
Short-ID : **Bio 1-2**
RDP data : SSU_Prok
Comments : A minimum of 50 unique oligos required
: A total of 0 sequences were excluded
: 2849 sequences were included in the search
: The screening was based on 7-base oligomers
CPU time : 0.62 seconds



FRAGMENT 1, approximate sequence positions 1 to 10:
10 Bio 1-2 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
1.000	1430	C.innocuum	Clostridium innocuum str. B-3.
1.000	1396	Eub.tortuo	Eubacterium tortuosum.
1.000	1401	Eub.dolich	Eubacterium dolichum.
1.000	1388	Eub.cylin1	Eubacterium cylindroides.

1.000 1377 Stc.pleomo Streptococcus pleomorphus str. EFB 61/60B.
1.000 1387 Eub.cylin2 Eubacterium cylindroides.
1.000 1394 Eub.biform Eubacterium biforme.
0.700 1377 L.catenafo "Lactobacillus" catenaformis str. 1871.
0.600 1421 C.ramosum Clostridium ramosum str. 113-I.
0.600 1430 C.spirofor Clostridium spiroforme.

FRAGMENT 2, approximate sequence positions 11 to 128:
116 Bio 1-2 Unknown

S_ab Olis Short-ID Full name

0.612 1305 Cfx.aurant Chloroflexus aurantiacus str. J-10-fl.
0.586 1019 env.OS_C2 Octopus Spring microbial mat DNA Type C
0.586 1008 env.OS-4 str. OSVI-L-4.
0.569 1322 Her.aurant Herpetosiphon aurantiacus.
0.552 1050 Spb.thermo Sphaerobacter thermophilus str. 6022.
0.500 1399 Alb.acite2 Alicyclobacillus acidoterrestris.
0.466 1397 Alb.acical Alicyclobacillus acidocaldarius str. 104-1A.
0.466 1377 Hlb.felDS3 Helicobacter felis str. DS3.
0.466 1412 Rht.marinu Rhodothermus marinus.
0.457 1354 Alb.acica3 Alicyclobacillus acidocaldarius str. TDBrock 115-8.

FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 128:
126 Bio 1-2 Unknown

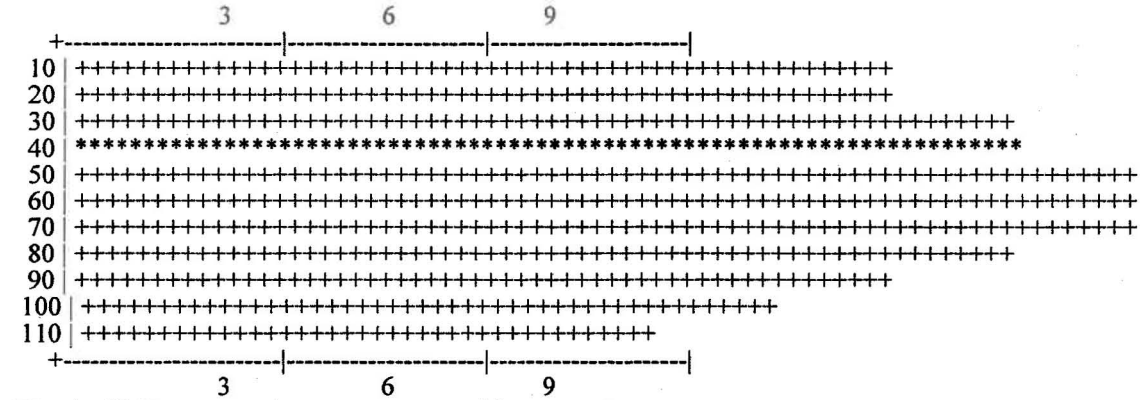
S_ab Olis Short-ID Full name

0.603 1305 Cfx.aurant Chloroflexus aurantiacus str. J-10-fl.
0.587 1019 env.OS_C2 Octopus Spring microbial mat DNA Type C
0.587 1008 env.OS-4 str. OSVI-L-4.
0.571 1322 Her.aurant Herpetosiphon aurantiacus.
0.548 1050 Spb.thermo Sphaerobacter thermophilus str. 6022.
0.476 1399 Alb.acite2 Alicyclobacillus acidoterrestris.
0.444 1301 env.OPI-2 str. OPI-2.
0.444 1397 Alb.acical Alicyclobacillus acidocaldarius str. 104-1A.
0.444 1396 Hdg.thphil Hydrogenobacter thermophilus.
0.444 1412 Rht.marinu Rhodothermus marinus.
0.444 1434 Mgb.bavarc Magnetobacterium bavaricum.
0.437 1354 Alb.acica3 Alicyclobacillus acidocaldarius str. TDBrock 115-8.
0.437 1377 Hlb.felDS3 Helicobacter felis str. DS3.
0.437 1435 Stm.rimosu Streptomyces rimosus.
0.429 1401 Ers.rhusio Erysipelothrix rhusiopathiae str. alpha-P15.
0.429 1353 Azs.iraken Azospirillum irakense str. KBC1.
0.429 1244 Ccr.aggreg Chlorocrinis aggregans str. MD-66.
0.429 1376 F.marinoty "Flavobacterium" marinotypicum.
0.429 1352 Gas.homin2 Gastrospirillum hominis str. isolate 2.
0.421 1450 Clv.xyli Clavibacter xyli subsp. cynodontis str. Cxc.

Analysis Results

Chimera Check

CHECK_CHIMERA version 2.5
Niels Larsen, niels@darwin.life.uiuc.edu
Date : Fri Apr 18 18:12:48 1997
Short-ID : **Bio 1-4**
RDP data : SSU_Prok
Comments : A minimum of 50 unique oligos required
: A total of 0 sequences were excluded
: 2849 sequences were included in the search
: The screening was based on 7-base oligomers
CPU time : 0.39 seconds



FRAGMENT 1, approximate sequence positions 1 to 40:
40 Bio 1-4 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.850	1330	B.pabuli	Bacillus pabuli.
0.800	1421	Hel.chlorm	Heliobacterium chlorum.
0.775	1398	Cusc.ref_C	Cuscuta reflexa -- chloroplast.
0.775	1388	Epif.vir_C	Epifagus virginiana -- chloroplast.
0.775	1401	Nico.plm_C	Nicotiana plumbaginifolia -- chloroplast str. wild
0.775	1428	Aer.virida	Aerococcus viridans.
0.775	1475	Clrl.ell_C	Chlorella ellipsoidea -- chloroplast str. IAM-C87.
0.775	1400	Nico.tab_C	Nicotiana tabacum -- chloroplast.
0.725	1373	Htt.orenii	Halothermothrix orenii str. H168 (T).
0.725	1341	Dfm.nigrif	Desulfotomaculum nigrificans.

FRAGMENT 2, approximate sequence positions 41 to 128:
88 Bio 1-4 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.295	1402	Chl.limico	Chlorobium limicola str. 8327.
0.284	1371	Hdg.thphi2	Hydrogenobacter thermophilus.
0.273	1397	Pisu.sa3_C	Pisum sativum -- chloroplast str. cr. Progress No.9
0.273	1440	Peb.aceten	Pelobacter acetylenicus str. WoACY1.
0.273	1384	Cy.latercu	Cytophaga latercula str. Lewin SIO-1.
0.273	1416	Pisu.sa2_C	Pisum sativum -- chloroplast.
0.261	1394	F.breve	Flavobacterium breve.
0.261	1374	Flx.tractu	Flexibacter tractuosus str. Lewis BA-3.
0.250	1383	Cld.hgenph	Calderobacterium hydrogenophilum.
0.250	1421	Dss.variab	Desulfosarcina variabilis str. 3 be 13, Montpellier

