

Université du Québec
INRS - Institut Armand-Frappier

Caractérisation du dynamisme microbien du dénitrificateur marin du Biodôme de
Montréal

Par
Normand Labbé

Thèse
Présentée dans le but de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph. D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne :	Claude Guertin Ph.D. INRS-IAF
Examineur externe :	Lyle Whyte Ph.D. McGill University
Examinatrice externe :	Roxane Maranger Ph.D. Université de Montréal
Directeur de recherche :	Richard Villemur Ph.D. INRS-IAF
Codirecteur de recherche :	Serge Parent Ph.D. Biodôme de Montréal

©droits réservés de Normand Labbé, 2007

RÉSUMÉ

Dans les aquariums, le taux de nitrate augmente rapidement au-delà de 50 mg-N-NO₃/L. Le Saint-Laurent Marin du Biodôme de Montréal n'échappe pas à cette accumulation malgré un important système de traitement de l'eau. Afin de diminuer le taux de nitrate élevé, le Biodôme de Montréal a acquis un système de dénitrification en 1998 qui consiste principalement en un réacteur à lit fluidisé alimenté au méthanol. Or, depuis son installation, le système de dénitrification fonctionnait avec une efficacité bien en dessous des prévisions. Il a alors été suggéré que la microflore ne soit pas bien adaptée aux conditions du milieu.

La problématique de la dénitrification de l'eau de mer du Biodôme se situe au niveau de la salinité et de la température interne du dénitrificateur qui est de 15-20°C. De plus, le méthanol, utilisable par une faible variété de microorganismes, est utilisé comme source de carbone pour les microorganismes de ce système de dénitrification. L'ajout de métaux traces, tant dans des essais en laboratoire que dans le système de dénitrification, nous a permis d'augmenter le taux de dénitrification de l'ordre de 250%. Cette hausse d'activité des bactéries dénitrifiantes était principalement attribuable au fer.

Ce projet visait la caractérisation microbiologique du dénitrificateur marin du Biodôme de Montréal en vue d'une amélioration de l'efficacité du système de dénitrification. La caractérisation des microorganismes impliqués a été effectuée par une approche de microbiologie classique et par une approche de biologie moléculaire (génomique et électrophorèses sur gel de polyacrylamide en gradient dénaturant (DGGE)). De plus, le rôle et les interactions entre les différentes espèces microbiennes présentes dans le biofilm dénitrifiant ont été étudiés par la technique de l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) et de la microautoradiographie (MAR).

La microflore extraite des supports du réacteur a été cultivée sur trois milieux de culture différents. Trois types de bactéries ont été isolés en culture pure. Ces dernières appartiennent aux genres *Hyphomicrobium*, *Paracoccus* et à un nouveau genre bactérien de la famille des *Phyllobacteriaceae*. Suite à une analyse complète de ce nouvel

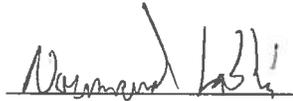
organisme, nous avons pu publier sa description et le nommer *Nitratireductor aquibiodomus*. Les bactéries non-cultivées ont été étudiées en constituant une génothèque des gènes de l'ARN 16S ribosomal (ADNr 16S). Le même profil de digestion, à l'aide d'enzymes de restriction, a été retrouvé chez plus de 70% des clones. Les séquences de quelques représentants du groupe le plus abondant ont révélé une affiliation avec le genre *Methylophaga* (*gamma*-protéobactéries). Le séquençage des clones des autres profils de restriction a révélé des affiliations avec des bactéries dénitrifiantes et des bactéries marines. Suite au remplacement des supports de fluidisation dans le dénitrificateur, la colonisation de ceux-ci a été suivie par PCR-DGGE. Les profils de migration sur DGGE ont évolué pendant les cinq premières semaines puis sont demeurés pratiquement inchangés par la suite.

L'étude de la structure du biofilm colonisant dans le dénitrificateur marin du Biodôme de Montréal a été réalisée. L'utilisation de l'hybridation *in situ* fluorescente a permis de localiser les microorganismes de genre *Methylophaga*, de genre *Hyphomicrobium*, de *gamma*-protéobactéries, d'*alpha*-protéobactéries et de protozoaires. Les résultats ont montré que les protozoaires recouvraient presque entièrement la surface du biofilm surtout lorsque le biofilm était jeune et mince. De plus, des micro-colonies d'*Hyphomicrobium* ont été observées dans le biofilm seulement après trois semaines de colonisation. Les *gamma*-protéobactéries constituaient la population la plus importante du complexe microbien du dénitrificateur. Cela corrobore les résultats antérieurs qui montraient les *Methylophaga* comme le groupe de bactéries dominantes. L'utilisation d'une sonde spécifique aux *Methylophaga* a indiqué également que ceux-ci étaient les plus abondants dans le dénitrificateur du Biodôme de Montréal. Ces essais ont aussi montré que les archaebactéries sont absentes du dénitrificateur. À sa maturité, le biofilm contenait environ 57% de *Methylophaga*, 7% d'*Hyphomicrobium* et 5% d'eucaryotes.

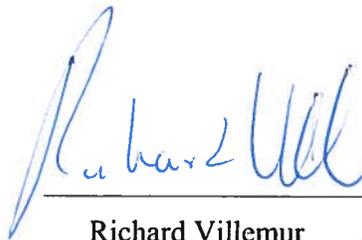
Des essais de microautoradiographie couplée à l'hybridation *in situ* fluorescente ont montré que c'était principalement les *alpha*-protéobactéries qui assimilaient le méthanol dans des conditions de dénitrification. Les *Methylophaga* n'ont pas assimilé de méthanol

en condition dénitrifiante malgré la forte proportion qu'elles occupaient au sein du biofilm du dénitrificateur.

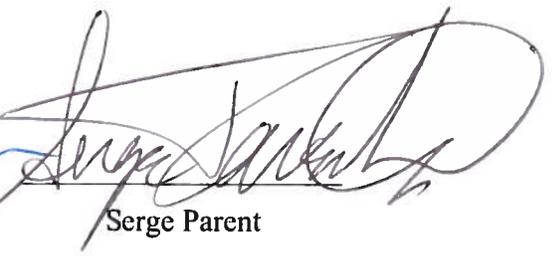
L'étude effectuée a permis de mieux connaître la dénitrification en eau de mer ainsi que les bactéries retrouvées dans un tel écosystème. Elle a aussi contribué à l'amélioration du taux de dénitrification du procédé de dénitrification installé au Biodôme de Montréal. Cette étude, complémentairement à une modification du design du dénitrificateur, devrait permettre un maintien de la concentration de nitrate dans le Saint-Laurent Marin sous la barre des 50 mg N-NO₃/L.



Normand Labbé



Richard Villemur



Serge Parent

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche, le docteur Richard Villemur et le docteur Serge Parent pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires, pour leur appui constant, leur grande disponibilité ainsi que leurs nombreux conseils.

Merci à Martin Lanthier pour sa précieuse aide dans la mise au point de l'hybridation *in situ* fluorescente et à Marcel Desrosiers pour son aide et ses judicieux conseils en microscopie confocale.

Je ne peux passer sous silence l'aide du personnel du Biodôme (Rachel Léger, Normand Desrochers, Jean Bouvrette, les opérateurs et les plombiers) pour leur appui au projet et pour avoir maintenu en vie le réacteur tout au long du projet malgré les nombreux bris.

Merci à Claire Vasseur, Léandre Côté, Sylvain Milot, Louis Racine, Rita Alary pour leurs conseils et leur aide.

J'aimerais remercier le groupe de recherche sur la dénitrification et groupe de recherche en microbiologie de l'environnement pour leur soutien et les agréables moments passés en leur compagnie. Merci spécialement à Véronique Laurin, Philippe Constant et Martin Lanthier.

Merci encore à Serge Parent pour son enthousiasme et sa bonne humeur.

Une reconnaissance spéciale est dédiée à Johanne Paradis pour son appui tout au long de mon projet et pour sa précieuse aide.

Finalement, j'aimerais remercier la Fondation Armand-Frappier, l'INRS-IAF, la ville de Montréal, le Biodôme de Montréal et le CRSNG pour leur appui financier à mon égard et au projet.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	II
REMERCIEMENTS	V
TABLE DES MATIERES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
1 INTRODUCTION	1
<i>1.1 Mise en contexte du Saint-Laurent marin.....</i>	<i>1</i>
1.1.1 Problématique du nitrate.....	2
1.1.2 Unité de dénitrification.....	3
1.1.3 Modification et amélioration de l'unité de dénitrification	4
1.2 <i>But à long terme</i>	<i>5</i>
1.3 <i>Hypothèses.....</i>	<i>5</i>
1.4 <i>Objectifs.....</i>	<i>6</i>
1.5 <i>Présentation du document</i>	<i>6</i>
2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	7
2.1 <i>Cycle de l'azote</i>	<i>7</i>
2.1.1 Nitrification	8
2.1.2 Réduction du nitrate	9
2.1.2.1 Réduction dissimilatrice du nitrate vers l'ammoniaque (DNRA).....	10
2.1.2.2 Oxydation anaérobie de l'ammoniaque (ANAMMOX).....	10
2.1.2.3 Dénitrification.....	11
2.2 <i>Toxicité du nitrate et du nitrite</i>	<i>12</i>
2.3 <i>Méthodes d'élimination du nitrate.....</i>	<i>14</i>
2.3.1 Élimination chimique du nitrate	14
2.3.2 Élimination physique du nitrate.....	14
2.3.3 Élimination biologique du nitrate	15
2.3.3.1 Dénitrification autotrophe avec soufre.....	15
2.3.3.2 Culture d'algues (enlèvement par assimilation).....	17
2.3.3.3 Boues activées.....	17
2.3.3.4 Dénitrification hétérotrophe.....	18
2.4 <i>Dénitrification biologique hétérotrophe.....</i>	<i>19</i>
2.4.1 Génétique de la dénitrification.....	19
2.4.1.1 Réduction du nitrate.....	19

2.4.1.2	Nitrite réduction	20
2.4.1.3	Réduction du NO	21
2.4.1.4	Réduction du N ₂ O	21
2.4.1.5	Régulation de la dénitrification	22
2.4.2	Bactéries dénitrifiantes	22
2.4.3	Marqueurs génétiques de la dénitrification	25
2.4.4	Rôle des métaux traces dans la dénitrification	28
2.5	<i>Méthylotrophie</i>	28
2.5.1	Minéralisation du méthanol	29
2.5.2	Assimilation du méthanol	29
2.6	<i>Communauté microbienne</i>	29
2.6.1	Bactéries non-cultivables	29
2.6.2	Biofilm bactérien	30
2.6.3	Classification et phylogénie	31
2.6.4	Méthodes d'analyse d'une communauté microbienne	34
2.6.4.1	Génothèque 16S ribosomale et estimation de la diversité	34
2.6.4.2	Hybridation in situ fluorescente (FISH)	35
2.6.5	Étude de fonctionnalité d'une communauté microbienne	36
2.6.5.1	Microautoradiographie (MAR ou STAR)	37
2.6.5.2	Marquage à isotope stable (Stable isotope probing : SIP)	37
2.7	<i>Microscopie</i>	38
2.7.1	Fluorochromes (Fluorescence)	38
2.7.2	Microscope en épifluorescence	40
2.7.3	Microscope confocal à balayage laser (CLSM)	41
3	CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES	44
3.1	<i>Article 1</i>	44
3.1.1	Mise en contexte de l'article 1	44
3.1.2	Contribution de l'étudiant à l'article 1	44
3.1.3	Article 1	45
3.1.3.1	Résumé	46
3.1.3.2	Abstract	46
3.1.3.3	Introduction	47
3.1.3.4	Materials and methods	49
3.1.3.5	Results	52
3.1.3.6	Discussion	57
3.1.3.7	Conclusion	59
3.1.3.8	Acknowledgments	60
3.2	<i>Article 2</i>	61
3.2.1	Mise en contexte de l'article 2	61
3.2.2	Contribution de l'étudiant à l'article 2	61
3.2.3	Article 2	62