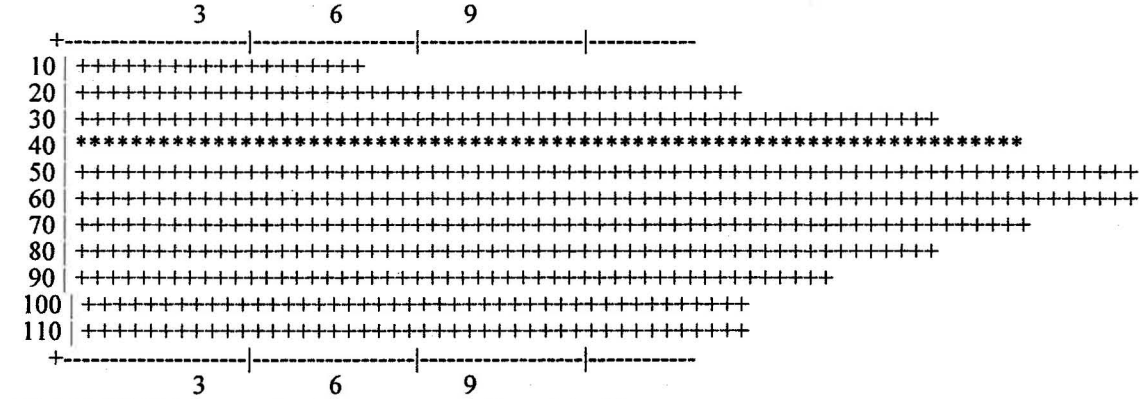
FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 128:
128 Bio 1-4 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.398	1416	Pisu.sa2_C	Pisum sativum -- chloroplast.
0.398	1397	Pisu.sa3_C	Pisum sativum -- chloroplast str. cr. Progress No.9
0.398	1388	Epif.vir_C	Epifagus virginiana -- chloroplast.
0.398	1401	Nico.plm_C	Nicotiana plumbaginifolia -- chloroplast str. wild
0.398	1400	Nico.tab_C	Nicotiana tabacum -- chloroplast.
0.398	1398	Cusc.ref_C	Cuscuta reflexa -- chloroplast.
0.391	1422	Clrl.kes_C	Chlorella kessleri -- chloroplast str. 211-11g (T).
0.383	1403	Oryz.sat_C	Oryza sativa -- chloroplast str. cv. Nipponbare.
0.383	1391	Cono.ame_C	Conopholis americana -- chloroplast.
0.383	1397	Zea_mays_C	Zea mays -- chloroplast.
0.375	1330	B.pabuli	Bacillus pabuli.
0.375	1475	Clrl.ell_C	Chlorella ellipsoidea -- chloroplast str. IAM-C87.
0.367	1402	Nico.pl2_C	Nicotiana plumbaginifolia -- chloroplast str.
0.367	1394	Bras.nap_C	Brassica napus -- chloroplast.
0.359	1378	Glyc.ma2_C	Glycine max -- chloroplast str. Maple arrow.
0.359	1378	Glyc.max_C	Glycine max -- chloroplast.
0.359	1394	Alnu.inc_C	Alnus incana -- chloroplast.
0.352	1397	Dauc.car_C	Daucus carota -- chloroplast.
0.352	1466	Clrl.pro_C	Chlorella protothecoides -- chloroplast str. 211-7a
0.352	1400	Marc.pol_C	Marchantia polymorpha -- chloroplast.

Analysis Results

Chimera Check

CHECK_CHIMERA version 2.5
Niels Larsen, niels@darwin.life.uiuc.edu
Date : Fri Apr 18 18:22:50 1997
Short-ID : **Bio 2-2**
RDP data : SSU_Prok
Comments : A minimum of 50 unique oligos required
: A total of 0 sequences were excluded
: 2849 sequences were included in the search
: The screening was based on 7-base oligomers
CPU time : 0.38 seconds



FRAGMENT 1, approximate sequence positions 1 to 40:
40 Bio 2-2 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.950	1398	B.thdenitr	Bacillus thermodenitrificans.
0.950	1434	Sac.thmoph	Saccharococcus thermophilus.
0.950	1449	Spi.haloph	Spirochaeta halophila str. RS1.
0.950	1404	B.denitrif	Bacillus denitrificans.
0.950	1451	Spi.spAntc	Spirochaeta sp. str. Antarctic.
0.950	1351	str.PL12MY	str. PL12MY.
0.950	1276	B.thglucos	Bacillus thermoglucosidasius str. KP 1006.
0.875	1424	Trp.dentic	Treponema denticola str. W.
0.825	1413	Spi.stenos	Spirochaeta stenostrepta str. Z1.
0.825	1434	Trp.bryant	Treponema bryantii str. RUS-1.

FRAGMENT 2, approximate sequence positions 41 to 127:
87 Bio 2-2 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.368	1401	Pln.staley	Planctomyces staleyi.
0.333	1397	Pln.limnop	Planctomyces limnophilus.
0.322	1374	Gar.vagina	Gardnerella vaginalis.
0.322	1243	Prp.acidi1	Propionibacterium acidipropionici.
0.322	1250	Act.israel	Actinomyces israelii.
0.310	1322	str.EM_19	str. EM 19.
0.310	1321	Atp.parvu2	Atopobium parvulum str. 1246.
0.299	1085	Pln.maris	Planctomyces maris.
0.287	1411	Prp.acnes	Propionibacterium acnes.
0.287	1290	Pir.marin2	Pirellula marina.

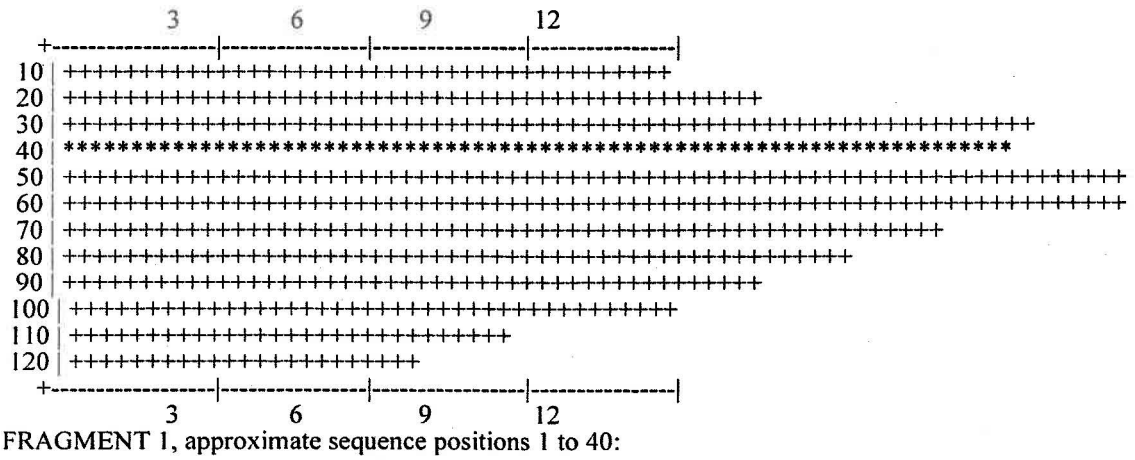
FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 127:
127 Bio 2-2 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.417	1370	Tmc.roseum	Thermomicrobium roseum.
0.409	1276	B.thglucos	Bacillus thermoglucosidasius str. KP 1006.
0.402	1451	Spi.spAntc	Spirochaeta sp. str. Antarctic.
0.394	1404	B.denitrif	Bacillus denitrificans.
0.386	1411	B.pallidus	Bacillus pallidus.
0.386	970	env.MC100	str. MC 100.
0.386	1434	Sac.thmoph	Saccharococcus thermophilus.
0.386	1415	B.sp13	Bacillus sp.
0.386	1398	B.thdenitr	Bacillus thermodenitrificans.
0.386	1403	B.thalkalp	Bacillus thermoalkalophilus.
0.386	1351	str.PL12MY	str. PL12MY.
0.386	1449	Spi.haloph	Spirochaeta halophila str. RS1.
0.386	1452	Pha.faeci4	Phascolarctobacterium faecium.
0.378	1360	B.acvorans	Bacillus acidovorans.
0.378	1384	Pha.faeci3	Phascolarctobacterium faecium.
0.378	1417	Pha.faeci2	Phascolarctobacterium faecium.
0.370	1340	B.mycoides	Bacillus mycoides.
0.370	1424	Trp.dentic	Treponema denticola str. W.
0.370	1409	Trp.spH1	Treponema sp. str. H1 Leschine.
0.370	1412	Spi.zuelze	Spirochaeta zuelzerae.