3.2.3.1	Résumé	63
3.2.3.2	Abstract.....	63
3.2.3.3	Introduction.....	64
3.2.3.4	Material and methods.....	66
3.2.3.5	Results.....	69
3.2.3.6	Discussion.....	78
3.2.3.7	Acknowledgments.....	81
3.3	<i>Article 3</i>	82
3.3.1	Mise en contexte de l'article 3.....	82
3.3.2	Contribution de l'étudiant à l'article 3.....	82
3.3.3	Article 3.....	83
3.3.3.1	Résumé	84
3.3.3.2	Abstract.....	84
3.3.3.3	Introduction.....	85
3.3.3.4	Methods, results and discussion	86
3.3.3.5	Description of <i>Nitratireductor</i> gen. nov.	94
3.3.3.6	Description of <i>Nitratireductor aquibiodomus</i> sp. nov.	94
3.3.3.7	Acknowledgments.....	95
3.4	<i>Article 4</i>	96
3.4.1	Mise en contexte de l'article 4.....	96
3.4.2	Contribution de l'étudiant à l'article 4.....	96
3.4.3	Article 4.....	97
3.4.3.1	Résumé	98
3.4.3.2	Abstract.....	98
3.4.3.3	Introduction.....	99
3.4.3.4	Materials and methods	101
3.4.3.5	Results.....	106
3.4.3.6	Discussion.....	113
3.4.3.7	Acknowledgments.....	118
4	CONCLUSION	119
5	BIBLIOGRAPHIE.....	124

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2-1 : NORME ET RECOMMANDATION POUR LES CONCENTRATIONS MAXIMALES EN NITRATE ET NITRITE DANS LES EAUX DE CONSOMMATION ET DE SURFACE.....	13
TABLEAU 2-2 : EFFICACITE DE LA DENITRIFICATION SELON LA SALINITE ET LA SOURCE DE CARBONE UTILISEE.	16
TABLEAU 2-3 : MICROFLORES RETROUVEES DANS DIVERS BIOPROCEDES DE DENITRIFICATION.....	24
TABLEAU 2-4 : ÉTUDES DE CARACTERISATION DES GENES DE LA DENITRIFICATION DANS DIFFERENTS ENVIRONNEMENTS.	26
TABLEAU 2-5 : EXEMPLES DE FLUOROCHROMES UTILISES POUR MARQUER DES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES.....	39
TABLEAU 2-6: EXEMPLE DE COLORANTS FLUORESCENTS UTILISES POUR COLORER LES CELLULES MICROBIENNES.	40
TABLEAU 2-7: SOURCES LASERS UTILISEES POUR LA MICROSCOPIE CONFOCALE.	41
TABLE 3-1: CONCENTRATIONS OF TRACE METALS ($\mu\text{G/L}$) IN LABORATORY-SCALE ASSAYS.	50
TABLE 3-2: LINEAR REGRESSION MODELS OF THE LABORATORY-SCALE ASSAYS.	52
TABLE 3-3: CONCENTRATIONS ($\mu\text{G/L}$) OF TRACE METALS IN THE INFLOW AND OUTFLOW OF THE DENITRIFICATION UNIT.	57
TABLE 3-4 : POSSIBLE AFFILIATION OF THE 16S rDNA SEQUENCES OF THE STRAINS ISOLATED FROM THE DENITRIFICATION REACTOR.	70
TABLE 3-5: POSSIBLE AFFILIATION OF THE 16S rDNA CLONES ISOLATED FROM THE DENITRIFICATION REACTOR.	71
TABLE 3-6: PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE <i>PHYLLOBACTERIACEAE</i>	87
TABLE 3-7: FATTY ACIDS PROFILE OF <i>PHYLLOBACTERIACEAE</i> BACTERIA.	90
TABLE 3-8 : LIST OF PROBES USED IN THIS STUDY	104
TABLE 3-9: QUANTIFICATION OF FISH SIGNALS EXPRESSED AS A PERCENT OF EUB338-MIX, EXCEPT FOR EUK516 WHICH IS EXPRESSED AS A PERCENT OF EUB338-MIX PLUS EUK516 (MEAN \pm SD, $n \geq 20$ BINARY IMAGES).....	110

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-1 SCHÉMA DU SYSTÈME DE TRAITEMENT DE L'EAU DU SAINT-LAURENT MARIN.....	1
FIGURE 1-2 ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION DU NITRATE DANS L'EAU DU SAINT-LAURENT MARIN.....	2
FIGURE 1-3 BIOREACTEUR DE DESOXYGENATION (A) ET DE DENITRIFICATION (B) DU BIODOME DE MONTREAL.....	4
FIGURE 2-1 SCHEMA DU CYCLE BACTERIEN DE L'AZOTE.....	8
FIGURE 2-2 : SCHEMA D'UN MICROSCOPE CONFOCAL A BALAYAGE LASER.....	42
FIGURE 3-1 EFFECT OF LOW AND HIGH DOSAGES OF TRACE METALS AND OF AMMONIA ON DENITRIFICATION.....	53
FIGURE 3-2: EFFECT OF IRON AND MANGANESE ON DENITRIFICATION.	55
FIGURE 3-3: TIME COURSE OF THE NO _x LEVEL (A) AND THE DENITRIFICATION RATE (B) IN THE SLM DENITRIFICATION UNIT (SEE TEXT).	56
FIGURE 3-4: PHYLOGENETIC ANALYSES OF 16S rDNA.....	72
FIGURE 3-4: PHYLOGENETIC ANALYSES OF 16S rDNA. (SUITE).....	73
FIGURE 3-5: RAREFACTION ANALYSES OF THE 16S rDNA GENE LIBRARY.	75
FIGURE 3-6: PCR-DGGE MONITORING OF THE COLONIZATION OF NEW BIOFLOW® CARRIERS.	76
FIGURE 3-7: BACTERIAL DIVERSITY PROFILES OF DIFFERENT SLM LOCATIONS DETERMINED BY PCR-DGGE.	77
FIGURE 3-8: PHYLOGENETIC ANALYSIS OF 16S rDNA SEQUENCES.	93
FIGURE 3-9 : MONITORING OF BIOFILM COLONIZATION BY PCR-DGGE.....	107
FIGURE 3-10: FISH IMAGES OF A 30 DAY-OLD BIOFILM.	109
FIGURE 3-11 MAR-FISH IMAGES FROM BIOFILMS CULTURED IN OXIC (A-B) AND ANOXIC (C-D) CONDITIONS.	112

LISTE DES ABREVIATIONS

- CARD: Rapporteur de déposition catabolique (« Catabolic reporter deposition »)
- CCD : Dispositif à transfert de charge (« Charge-coupled device »)
- CCME : Conseil des ministres de l'environnement
- CLSM : Microscope confocal à balayage laser
- DAPI : 4',6-Diamidino-2-phenylindole
- DNRA : Réduction dissimilatrice du nitrate vers l'ammoniaque
- DGGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient dénaturant
- EPS : Exopolysaccharide
- FISH : Hybridation *in situ* fluorescente
- FITC : Fluorescéine isothiocyanate
- GFP : Protéine fluorescente verte
- MAR : Microautoradiographie
- MDDEP : Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs
- NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
- OMS : Organisation mondiale de la santé
- PHA : Polyhydroxyalcanoate
- PHB : Poly-*bêta*-hydroxybutyrate
- PMT : Tube photomultiplicateur
- PPM : Partie par million
- RADP : Polymorphisme d'amplification aléatoire de l'ADN (« Random amplification polymorphic DNA »).
- RISA : Analyse des régions intergéniques ribosomales (« Ribosomal intergenic spacer analysis »)
- RuMP : Voie du ribulose monophosphate
- SLM : Saint-Laurent Marin
- STAR : Suivi du substrat par autoradiographie (« Substrat tracking autoradiography »)
- SIP : Marquage à isotope stable (« Stable isotope probing »)
- SBR : Réacteur en cuvette séquentielle (« Sequential batch reactor »)
- T-RFLP : Polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux
- TRITC : Tétraméthylrodamine isothiocyanate

TSA : Amplification du signal par la tyrosine

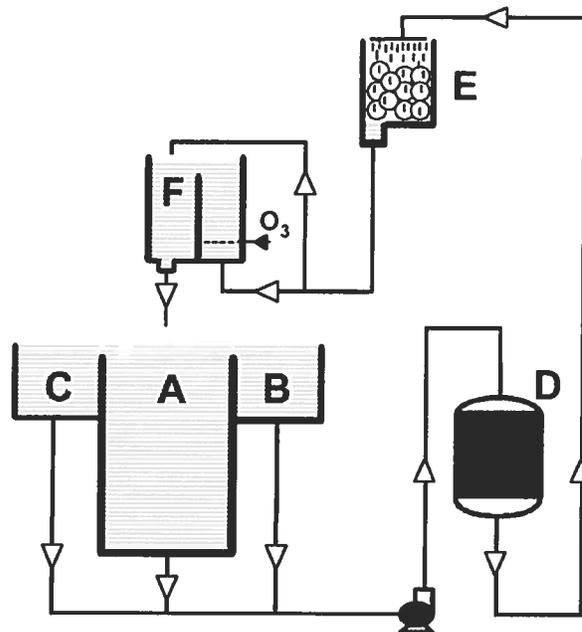
USEPA : «United States Environmental Protection Agency»

1. INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte du Saint-Laurent marin

Le Biodôme de Montréal (Biodôme) recrée quatre écosystèmes des Amériques dont celui du golfe Saint-Laurent. Ce dernier est nommé le Saint-Laurent marin (SLM) et comprend un grand aquarium contenant plus de trois millions de litres d'eau de mer artificielle. Cette eau est maintenue à 10°C, à un pH près de 8 et à une salinité de 28-30 g/L. Cet énorme bassin abrite quelque 600 poissons, 2000 invertébrés et une centaine d'oiseaux marins. L'aquarium possède son propre système de traitement de l'eau (Figure 1-1) qui permet le recyclage de l'eau de mer. Des filtres à sable enlèvent les matières en suspension, un percolateur permet la transformation des déchets ammoniacaux en nitrate alors que l'ozonateur oxyde les acides humiques et fulviques préservant ainsi la couleur bleutée de l'eau.

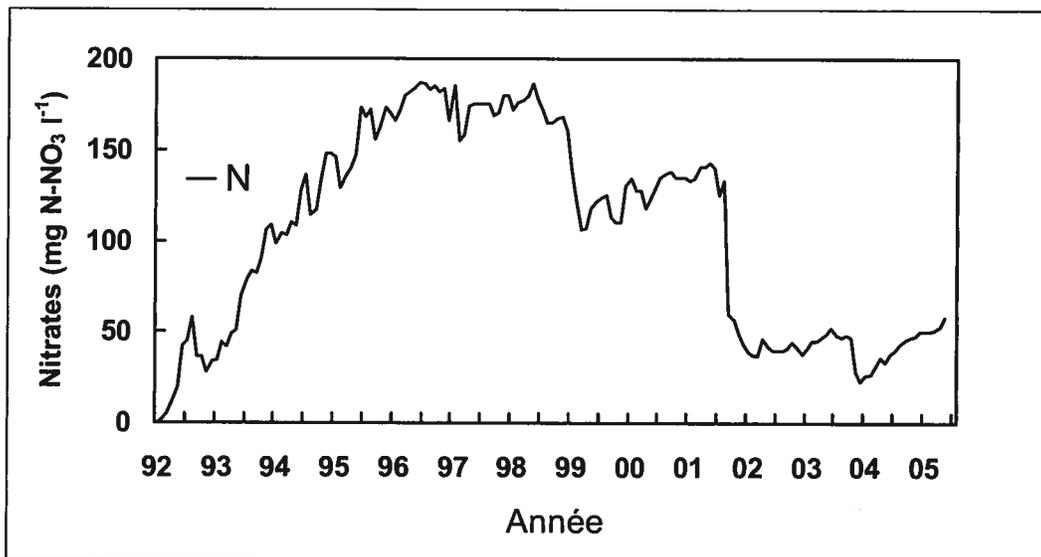
Figure 1-1 Schéma du Système de traitement de l'eau du Saint-Laurent Marin.
A - Bassin principal (Baie), B - Bassin d'isolement, C - Cuvette de marée, D - Filtre à sable, E - Percolateur (Nitrificateur), F - Système d'ozonation. (Image fourni par Serge Parent, Biodôme de Montréal)



1.1.1 Problématique du nitrate

Malgré la présence d'un système de traitement de l'eau complexe, la concentration en nitrate s'élève rapidement au-dessus de 50 mg N-NO₃/L dans les aquariums en circuit fermé, alors qu'elle ne dépasse même pas 1 mg N-NO₃/L dans le milieu marin (Yeats 1990; Parent and Morin 2000). Les aquariums à très grand volume comme le « Ocean Tank » du « New Jersey State Aquarium » et le SLM du Biodôme de Montréal n'échappent pas à cette accumulation de nitrate. Dans le SLM, la concentration en nitrate a atteint 180 mg N-NO₃/L en 1995 (Figure 1-2). Cette accumulation provient principalement de la transformation des déchets azotés (ammoniaque et acide urique) relargués par les poissons, les invertébrés et les oiseaux habitant le Saint-Laurent marin en nitrate via le système de traitement de l'eau du SLM.

Figure 1-2 Évolution de la concentration du nitrate dans l'eau du Saint-Laurent Marin.



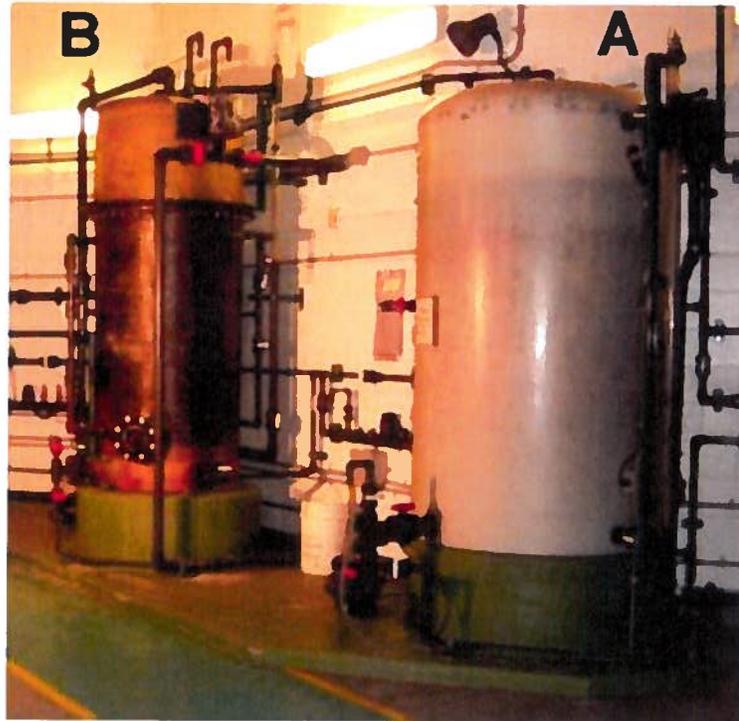
Afin de résoudre le problème de l'accumulation du nitrate dans le Saint-Laurent Marin, le Biodôme de Montréal a apporté des mesures correctives. Premièrement, il y a eu enlèvement de la colonie de fous de Bassan, car ceux-ci étaient responsables de 30% des apports d'azote dans le bassin (Parent and Morin 2000). Deuxièmement, il y a eu une augmentation des apports en eau de mer neuve dans le bassin de l'ordre de 16% par an

comparativement à 8% auparavant. Le remplacement d'une importante quantité d'eau n'est toutefois pas le moyen à privilégier. Ce changement d'eau peut s'avérer problématique compte tenu du stress occasionné aux animaux ainsi que des contraintes d'opération. De plus, la fabrication de l'eau de mer artificielle est onéreuse (~ 50\$/m³) et le rejet à l'égout d'eau à forte teneur en nitrate n'est pas souhaitable d'un point de vue environnemental. Finalement, le Biodôme de Montréal a acheté une unité de dénitrification de la compagnie EcoMat inc (Californie). Ces différentes mesures visaient à maintenir une concentration en nitrate inférieure à 20 mg/L.

1.1.2 Unité de dénitrification

Le système de dénitrification est composé de deux réacteurs. Le désoxygénateur sert à enlever l'oxygène de l'eau afin de la rendre les conditions propices à la dénitrification (Figure 1-3A). Le désoxygénateur est un réacteur à lit fixe, d'environ un mètre cube, composé de biobilles NuPAC® de 9 cm. Le dénitrificateur, quant à lui, est un réacteur à lit fluidisé d'environ un mètre cube ((Figure 1-3B) où s'effectue la dénitrification. Le support pour la croissance bactérienne est le Bioflow 9®. La source de carbone est ajoutée sous forme de méthanol 50% dans les deux réacteurs. Cette source de carbone est peu coûteuse, elle se mélange facilement à l'eau et elle est aussi réputée pour produire une quantité moindre de biomasse que l'acétate ou l'éthanol.

Figure 1-3 Bioréacteur de désoxygénation (A) et de dénitrification (B) du Biodôme de Montréal.



1.1.3 Modification et amélioration de l'unité de dénitrification

Depuis son installation en 1998, le système de dénitrification a fonctionné avec un succès mitigé (moins du quart de l'efficacité escomptée). Le taux du nitrate s'est maintenu à 140 mg/L pendant quelques temps, puis plusieurs problèmes techniques sont survenus (opération, colmatage, efficacité, bris). La technologie vendue par EcoMat était utilisée pour le traitement de l'eau douce et elle s'est avérée problématique en eau de mer.

Des travaux d'ingénierie ont été effectués afin de solutionner les divers problèmes. Plusieurs modifications techniques ont été effectuées soit un changement du point d'injection du méthanol dans le deuxième réacteur, le remplacement du système de fluidisation, la modification des grilles ainsi que le changement du type des biobilles. Malgré ces différentes modifications, le système de dénitrification présentait encore une faible activité (Sauvé 2000).

Les travaux d'ingénierie de Sauvé (2000) ont permis de conclure qu'une meilleure connaissance des microorganismes impliqués dans la dénitrification aiderait à améliorer le fonctionnement du système à l'étude. Or, peu d'études microbiologiques ont été effectuées sur la dénitrification d'effluents marins froids (<20°C). Des études portant sur la diversité microbienne ont été effectuées par Neef *et al.*(1996) et par Lemmer *et al.*(1997) sur un réacteur de dénitrification à lit fixe en eau douce maintenu à de 28°C. Celles-ci ont révélé la présence de *Paracoccus denitrificans*, *Hydrogenophaga* sp. et *Hyphomicrobium* sp. Les conditions expérimentales étaient cependant très différentes de celles du système à l'étude.

D'autres études réalisées en collaboration avec l'École Polytechnique de Montréal ont déterminé que l'utilisation d'un grillage conique combinée à l'utilisation de biobilles de type Cascade 1A permettraient un meilleur auto-nettoyage et une meilleure circulation des biobilles (Dupla *et al.* 2006). Ces modifications, combinées à une opération du dénitrificateur en mode cuvée plutôt qu'en flot continu comme c'est le cas présentement, devraient conduire à un meilleur enlèvement du nitrate (Labelle *et al.* 2005).

1.2 But à long terme

À long terme, la présente étude visait à identifier la microflore présente dans le dénitrificateur marin du Biodôme de Montréal et à connaître les interactions entre les microorganismes impliqués afin d'obtenir un meilleur enlèvement du nitrate dans l'eau du Saint-Laurent Marin. Le maintien de la concentration à moins de 20 mg/L permettrait au Biodôme de Montréal d'utiliser le Saint-Laurent Marin à son plein potentiel.

1.3 Hypothèses

L'étude proposée se base sur les conclusions et recommandations du mémoire de maîtrise de Sauvé (2000) dans le cadre de la mise en fonction du système de dénitrification. Elle se base sur les deux hypothèses suivantes :

- Certains métaux traces et vitamines pourraient être limitants pour la croissance et l'activité des microorganismes dans le dénitrificateur marin du Biodôme de Montréal.

Les métaux traces sont notamment nécessaires à l'activité d'enzymes, dont plusieurs dans la respiration cellulaire. L'ajout de métaux traces pourrait ainsi contribuer à améliorer les performances du système de dénitrification installé au Biodôme de Montréal.

- Les bactéries marines et dénitrifiantes utilisant le méthanol ont été peu étudiées jusqu'à présent. L'eau froide et salée présente dans le dénitrificateur constitue, de plus, un environnement très sélectif où pourrait se développer des bactéries non caractérisées. Une meilleure connaissance des bactéries impliquées dans la dénitrification dans de telles conditions permettrait d'améliorer le procédé de dénitrification du Biodôme de Montréal.

1.4 Objectifs

Les objectifs spécifiques de la présente étude étaient les suivants :

- Vérifier l'effet de l'ajout de métaux traces sur les performances de dénitrification de la flore microbienne du dénitrificateur marin du Biodôme de Montréal;
- Caractériser la composition spécifique de la flore microbienne présente dans le bioréacteur de dénitrification marin du Biodôme de Montréal par microbiologie classique et par biologie moléculaire;
- Étudier la structure de ce biofilm, la distribution des populations bactériennes et le rôle des bactéries du biofilm dénitrifiant par hybridation *in situ* fluorescente et par microautoradiographie couplée à l'hybridation *in situ*.