Analysis Results

Chimera Check

CHECK_CHIMERA version 2.5
Niels Larsen, niels@darwin.life.uiuc.edu
Date : Fri Apr 18 18:14:20 1997
Short-ID : **Bio 2-5**
RDP data : SSU_Prok
Comments : A minimum of 50 unique oligos required
: A total of 0 sequences were excluded
: 2849 sequences were included in the search
: The screening was based on 7-base oligomers
CPU time : 0.40 seconds



FRAGMENT 1, approximate sequence positions 1 to 40:

40 Bio 2-5 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.850	1330	B.pabuli	Bacillus pabuli.
0.825	1328	Pep.niger	Peptococcus niger.
0.750	1428	Aer.virida	Aerococcus viridans.
0.750	1421	Hel.chlorm	Heliobacterium chlorum.
0.725	1389	B.cyclohep	Bacillus cycloheptanicus.
0.725	1397	Alb.acical	Alicyclobacillus acidocaldarius str. 104-1A.
0.725	1354	Alb.acica3	Alicyclobacillus acidocaldarius str. TDBrock 115-8.
0.700	1341	T.spTok20	Thermus sp. str. Tok20 A.1.
0.700	1399	B.polymyx3	Bacillus polymyxa.
0.700	1304	B.azotofix	Bacillus azotofixans.

FRAGMENT 2, approximate sequence positions 41 to 129:
89 Bio 2-5 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.348	970	env.MC100	str. MC 100.
0.315	1085	Pln.maris	Planctomyces maris.
0.303	1397	Pln.limnop	Planctomyces limnophilus.
0.292	1445	sym.Sus_sc	str. isolate 1482/89.
0.281	1412	sym.Mescau	str. Auratus.
0.281	1019	env.OS_C2	Octopus Spring microbial mat DNA Type C
0.281	1008	env.OS-4	str. OSVI-L-4.
0.258	1370	Tmc.roseum	Thermomicrobium roseum.
0.258	1401	Pln.staley	Planctomyces staleyi.
0.247	1290	Pir.marin2	Pirellula marina.

FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 129:
129 Bio 2-5 Unknown

S_ab	Olis	Short-ID	Full name
0.364	1391	Cono.ame_C	Conopholis americana -- chloroplast.
0.357	1422	Clrl.kes_C	Chlorella kessleri -- chloroplast str. 211-11g (T).
0.357	1466	Clrl.pro_C	Chlorella protothecoides -- chloroplast str. 211-7a
0.349	1421	Hel.chlorm	Heliobacterium chlorum.
0.349	1409	Clrl.vul_C	Chlorella vulgaris -- chloroplast str. 211-11b.
0.349	1370	Tmc.roseum	Thermomicrobium roseum.
0.349	1105	env.OPI-8	str. OPI-8.
0.349	1398	Clrl.sor_C	Chlorella sorokiniana -- chloroplast str. 211-8k (T
0.341	1397	Zea_mays_C	Zea mays -- chloroplast.
0.341	1403	Oryz.sat_C	Oryza sativa -- chloroplast str. cv. Nipponbare.
0.341	1328	Pep.niger	Peptococcus niger.
0.333	1416	Pisu.sa2_C	Pisum sativum -- chloroplast.
0.333	1384	B.tusciae	Bacillus tusciae.
0.333	1330	B.pabuli	Bacillus pabuli.
0.326	1389	B.cyclohep	Bacillus cycloheptanicus.
0.318	1341	Dfm.nigrif	Desulfotomaculum nigrificans.
0.318	1388	Epif.vir_C	Epifagus virginiana -- chloroplast.
0.318	1426	Dfm.thacid	Desulfotomaculum thermoacidovorans str. MLF.
0.318	1399	B.polymyx3	Bacillus polymyxa.
0.318	1418	Sfb.tsoxid	Sulfobacillus thermosulfidooxidans str. VKM B1269.