1.5 Présentation du document

La section 2 décrit la revue de littérature laquelle aidera à la compréhension du sujet et à l'argumentation apportée dans les articles. Les différents articles publiés dans le cadre de la présente étude sont présentés sous leur forme intégrale à la section 3. Une brève conclusion incluant des recommandations est présentée à la section 4.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

Cette revue de littérature porte, entre autres, sur les différentes transformations microbiologiques de l'azote. Une attention toute particulière est portée aux transformations impliquant le nitrate et le nitrite ainsi que sur les méthodes permettant leur enlèvement de l'eau. Les microorganismes dénitrifiants ainsi que leurs gènes (et enzymes) seront décrits. Une brève description de la méthylothrophie est présentée. Un survol des notions de communauté microbienne, de classification (taxonomie) et des méthodes d'analyse est aussi fait. Pour finir, les différents types de microscopie en fluorescence sont définis.

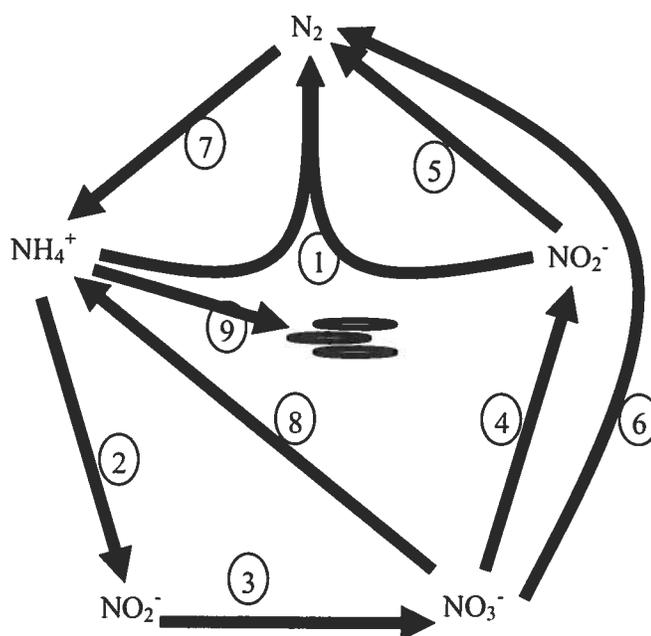
2.1 Cycle de l'azote

Cette section porte sur les différents processus impliqués dans le cycle de l'azote au niveau du traitement de l'eau. La nitrification et les différents modes de réduction du nitrate sont décrits plus en détail.

Dans l'environnement, l'azote est l'un des éléments les plus abondants. En effet, l'air de l'atmosphère est constitué à 79% d'azote gazeux (N_2). Cette forme d'azote est peu réactive et ne peut pas être assimilée directement par les plantes et les autres organismes supérieurs. L'ammoniac est la forme assimilable d'azote la plus abondante dans la biosphère. Les microorganismes jouent un rôle très important dans le cycle de l'azote puisqu'ils en régularisent les entrées (mobilisation) et les sorties (immobilisation). En fait, la majorité des transformations de l'azote résultent d'activités microbiennes. Les bactéries fixatrices d'azote tel *Azotobacter* et les Rhizobiaceae rendent l'azote moléculaire accessible sous forme de composés ammoniacaux. Elles fixent l'azote moléculaire à l'aide des nitrogénases. Les microorganismes dénitrifiants, quant à eux, diminuent une partie de l'azote disponible en le retransformant en N_2 . Les molécules azotées produisent de l'énergie lors de l'oxydation (ex. nitrification) alors qu'elles agissent comme accepteur d'électrons lors de la réduction (ex. dénitrification). Les réactions de transformation des composés azotés sont effectuées par oxydoréduction. Les

principales transformations microbiennes des composés azotés sont présentées à la figure 2-1.

Figure 2-1 Schéma du cycle bactérien de l'azote. 1- Anammox, 2- Nitritation, 3- Nitratation, 4- Réduction du nitrate, 5- Réduction du nitrite, 6- Dénitrification, 7- Fixation de l'azote, 8- Ammonification (DNRA, voir section 2.1.2.1), 9- Assimilation.



2.1.1 Nitrification

La nitrification est une étape critique dans le cycle de l'azote puisque son substrat initial, l'ammoniaque, peut inhiber la croissance des microorganismes à de faibles concentrations. Elle nécessite une quantité abondante d'oxygène. La réaction de nitrification se déroule en deux étapes : la nitritation transforme l'ammoniaque en nitrite et la nitratation transforme le nitrite en nitrate. Les principaux genres microbiens impliqués dans la nitritation sont *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* et *Nitrosovibrio* (Burell *et al.* 2001). Les bactéries appartenant à ces genres sont connues sous l'acronyme AOB (« Ammonia Oxydizing Bacteria »). Ce processus requiert la

formation d'hydroxylamine comme intermédiaire de réaction. L'enzyme responsable de cette transformation est l'ammoniaque mono-oxygénase laquelle est fortement apparentée à l'enzyme responsable de l'oxydation du méthane (méthane mono-oxygénase). La seconde étape, la nitratisation, est réalisée par *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrospira* et *Nitrococcus*. Ces bactéries sont connues sous l'acronyme NOB (« Nitrite Oxydizing Bacteria »). Ces bactéries sont chimio-autotrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent du CO₂ comme source de carbone et de la matière inorganique comme source d'énergie. Bien que la nitrification soit principalement autotrophe, certaines bactéries hétérotrophes, certains champignons et certaines algues peuvent également l'effectuer.

Les réactions de nitrification dégagent très peu d'énergie, soit -45 kJ/mol pour la nitrification et -38 kJ/mol pour la nitratisation (Morel and Hering 1993). La croissance des bactéries requiert par conséquent la transformation d'une quantité importante de substrat (ammoniaque et nitrite) ce qui occasionne l'accumulation de déchets. Ceux-ci acidifient fortement le milieu de culture et rendent la multiplication des bactéries lente et difficile. De plus, ces bactéries supportent mal une forte concentration en matière organique. Toutefois, la croissance des bactéries peut être stimulée par l'ajout de carbonate dans le milieu ce qui facilite l'accessibilité du CO₂ et augmente le pH.

2.1.2 Réduction du nitrate

Plusieurs molécules tel le sulfate, le bromate, et le nitrate peuvent servir d'accepteurs d'électrons au même titre que l'oxygène, en raison de leur fort pouvoir oxydant. Plusieurs voies de réduction du nitrate sont utilisées selon l'état d'oxydation final résultant du processus. Les trois voies de réduction connues jusqu'à présent sont l'ammonification (DNRA), l'oxydation anaérobie de l'ammoniaque (anammox) et la dénitrification. L'énergie libérée par la réaction de dénitrification (NO₃-N₂) (-113 kJ/mol) est quasiment aussi importante que celle libérée par la respiration aérobie (O₂-H₂O) (-119 kJ/mol). La réduction dissimilatrice du nitrate vers l'ammoniaque (DNRA) est moins énergétique avec -76 kJ/mol (NO₃-NH₃) (Morel and Hering 1993).

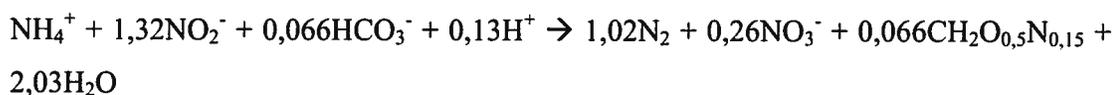
2.1.2.1 Réduction dissimilatrice du nitrate vers l'ammoniaque (DNRA)

La réduction dissimilatrice du nitrate vers l'ammoniaque est une réaction qui permet de réduire le nitrate en ammoniaque. Cette réaction est aussi appelée ammonification du nitrate. Dans ce processus, le nitrate passe de la forme d'oxydation maximale (5+) à l'état le plus réduit (3-). Le nitrate est préalablement converti en nitrite ce qui peut former de l'ATP puis, le nitrite est transformé en ammoniaque pour la régénération du NAD.

L'ammonification est principalement effectuée par des bactéries fermentaires telles *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries lorsque la concentration en nitrate est faible. Les conditions du milieu nécessitent une forte concentration en substrat fermentable ainsi qu'une faible charge en accepteurs d'électrons dont le nitrate et l'oxygène. La nature du substrat déterminera si la DNRA est favorisée ou non. Les sucres favorisent la DNRA, car ils sont facilement fermentables alors que les alcools le sont moins. De plus, le substrat sert d'accepteur d'électrons et de source de carbone. La charge en accepteur d'électrons et en matière organique influence la proportion de la réduction du nitrate attribuable à la DNRA et à la dénitrification. Le milieu idéal pour cette forme de réduction du nitrate est le rumen des animaux (Tiedje *et al.* 1982).

2.1.2.2 Oxydation anaérobie de l'ammoniaque (ANAMMOX)

L'anammox, soit l'oxydation anaérobie de l'ammoniaque, a été observée pour la première fois par van de Graaf et Mulder (1995). Ce processus énergétique convertit une molécule de nitrite conjointement à une molécule d'ammoniaque afin de produire de l'azote gazeux (N₂). Lors de la transformation, l'intermédiaire nitrosoamine est généré. En plus d'oxyder l'ammoniaque, une partie du nitrite est transformée en nitrate afin de produire plus d'énergie selon l'équation suivante :



La réaction anammox se déroule dans une organelle spécialisée nommée anammoxosome. Cette organelle occupe entre 30% et 60% du volume cellulaire. La réaction se déroule principalement chez des organismes affiliés aux *Planctomycetales*. Ces bactéries sont dépourvues de peptidoglycane, utilisent le CO₂ comme source de carbone et croissent dans des conditions anaérobies (anoxies). Trois groupes bactériens enrichis en culture non pure sont actuellement connus, soit *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia* et *Candidatus Scalindua* (Strous *et al.* 1999; Schmid *et al.* 2000; Schmid *et al.* 2003). Il semble que cette réaction puisse aussi être effectuée par la bactérie *Nitrosomonas europaea* en absence d'oxygène, mais avec un rendement 50 fois plus faible (deGraaf *et al.* 1996).

Le démarrage d'un bioprocédé d'anammox est ardu et est complètement inhibé par la présence d'oxygène à 0,5% de saturation. L'affluent idéal doit être riche en ammoniacque et en nitrite, et pauvre en matière organique. Le taux de croissance des bactéries de l'anammox est faible ; une division cellulaire nécessite plus de deux semaines. De plus, pour qu'une réaction anammox ait lieu, une densité de population supérieure à 10¹⁰ bactéries par millilitre est nécessaire (deGraaf *et al.* 1996).

Les principaux avantages d'une technologie utilisant l'anammox résident dans le fait qu'elle nécessite une nitrification partielle (ammoniacque vers nitrite) en plus d'éliminer les coûts reliés à la source de carbone. En effet, ce procédé peut réduire les coûts d'opération de 90% par rapport à un procédé de nitrification-dénitrification conventionnel (Jetten *et al.* 2001). Selon certaines études, l'anammox serait très répandu dans les sédiments. En effet, il serait responsable de 50-70% de la production de N₂ dans la mer Noire (Thamdrup and Dalsgaard 2002).

2.1.2.3 Dénitrification

La dénitrification est responsable de la transformation du nitrate en azote moléculaire par l'intermédiaire du nitrite. Elle a été démontrée pour la première fois en 1882 par Gayon. Cette réaction est un processus respiratoire qui agit en remplacement de la phosphorylation oxydative. Dans la dénitrification, le nitrate et les autres oxydes d'azote

(NO, N₂O et NO₂) jouent le rôle d'accepteur final d'électrons et contribuent à la formation de la force proton motrice nécessaire à la production d'ATP. Cette chaîne respiratoire est très répandue chez les bactéries.

La majorité des microorganismes dénitrifiants possèdent la respiration aérobie. La dénitrification se retrouve chez les protéobactéries (paroi à gram négative), les *Bacillus* (paroi à gram positive) ainsi que chez les archéobactéries. Des processus semblables à la dénitrification sont également présents chez certaines moisissures. *Fusarium oxysporum* peut réduire le nitrate en N₂O en condition limitante d'oxygène (Usuda *et al.* 1995). Cette dénitrification fongique se déroule au sein de la mitochondrie via une chaîne respiratoire. Finlay *et al.* (1983) ont aussi démontré une activité de dénitrification chez un groupe de protozoaires primitifs, les *Loxodes*.

La distribution de la respiration du nitrate dans divers groupes phylogénétiques suggère qu'elle soit apparue très tôt dans l'évolution. La dénitrification est principalement d'intérêt agricole, où elle appauvrit les sols en azote, ainsi que dans le domaine de l'hydrologie, où le nitrate peut contribuer à l'eutrophisation des cours d'eau.

2.2 Toxicité du nitrate et du nitrite

Le nitrate et le nitrite sont des contaminants très solubles dans l'eau. Ils sont rapidement lessivés du sol pour se retrouver dans les eaux de surface et souterraines. Les nappes d'eau souterraine sont une importante source d'approvisionnement en eau potable. La présence de concentrations élevées en nitrate dans l'eau souterraine oblige les municipalités à traiter l'eau et parfois même à changer de source d'approvisionnement en eau potable. Des normes et recommandations ont été établies par les chercheurs et scientifiques des différents gouvernements afin de déterminer les concentrations acceptables pour divers milieux. À titre indicatif, les critères applicables du MDDEP, CCME, USEPA et de l'OMS pour l'eau potable et de surface sont présentés au tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Norme et recommandation pour les concentrations maximales en nitrate et nitrite dans les eaux de consommation et de surface.

	Organisme*					
	CCME	CCME	MDDEP	MDDEP	USEPA	OMS
Type de recommandation	Eau potable	Prévention de la vie aquatique	Eau potable	Prévention de la vie aquatique	Eau potable	Eau potable
Nitrate (mg N-NO ₃ /L)	10	13			10	11
Nitrite (mg N-NO ₂ /L)	3,2	0,06			1	1
Nitrate + Nitrite (mg N-NO _x /L)			10	10		
Références	CCME 1999	CCME 1999	MDDEP 2005	MDDEP 2001	USEPA 2002	OMS 1998

*CCME : Conseil canadien des ministres de l'environnement

*MDDEP : Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs

*USEPA : United States Environmental Protection Agency

*OMS : Organisation mondiale de la santé

Chez l'humain, la toxicité associée au nitrate repose sur la formation de nitrosodiamine dans l'estomac. Chez les jeunes enfants, il peut en résulter le syndrome du bébé bleu dans lequel l'hémoglobine est transformée en méthémoglobine ce qui empêche l'apport d'oxygène aux cellules.

Pour les organismes aquatiques, plusieurs facteurs entrent en ligne de compte lors de l'évaluation du seuil de toxicité des composés azotés. Le pH du milieu influence la toxicité du nitrite. En milieu acide, le nitrite s'ionise en acide nitrique, lequel est fort dommageable pour les poissons et les invertébrés. La toxicité varie également avec la salinité de l'eau. Le chlorure de sodium agit comme compétiteur lors de l'absorption des nitrites dans l'intestin des poissons et permet ainsi une meilleure tolérance envers ce

polluant (Durborow *et al.* 1997). L'addition de chlorure de sodium est d'ailleurs un traitement qui peut être utilisé dans un aquarium, car il permet de hausser la quantité de sel proportionnellement à celle du nitrite. Pour les aquariums d'eau de mer, Camargo *et al.* (2005) ont déterminé qu'un taux de nitrate de 20 mg/L est acceptable. Selon eux, à des concentrations supérieures, le système immunitaire des poissons est affecté par la présence du nitrate.

2.3 Méthodes d'élimination du nitrate

Le nitrate peut être enlevé de l'eau par des moyens chimiques, physiques ou biologiques. Ces méthodes agissent en le transformant en azote gazeux ou, encore, en l'emmagasinant dans la biomasse.

2.3.1 Élimination chimique du nitrate

Plusieurs méthodes chimiques et électrochimiques permettent la transformation du nitrate et du nitrite en azote moléculaire (N₂). L'utilisation du fer moléculaire (Zero-valence iron) ou du manganèse compte parmi les méthodes chimiques et sont généralement peu sélectives. Toutefois, elles permettent la transformation (réduction) d'autres produits ou la réduction partielle du nitrate. Plusieurs sous-produits de réaction peuvent être retrouvés tels l'ammoniaque et le N₂O (Choe *et al.* 2000). L'utilisation de l'acide sulfamique conjointement au zinc (comme catalyseur) est une autre méthode qui permet de transformer le nitrate en azote moléculaire. Le zinc est ensuite régénéré par un courant électrique. Cette méthode est plus sélective envers le nitrate et le nitrite que les précédentes (Lee *et al.* 2006).

2.3.2 Élimination physique du nitrate

L'osmose inverse est un procédé efficace dans le domaine du traitement de l'eau potable. Le principe de l'osmose inverse consiste à forcer l'eau à travers une membrane semi-perméable laquelle retient les composés non désirés. Ce type de procédé est principalement applicable aux eaux douces puisque les membranes sont généralement imperméables au sel (Schaetzel *et al.* 2004). Le procédé retire de l'eau non seulement le nitrate, mais aussi la plupart des sels. Lorsque l'effluent est riche en matière organique, la

durée de vie des membranes est réduite considérablement par la croissance d'un biofilm microbien.

Un autre moyen physique d'enlever le nitrate est la résine échangeuse d'ions (Shrimali and Singh 2001). Ce processus fonctionne plus ou moins bien avec un effluent salé, car les chlorures, très abondants dans l'eau de mer, sont utilisés pour la régénération de la résine. De plus, tout comme l'osmose inverse, l'efficacité diminue lorsque la charge en nitrate s'élève.

Une troisième méthode physique pour enlever le nitrate est l'électrodialyse. Ce processus utilise un courant électrique pour faire passer le nitrate à travers une membrane. Le nitrate y est alors enlevé. Toutefois, la forte concentration en sels de l'eau de mer réduit de beaucoup l'efficacité de ce système.

Aucune de ces technologies n'est adéquate pour l'enlèvement du nitrate d'un aquarium d'eau de mer, mais elles sont intéressantes dans le domaine du traitement de l'eau potable et des effluents industriels.

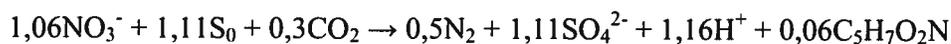
2.3.3 Élimination biologique du nitrate

Il existe une panoplie de procédés biologiques pour enlever le nitrate de l'eau. Toutes ces méthodes impliquent la culture de microorganismes. Les biotraitements sont une voie efficace et renouvelable pour l'élimination des déchets azotés tel le nitrate. Les microorganismes enlèvent le nitrate de l'eau par leur croissance et leur métabolisme. La dénitrification autotrophe avec soufre, la culture d'algues, les boues activées et la dénitrification hétérotrophe sont les principales catégories d'enlèvement biologique du nitrate.

2.3.3.1 Dénitrification autotrophe avec soufre

La dénitrification autotrophe avec sulfures est effectuée par des bactéries autotrophes impliquées dans le cycle du soufre tels *Thiomicrospira denitrificans*, *Thiobacillus*

denitrificans, *Paracoccus pantothophus* et *Beggiatoa alba* (Flere and Zhang 1998). La réaction stœchiométrique de ce processus est la suivante (Koenig and Liu 2002) :



Le sulfure et le nitrate agissent respectivement à titre de donneur et d'accepteur d'électrons. Lors de ce type de dénitrification, il y a une forte production d'ions hydrogène sous forme de H_2SO_4 , donc d'acidité. Ce type de réaction n'est pas souhaitable dans un environnement clos puisqu'il y a échange de molécules de nitrate contre des molécules de sulfate. Ce dernier s'accumule et, à long terme, n'est pas plus souhaitable, car il peut être transformé en H_2S en condition anaérobie. De plus, la dénitrification autotrophe est beaucoup moins efficace que la dénitrification hétérotrophe (tableau 2-2).

Tableau 2-2 : Efficacité de la dénitrification selon la salinité et la source de carbone utilisée.

Effluent	Salinité (g/L)	Concentration (mg N-NO ₃ ⁻ /L)	Température (°C)	Source de carbone et énergie	Efficacité (kg N/m ³ /j)	Références
Eau de mer	28	54	16	Méthanol	1,7	Labelle <i>et al.</i> 2005
Artificiel	0	1000	26	Méthanol	12,1	Blaszczyk <i>et al.</i> 1985
Artificiel	0	1000	26	Éthanol	6,1	Mycielski <i>et al.</i> 1983
Artificiel	0	1000	26	Acétate	8,7	Blaszczyk 1983
Artificiel	0	40	NA	Méthanol	3,5	Rajapakse and Scutt 1999
Artificiel	0	100	20-25	CO ₂ + S ⁰	1,4	Oh <i>et al.</i> 2001
Artificiel	0	100	20-25	CO ₂ , S ⁰ , Méthanol	2,7	Oh <i>et al.</i> 2001

La dénitrification autotrophe est surtout utilisée dans les aquariums contenant des coraux. Dans ce cas, l'effluent acide, généré par le procédé, passe dans une colonne de carbonate de calcium. Le calcium libéré par le processus permet de remplacer celui utilisé par les coraux. L'utilisation de ce type de dénitrificateur se limite à de petits aquariums, car le système de traitement nécessite une grande superficie.

Des chercheurs ont couplé la dénitrification autotrophe et la dénitrification hétérotrophe au sein d'un même réacteur : ce procédé est alors appelé dénitrification mixotrophe (Kim and Bae 2000; Oh *et al.* 2001; Kim *et al.* 2002). Certains avantages peuvent résulter de ce couplage soit une efficacité accrue, une réduction de la quantité de carbone à ajouter, une superficie moindre, un tamponnage de l'effluent et une régénération du calcium dans l'eau. En effet, Kim *et al.* (2002) ont montré qu'il fallait la moitié moins de méthanol pour obtenir une dénitrification complète et que le réacteur mixotrophe présentait une efficacité de dénitrification similaire à celle du réacteur hétérotrophe. Ces auteurs ont aussi noté une plus faible turbidité de l'effluent du réacteur mixotrophe, donc probablement une moins grande production de boue et moins de colmatage du réacteur.