C.4 Estimation statistique de la diversité totale

Selon la méthode de DGGE, une vingtaine de bandes a été observée lors de la phase logarithmique du procédé. Le même nombre de bandes a été observé lors de l'analyse d'un second échantillon provenant d'une deuxième culture à la même phase. La photo montrée à la Figure 4.2 indique que la méthode de DGGE a été limitante au niveau de son pouvoir de résolution. La diversité minimale serait d'environ 20 espèces.

Dans chacun des cas, 11 fragments ont été échantillonnés pour déterminer leur séquence. Comme dans les 2 cultures, 2 molécules chimériques ont été détectées, nous considérons avoir réalisé un échantillonnage réel de 9 bandes dans chacune des cultures. La détermination de la séquence de ces bandes a révélé que 3 séquences étaient communes à chaque culture. Le fait d'avoir obtenu 3 séquences identiques provenant de 2 échantillons indépendants de 9 bandes nous permet d'estimer, à l'aide d'une distribution de probabilités, le nombre total de bandes dans chacune des cultures.

Pour ce faire, nous avons considéré que la composition était identique pour les 2 cultures. Ensuite, nous avons appliqué la formule dérivée de la loi hypergéométrique, une variante de la loi binômiale, lorsque l'échantillonnage se fait sans remise (Scherrer 1984). La distribution des probabilités d'avoir un nombre N total de bandes est présentée à la Figure C3. Le graphique indique que probabilité maximale est 33,3%, pour un nombre total de bandes de 26 et de 27.

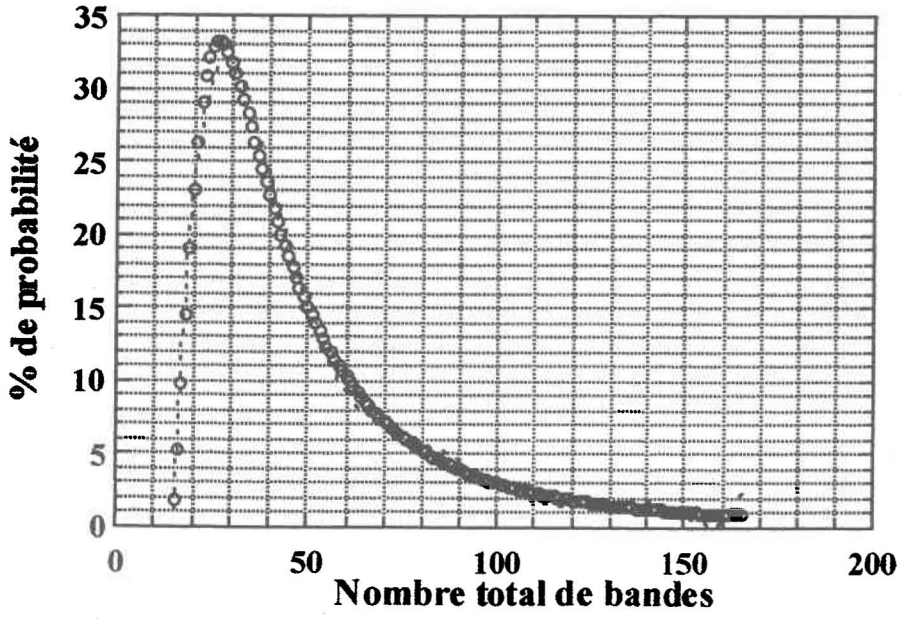


Figure C.3 Distribution de probabilités pour le nombre d'espèces totales dans le procédé de biolixiviation.