2.3.3.2 *Culture d'algues (enlèvement par assimilation)*

Les algues peuvent être utilisées pour le traitement d'effluent riche en nitrate (Spotte 1991). Durant leur croissance, les algues absorbent du nitrate qu'elles transforment en matériel biologique. Ce type de traitement est simple d'opération. Il comporte l'avantage majeur d'enlever aussi le phosphate. Ces deux composés polluants (nitrate et phosphate) se retrouvent souvent conjointement dans les eaux usées et ils peuvent occasionner l'eutrophisation des cours d'eau. Par contre, ce procédé requiert de très grandes superficies pour le traitement, une bonne luminosité et beaucoup de main-d'œuvre. Il est difficilement applicable pour le traitement à l'intérieur. De plus, les algues supportent mal la rigueur de nos hivers.

2.3.3.3 *Boues activées*

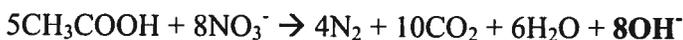
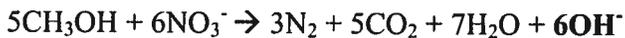
Les boues activées sont très répandues dans le domaine du traitement des eaux usées. Elles permettent la réduction de la matière organique, la nitrification et la dénitrification.

L'alternance des phases aérobie et anoxie est propice à une bonne activité de dénitrification. L'abondance de la matière organique en fait une source de carbone pour la dénitrification et une source externe de carbone peut être ajoutée au besoin.

2.3.3.4 Dénitrification hétérotrophe

La dénitrification hétérotrophe requiert une source de carbone organique. Les substrats les plus couramment utilisés sont l'acétate, le méthanol et l'éthanol. Le choix de la source de carbone est dicté par quatre facteurs principaux soit la disponibilité, le coût, l'efficacité et la production de biomasse. Le méthanol est généralement la source qui satisfait le mieux à ces quatre critères : la production de biomasse est plus faible qu'avec les autres sources de carbone, il coûte moins cher et est très soluble dans l'eau (Bilanovic *et al.* 1999). L'usage du méthanol est cependant proscrit pour le traitement de l'eau potable, car il est nocif pour la santé humaine. Dans ce cas, l'éthanol et l'acétate sont des alternatives intéressantes.

Un fait intéressant pour les aquariums est la production d'alcalinité (ion OH⁻) par la dénitrification hétérotrophe tel que montré par les équations stœchiométriques suivantes :



Cela permet de tamponner l'acide produit lors de la minéralisation et de la nitrification, et de maintenir un pH adéquat dans l'aquarium. L'utilisation de l'acétate offre une excellente efficacité. Par contre, il produit une forte quantité de biomasse ce qui entraîne un colmatage plus fréquent du réacteur. D'autres substrats, tels un hydrolysate de boues activées (Aravinthan *et al.* 2001) et le méthane (Costa *et al.* 2000) ont été proposés comme sources de carbone moins dispendieuses. L'hydrolysate est cependant hétérogène et il est plus difficile à doser que le méthanol. Le méthane quant à lui, nécessite une étape d'oxydation en aérobie afin d'être transformé en méthanol.

L'efficacité de la dénitrification varie selon le substrat utilisé et la concentration en nitrate à l'affluent. Une forte concentration en nitrate favorise une forte activité. La comparaison des différentes sources de carbone et leur efficacité est résumée au tableau 2-2 présenté à la section 2.3.3.1.

2.4 Dénitrification biologique hétérotrophe

La dénitrification biologique hétérotrophe implique plusieurs gènes et plusieurs enzymes qui sont décrits dans cette section. Elle présente aussi les principaux microorganismes dénitrifiants et les marqueurs utilisés pour leur étude. Cette section explore aussi le rôle des métaux traces dans la dénitrification.

2.4.1 Génétique de la dénitrification

2.4.1.1 Réduction du nitrate

Trois enzymes effectuent la réduction du nitrate en nitrite. Les gènes *nas* produisent une enzyme nitrate réductase assimilatrice. Cette molybdoenzyme est formée d'une seule sous-unité qui possède un centre fer-soufre (Zumft 1997). Contrairement aux autres enzymes impliquées dans la dénitrification, elle ne réagit pas à la présence d'oxygène, mais plutôt à la présence du nitrate. De plus, elle est réprimée en présence d'ammoniaque, car ce dernier est une source d'azote plus facilement assimilable par les bactéries.

Les gènes *nap* produisent l'enzyme du même nom, laquelle est aussi nommée nitrate réductase périplasmique. Cette dernière s'apparente à l'enzyme nitrate réductase assimilatrice. Elle est constituée d'un hétérodimère. La première sous-unité de l'enzyme est une molybdoenzyme comportant un centre fer-soufre tandis que la seconde contient un hème (Zumft 1997).

Le troisième type de gène codant pour une nitrate réductase est le *nar*. L'enzyme produite par ce gène est membranaire et possède trois sous-unités qui renferment respectivement un molybdofacteur (molybdoptérine), un centre fer-soufre et un hème.

L'enzyme est directement impliquée dans la réduction dissimilatrice du nitrate (Zumft, 1997).

Dans tous les cas, le produit final de la réaction est le nitrite. Il est à noter que les trois types de gènes peuvent se retrouver chez une même bactérie. C'est d'ailleurs le cas pour *Rhodobacter* sp. et certaines *Pseudomonas* sp. Les trois enzymes réductases présentent une similitude de structure mais possèdent des sous-unités différentes (molybdène, Fe-S et hème). À titre informatif, on notera que chez les champignons, le gène nitrate réductase identifié jusqu'à présent est *nii* et qu'il sert principalement à la voie assimilatrice du nitrate.

2.4.1.2 Nitrite réduction

Tout comme pour la réduction du nitrate, plusieurs enzymes peuvent effectuer la réduction du nitrite. Ces enzymes effectuent la dissimilation du nitrite en monoxyde d'azote (NO).

Il existe deux types de nitrite réductases. Le premier type est associé à des atomes de cuivre pour le transport des électrons. L'enzyme nitrite réductase est alors encodée par le gène *nirK* et se retrouve sous la forme d'homotrimère. Elle porte également le surnom de nitrite réductase bleu ou CuNir. L'autre type de nitrite réductase est associé à deux cytochromes pour le transport des électrons, soit le cytochrome c et l'hème d₁. Cette deuxième enzyme est le produit du gène *nirS* et est présente dans le périplasme sous forme d'un homodimère.

Il n'y a aucune relation entre la position phylogénétique d'un microorganisme et la présence de l'une ou l'autre des nitrite réductases. Deux bactéries appartenant à un même genre peuvent synthétiser deux types différents d'enzymes. Seulement 30% des bactéries dénitrifiantes connues synthétisent l'enzyme nitrite réductase NirK (Braker *et al.* 1998). L'enzyme NirS est, pour sa part, la plus largement répandue (Coyne *et al.* 1989; Crossman *et al.* 1997; Daims *et al.* 2001)). Contrairement aux nitrate réductases, il n'existe aucune homologie de structure entre les deux types d'enzymes nitrite réductases.

Ces enzymes peuvent également réduire l'oxygène ; elles ont d'ailleurs été longtemps considérées comme étant des cytochromes oxydases (Wharton and Gibson 1976).

2.4.1.3 Réduction du NO

L'enzyme membranaire Nor catalyse la réaction de transformation du NO vers le N₂O. Un hyponitrite (N₂O₂²⁻) est formé avant la transformation en N₂O. Lors de cette transformation, une double liaison azote (N=N) est formée. Ce type de liaison chimique est très rare d'un point de vue biologique.

Deux variantes de NO réductases sont connues, soit la qNorB et la cNorB. La première variante s'associe à une hydroquinone (« quinol ») tandis que la seconde se lie à un cytochrome (Braker and Tiedje 2003). L'enzyme qNorB, aussi connue sous le nom de NorZ, se retrouve surtout chez les bactéries non reconnues pour la dénitrification telle *Neisseria* sp. Son rôle principal serait de détoxifier le NO pour les bactéries. L'enzyme qNorB est semblable à cNorB. Cependant, elle possède une extension en N-terminal d'environ 100 acides aminés qui remplace la sous-unité NorC de l'enzyme cNorB. Cette extension lie les hydroquinones et permet le transfert des électrons.

2.4.1.4 Réduction du N₂O

L'enzyme de la réduction du N₂O est plus instable que les autres réductases impliquées dans la dénitrification. Elle se retrouve dans le périplasme des bactéries et est inhibée par la présence d'acétylène. Elle produit une réaction très énergétique (N₂O-N₂) (-340 kJ/mol) propice à la génération de l'ATP. L'utilisation du N₂O comme accepteur d'électrons peut, à lui seul, supporter la croissance bactérienne. D'autres enzymes, telles la nitrogénase et la CO déshydrogénase ont également la capacité de réduire le N₂O (Jensen and Burris 1986; Lu and Ragsdale 1991).

Les gènes impliqués dans la production des enzymes de la dénitrification (*nap*, *nar*, *nir*, *nor* et *nos*) peuvent se retrouver autant dans le génome microbien que sur des plasmides. Les gènes de la dénitrification sont généralement dispersés dans les génomes microbiens. Lorsque ceux-ci se retrouvent sur un plasmide comme dans le cas de *Ralstonia eutropha*,

Rhodobacter sphearide et *Sinorhizobium meliloti*, cela favorise leur transfert horizontal vers d'autres microorganismes.

2.4.1.5 Régulation de la dénitrification

Plus de 50 gènes sont impliqués dans la dénitrification, autant pour la biosynthèse des enzymes que pour la régulation enzymatique ou génique (Zumft 1996). Les gènes de la dénitrification sont contrôlés principalement par le système FNR (fumarate nitrate réductase) et son homologue NNR (nitrite et oxide nitrique réductase). Ce dernier a notamment été retrouvé et étudié chez *Paracoccus denitrificans*. Ces systèmes agissent sur la régulation de l'expression des gènes des enzymes nitrite et NO réductases.

La présence d'oxydes d'azote respirables, tels le nitrate et le nitrite, induit la logistique nécessaire à la dénitrification dans les systèmes FNR et NNR. Ceux-ci réagissent également aux changements de la concentration d'oxygène (Van Spanning *et al.* 1999). La présence d'oxygène dissous dans le milieu inhibe par conséquent la respiration du nitrate. Les bactéries dénitrifiantes sont efficaces à des concentrations d'oxygène inférieures à 0,2 mg/L. Si la concentration d'oxygène est trop élevée, les bactéries qui sont facultatives utiliseront plutôt la phosphorylation oxydative pour leur respiration. La dénitrification est également ralentie dans des conditions de pH acide.

2.4.2 Bactéries dénitrifiantes

Quelques études ont exploré la diversité microbienne des bactéries présentes dans divers bioprocédés dénitrifiants allant des boues activées jusqu'aux bioréacteur de dénitrification. Les bactéries *Paracoccus denitrificans* et *Hyphomicrobium* sp. ont été fréquemment isolées lorsque la source de carbone utilisée était le méthanol (Sperl and Hoare 1971; Neef *et al.* 1996; Lemmer *et al.* 1997). De plus, des *Pseudomonas* sp. et des *Hydrogenophaga* sp. ont été identifiés dans plusieurs bioprocédés alimentés avec du méthanol.

Ginige *et al.* (2004; 2005) ont examiné la diversité microbienne d'un dénitrificateur alimenté avec du méthanol et un autre alimenté avec de l'acétate comme source de

carbone. Ils ont déterminé l'ensemble des bactéries présentes (cultivables et non-cultivables) par des techniques moléculaires. Pour le dénitrificateur au méthanol, il est ressorti que les bactéries affiliées aux Methylophylales (*beta*-Proteobacteria) étaient les plus actives dans la dénitrification tandis que pour la dénitrification avec acétate, des groupes microbiens affiliés aux Rhodocyclaceae, plus précisément aux *Thauera* sp. et aux *Dechloromonas* sp. (*beta*-Proteobacteria), étaient les plus abondants et les plus actifs. Le tableau 2.3 présente la liste des microflores qui ont été retrouvées dans divers bioprocédés de dénitrification.

Tableau 2-3 : Microflore retrouvées dans divers bioprocédés de dénitrification.

Type d'eau	Température (°C)	Bactéries retrouvées	Méthodes utilisées	Références
Eau usée	26	<i>Pseudomonas</i>	Culture	Blaszczyk <i>et al.</i> 1980
Eau usée	26	<i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i>	Culture	Blaszczyk <i>et al.</i> 1981
Eau usée	26	<i>Paracoccus</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas</i>	Culture	Blaszczyk <i>et al.</i> 1985
Enrichissement	28	<i>Hyphomicrobium</i> , <i>Paracoccus</i>	Culture	Claus and Kutzner 1985
Eau usée	28	<i>Hydrogenophaga</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Acidovorax</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Hyphomicrobium</i>	Culture et FISH	Neef <i>et al.</i> 1996
Eau usée	10-20, 28	<i>Hydrogenophaga</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Hyphomicrobium</i>	Culture	Lemmer <i>et al.</i> 1997
Eau usée	22	<i>Methylophilales</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Saprospiraceae</i>	Génothèques (SIP*) MAR- FISH**	Ginige <i>et al.</i> 2004

*SIP : "Stable isotope probing"
**MAR-FISH : Microautoradiographie-FISH

2.4.3 Marqueurs génétiques de la dénitrification

Plusieurs études ont utilisé des gènes impliqués dans la dénitrification comme marqueurs afin d'évaluer la diversité microbienne d'une population dénitrifiante. Taroncher *et al.* (2003) ont également développé une biopuce à ADN composée de gènes impliqués dans le cycle de l'azote afin d'évaluer certains environnements propices à la transformation des composés azotés. Avec l'utilisation de certains marqueurs génétiques, il est possible de subdiviser les gènes (*qnorB*, *cnorB* et *nosZ*) selon l'affiliation du type de microorganismes. Il demeure toutefois difficile d'associer les gènes retrouvés avec l'espèce bactérienne correspondante. Les études basées sur la métagénomique ainsi que la culture de nouveaux microorganismes pourraient, un jour, révéler ces informations.

Casciotti et Ward (2005) ont privilégié l'utilisation du gène *norB* afin d'évaluer la diversité génétique des organismes dénitrifiants et ce, pour deux raisons. Premièrement, il n'y a qu'un seul type de NorB contrairement aux autres enzymes de la dénitrification qui présentent souvent plusieurs types pour une même activité. Par exemple, il existe trois types de nitrates réductases et deux types de nitrites réductases. Deuxièmement, il est possible de dissocier les microorganismes nitrifiants (*Nitrosomonas*) des microorganismes dénitrifiants. Le sous-groupe *qnorB* est associé aux bactéries nitrifiantes et autres bactéries, tandis que le sous-groupe *cnorB* est associé aux bactéries dénitrifiantes reconnues (*Hyphomicrobium*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*).

Plusieurs travaux menés par Yoshie *et al.* (2001; 2004; 2005) ont montré que des *Halomonas* étaient responsables de la dénitrification d'un effluent métallurgique salin. Ces auteurs ont aussi noté que la diversité des gènes de la dénitrification diminuait avec l'augmentation de la salinité. Ils ont aussi montré la prédominance du gène de la nitrite réductase, *nirS* (CdNir) lorsque la salinité est élevée. Par ailleurs, Ginige *et al.* (2004) ont montré qu'un groupe de bactéries affiliées aux *beta*-protéobactéries utilisait le méthanol en condition dénitrifiante.

Différents marqueurs génétiques ont été utilisés dans les études de caractérisation des gènes de la dénitrification dans différents environnements. Le tableau 2-4 présente ces marqueurs, le contexte dans lequel ils ont été utilisés ainsi que les organismes retrouvés.

Tableau 2-4 : Études de caractérisation des gènes de la dénitrification dans différents environnements.

Type d'eau, de milieu	Température (°C)	Sources de carbone	Microorganismes	Méthode et marqueurs utilisés	Références
Effluent salé de métallurgie	20	Acétate	<i>Alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Marinobacter</i> , Non affiliés	nirK, nirS Culture	Yoshie <i>et al.</i> 2004
Effluent salé de métallurgie	20-30	Acétate	<i>Alcaligenes</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Gamma</i> - protéobactéries	Cultures Séquences de bande DGGE ADNr 16S	Yoshie <i>et al.</i> 2001
Sédiment marin		NA	<i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , Non affiliés	nirK, nirS Culture	Braker <i>et al.</i> 2000
Marge continentale	1-12	NA	<i>Pseudomonas</i> , <i>Marinobacter</i> , Non affiliés	nirK, nirS	Liu <i>et al.</i> 2003
Eau de mer anoxique	13	NA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , Non affiliés	nirS	Castro-Gonzalez <i>et al.</i> 2005
	ND		<i>Halomonas</i> , <i>Paracoccus</i> ,	qnorb et cnorB	Braker and

Tableau 2-4 : Études de caractérisation des gènes de la dénitrification dans différents environnements. (Suite)

Type d'eau, de milieu	Température (°C)	Sources de carbone	Microorganismes	Méthode et marqueurs utilisés	Références
			<i>Rhodobacter</i> , Non affiliés		Tiedje 2003
Sédiment marin	2-3	NA	<i>Pseudomonas</i> , Non affiliés	Culture nirK, nirS, napA, narG, nosZ	Nogales <i>et al.</i> 2002
Eau souterraine contaminée au nitrate et à l'uranium		NA	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Hyphomicrobium</i> <i>Rhizobiaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , Non-affiliés	nirK, nirS	Yan <i>et al.</i> 2003
Marge continentale atlantique et pacifique		NA	<i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i> , Non-affiliés	nosZ	Scala and Kerkhof 1999
Sol du Michigan		NA	<i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobiaceae</i> , <i>alpha</i> - protéobactéries Non affiliés	nosZ	Stres <i>et al.</i> 2004
Rhizosphère de légumes		NA	<i>Rhizobiaceae</i> , <i>Nitrosomonas</i>	nirK, nirS	Sharma <i>et al.</i> 2005

NA : non applicable. ND : Non déterminé.

2.4.4 Rôle des métaux traces dans la dénitrification

Certains métaux sont nécessaires à l'induction ou à la fabrication des constituants cellulaires responsables de la dénitrification. Le molybdène entre dans la formation d'un cofacteur de la nitrate réductase, soit la molybdoptérine. La fabrication des nitrites réductases, des NO réductases et des N₂O réductases nécessitent des atomes de fer et de cuivre. Dans certains cas, le cuivre peut être remplacé par des atomes de nickel et de zinc (Abraham *et al.* 1993). Les bactéries passant d'un mode de croissance en aérobiose vers la respiration des oxydes d'azote nécessitent une demande accrue en fer (Zumft 1997). Des études ont montré qu'une carence en cuivre produisait une accumulation de N₂O lors de la dénitrification (Cervantes *et al.* 1998; Granger and Ward 2003). Catalan-Sakairi *et al.* (1996; 1997) ont aussi déterminé que, même à de très faibles concentrations (ng/L), les métaux amélioraient le rendement d'un dénitrificateur fonctionnant avec de l'eau de mer.

2.5 Méthylotrophie

Le méthane (CH₄) et le méthanol (CH₃OH) sont des molécules couramment retrouvées dans l'environnement. La majeure partie du méthane produit provient de l'activité microbienne. Les bactéries le produisant se retrouvent notamment dans le rumen des herbivores, dans les marécages et dans les sédiments. Le méthanol est, quant à lui, un produit provenant de la déméthylation de molécules ou de l'oxydation du méthane. Les bactéries sont considérées méthylotrophes si elles peuvent croître avec des composés organiques constitués d'un seul atome de carbone (composés C1) tels le méthane et le méthanol.

Plusieurs bactéries méthylotrophes affectent le cycle de l'azote. Elles peuvent soit fixer l'azote, soit transformer le nitrate ou l'ammoniaque (Anthony 1982). Ces bactéries se retrouvent partout dans les environnements terrestres et aquatiques. Il est possible de les classer en deux catégories selon leur capacité à utiliser le méthane. Les méthanotrophes utilisent le méthane alors que les méthylotrophes, peuvent utiliser le méthanol et quelques composés méthylés (méthylamine ou autres). Seules les caractéristiques métaboliques du second groupe seront abordées ici.

2.5.1 Minéralisation du méthanol

La minéralisation du méthane et du méthanol en gaz carbonique s'effectue comme suit : le méthyle contenu dans le composé est généralement oxydé en formaldéhyde par des oxydases ou des déshydrogénases. Le formaldéhyde est ensuite oxydé en formate puis en gaz carbonique (Lidstrom 2001).

Le formaldéhyde et le formate sont toxiques pour les cellules s'ils sont produits en trop grande quantité. Les bactéries contournent ce problème en complexant le formaldéhyde avec une molécule organique tel le glutathion ou le tétrahydrométhanoptérine.

2.5.2 Assimilation du méthanol

Deux voies d'assimilation du méthanol sont connues: le cycle des sérines et le cycle de la ribulose monophosphate (RuMP). Le cycle des sérines est principalement associé aux *alpha*-protéobactéries tel *Hyphomicrobium*, *Methylosinus* et *Methylopila* tandis que le cycle du RuMP se retrouve autant chez les *beta* et *gamma*-protéobactéries que chez les bactéries à paroi gram positive (Lidstrom 2001). L'assimilation débute à l'étape du formaldéhyde et est très énergivore. Plusieurs bactéries méthylotrophes sont également capables de fixer le dioxyde de carbone afin de fabriquer des molécules difficiles à produire par l'assimilation du formaldéhyde.

2.6 Communauté microbienne

2.6.1 Bactéries non-cultivables

Il est bien connu que 60% à 90% des bactéries vivant dans le sol ou dans l'eau sont « non-cultivables ». Uniquement la moitié des 50 phylums bactériens connus possèdent au moins un représentant isolé. Dans l'environnement, il y a plusieurs réactions non conventionnelles qui peuvent être utilisées (phosphite, arsénite et métaux) par les microorganismes et qui sont rarement présentes dans les milieux de culture traditionnels (Leadbetter 2003). De plus, plusieurs des organismes définis comme étant « non-cultivables » nécessitent en fait plusieurs jours pour effectuer une seule division cellulaire. Une grande proportion des bactéries vivant dans l'environnement est soumise

à une faible concentration en matière organique. Ces conditions occasionnent une faible vitesse de croissance et un métabolisme lent. De plus, la majorité des bactéries nécessite des facteurs de croissance, des vitamines ou vit en symbiose avec d'autres organismes.

Différentes techniques basées sur ces carences ont été utilisées pour tenter de cultiver de nouveaux organismes difficilement cultivables. Kaeberlein *et al.* (2002) ont utilisé des chambres d'incubation munies d'une membrane de 0,03 μm incubées dans des aquariums. Cette approche misait sur la reproduction de l'habitat des microorganismes. La membrane laissait passer les facteurs de croissance nécessaires aux bactéries inoculées à l'intérieur de la chambre d'incubation. À l'aide de cette méthode, ils ont réussi à cultiver une bactérie apparentée à *Arcobacter nitrofigilis* (MSC2) ainsi qu'une autre espèce apparentée aux Sphingobactéries (MSC1). Rappé *et al.* (2002) ont utilisé un enrobage d'agar afin de cultiver des cellules individuelles. Ils ont ainsi pu isoler la bactérie la plus fortement représentée dans le phytoplancton soit SAR11. Cette bactérie serait également la plus abondante de la planète. Elle est maintenant connue sous le nom de *Pelagibacter unique*.

Glaeser et Overmann (1999) ont utilisé une stratégie originale pour isoler de nouvelles bactéries. Ces auteurs ont noté que certaines longueurs d'onde n'étaient pas utilisées par les bactéries photosynthétiques conventionnelles. Ils ont donc incubé des milieux sous un rayonnement de 900 à 950 nm. Cette approche leur a permis d'obtenir une nouvelle bactérie photosynthétique, *Roseospirillum parvum*, qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 911 nm.

2.6.2 Biofilm bactérien

Le concept de biofilm microbien a essentiellement été développé par Costerton qui, dans les années 90, l'a décrit comme étant courant et ubiquitaire dans l'environnement. Il a émis l'hypothèse que les biofilms (ou état sessile) était le mode de vie normal des microorganismes. Les biofilms se retrouvent entre autres sur les dents, dans les conduits de ventilation et d'eau ainsi que sur presque toutes les surfaces immergées. La matrice du biofilm est constituée d'eau, d'exopolysaccharides (EPS), de protéines et d'acides

nucléiques (Costerton *et al.* 1995). Elle permet aux bactéries de mieux résister aux conditions adverses de l'environnement telles la dessiccation, la présence d'antibiotique et même la prédation des protozoaires. La structure du biofilm permet l'entrée de nutriments et l'évacuation des déchets. Au sein du biofilm, les bactéries communiquent entre elles par des systèmes de communication intercellulaire propre à chaque groupe microbien. L'état métabolique des microorganismes est tout à fait différent de celui observé en culture *in vitro* et peut varier au sein même du biofilm. Cela peut, entre autres, affecter la capacité de cultiver des organismes directement issus de biofilms, car les bactéries doivent s'adapter à leur nouvel environnement.

2.6.3 Classification et phylogénie

La systématique se veut un outil permettant de refléter le degré de rapprochement (parenté) des différents taxons. Par le passé, la systématique des microorganismes suscitait peu d'intérêt en raison de la difficulté à déterminer la nature ou à identifier une souche microbienne. La première tentative de classification remonte à Cohn, 1872. Cette classification séparait les bactéries en six groupes basés sur la morphologie des organismes. Gram a permis de subdiviser ces groupes bactériens selon la morphologie et le type de membrane grâce à la coloration qui porte son nom. Au début du 20^e siècle, cette classification a été modifiée en fonction du nombre sans cesse croissant de nouvelles bactéries. Un nouveau système a alors été basé sur la physiologie, le métabolisme et la pathogénicité des microorganismes. C'est cette classification qui est à la base de la première version du « Bergey's manual of determinative bacteriology » publié entre 1973 et 1984.

La venue de la génétique dans la classification depuis 1989, tel que proposé par De Long et al. (1989), a complètement restructuré la façon de classer les bactéries. La reclassification nécessite souvent la redéfinition des caractéristiques d'un groupe microbien ainsi que des changements dans la nomenclature. Cette nouvelle méthode de classification basée sur l'homologie de séquence du gène 16S ribosomal est plus fiable, objective et stable. Les paramètres physiologiques demeurent cependant

complémentaires à cette nouvelle approche dans la caractérisation et la classification des bactéries.

La définition d'une espèce bactérienne est fort complexe et souvent contestée et ce, depuis les travaux de Charles Darwin au 19^e siècle. La description d'un taxon se base sur le principe que tous les membres d'un taxon doivent provenir d'un ancêtre commun et, par conséquent, présenter des traits et des caractéristiques de cet ancêtre. La présente définition, telle que proposée par Rossello-Mora et Amann (2001), est arbitraire : une espèce bactérienne est une catégorie circonscrite de souches microbiennes ayant un haut degré de similarité dans plusieurs paramètres indépendants. Il est à noter que la validation des espèces bactériennes n'est entrée en vigueur que dans les années 1980 afin de standardiser la classification des souches non médicales (Skerman *et al.* 1980).

La délimitation des genres et des espèces bactériennes est principalement dictée par les homologies génétiques (gène 16S de l'ARN ribosomal (ADNr 16S)), génomes et réassociation ADN/ADN). Pour la classification, une homologie supérieure à 98% du gène 16S ribosomal donne une bonne indication de l'appartenance d'une souche à une espèce donnée. Cependant, si l'homologie se situe sous les 98%, la même souche s'apparenterait à un niveau supérieur de classification, tels le genre, la famille ou l'ordre.

Une autre indication de l'appartenance de deux souches à une même espèce consiste à effectuer une réassociation ADN-ADN entre les deux souches. Si la réassociation est supérieure à 70%, on en conclut que les deux souches sont de la même espèce. Selon deux études, aucune bactérie présentant une homologie du gène 16S ribosomal inférieure à 97% (Stackebrandt and Goebel 1994) ou 98% (Rossello-Mora and Amann 2001) ne montre une hybridation ADN-ADN supérieure à 60%. Par contre, il peut arriver que des espèces montrant une homologie de 99,8%, voire même de 100%, soient considérées comme des espèces différentes si la valeur de l'hybridation de leur génome est inférieure à 70%. C'est notamment le cas chez les bactéries du genre *Aminobacter* qui ont 99-100% d'homologie du gène 16S, mais des valeurs variant entre 15 et 66% pour l'hybridation ADN-ADN (Kampfer *et al.* 2002; McDonald *et al.* 2005). Il existe des exceptions à ces

règles : bien que leur 16S soit identique, les trois espèces *Bacillus anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis* sont maintenues distinctes à des fins médicales; les souches pathogènes pour l'humain ayant les gènes *toxA* et *toxB* sont décrites comme étant des *B. anthracis*; les entomopathogènes, produisant un cristal protéique, comme étant *B. thuringiensis*; et, les autres comme étant *B. cereus*. Dans le cas de ces trois espèces, l'hybridation ADN/ADN montre, dans certains cas, des proportions supérieures à 70% entre les différentes classes et inférieures à 70% au sein d'une même classe (Seki *et al.* 1978; Nakamura and Jackson 1995).

La venue du séquençage du génome entier suscite des interrogations puisque plusieurs souches d'une même espèce (soit >97% d'homologie de l'ADNr 16S et 70% de réassociation ADN-ADN) peuvent en fait n'avoir que 35% des gènes communs à toutes les souches et plus de 25% de divergence entre deux souches (Stackebrandt *et al.* 2002).

Konstantinidis et Tiedje (2005) ont proposé une méthode de délimitation des espèces basée sur les génomes entiers. Cette méthode compare tous les gènes hautement conservés entre deux génomes. Par cette méthode, ils ont déterminé qu'une identité moyenne de nucléotide (average nucleotide identity : ANI) de 94% indiquait une même espèce microbienne. Ce pourcentage est équivalent à une hybridation ADN-ADN de 70%. Cette technique semble bien mais peu applicable pour le moment puisqu'elle requiert la séquence entière du génome. À long terme, elle devrait permettre une meilleure classification des organismes. D'autres méthodes, tel le polymorphisme d'amplification aléatoire de l'ADN (RADP) et le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP), peuvent permettre de regrouper ou de séparer des microorganismes proches phylogénétiquement.

Le choix de nouveaux critères pour la délimitation des espèces doit répondre aux exigences suivantes : le critère doit être quantitatif; il doit être analysable statistiquement; et il doit être en harmonie avec la réassociation ADN-ADN. Parmi les méthodes prometteuses, l'utilisation de plusieurs marqueurs génétiques en plus du 16S ADNr tel *hsp60*, *recA*, *dnaK* semble la méthode de choix. Un bon marqueur phylogénétique doit

être avoir une fonction essentielle et être présent chez toutes les bactéries. Il doit aussi être suffisamment long afin de contenir un minimum d'informations et il doit être bien conservé pour pouvoir être amplifié et comparé.

Gupta (2005) utilise d'ailleurs différents marqueurs moléculaires afin d'établir le profil évolutif des bactéries. L'apparition de délétion et d'insertion dans ces marqueurs montre un point où il y a eu divergence entre deux groupes microbiens. Cette approche permet de déterminer des critères pour l'appartenance à un groupe bactérien. Par exemple, l'insertion de huit acides aminés dans l'ATP synthétase-alpha suggère une appartenance aux *alpha*-protéobactéries.

2.6.4 Méthodes d'analyse d'une communauté microbienne

2.6.4.1 Génothèque 16S ribosomale et estimation de la diversité

Il existe plusieurs méthodes autres que la culture pour étudier la diversité microbienne d'un échantillon.

Une première méthode, basée sur l'amplification par PCR, vise l'identification des espèces présentes par la fabrication d'une génothèque (banque de clones). Le criblage de cette banque permet de sélectionner les séquences provenant d'organismes différents puis d'affilier le gène (ADNr 16S ou gènes cataboliques) à l'organisme correspondant. Lane *et al.* (1985) ont proposé cette approche et la première utilisation en a été faite par Giovanonni *et al.* (1990). Depuis, cette méthode a été utilisée afin de caractériser différentes populations d'eucaryotes (Stoeck and Epstein 2003), de bactéries (Hoshino *et al.* 2005), d'archéobactéries (Kimura *et al.* 2005) et même de virus (Chen *et al.* 1996). L'information acquise peut être utilisée pour estimer la diversité microbienne grâce à l'utilisation d'algorithmes mathématiques tels Chao1, Jackknife et la raréfaction (Hughes *et al.* 2001).

Une deuxième manière d'estimer la diversité consiste à établir un profil de population. Parmi les méthodes, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient dénaturant (DGGE) d'urée et de formamide et le polymorphisme de longueur des fragments de

restriction terminaux (T-RFLP) sont les plus fréquemment utilisées. Elles permettent de comparer les flores microbiennes de différents échantillons. Elles sont également applicables à divers gènes et à divers groupes d'organismes.

2.6.4.2 Hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

L'hybridation *in situ* permet la visualisation de l'organisation spatiale d'un complexe microbien. Elle permet de connaître la composition réelle d'un échantillon sans égard à la cultivabilité des organismes.

Le principe de l'hybridation *in situ* consiste à hybrider un court oligonucléotide, généralement de 15-25 nucléotides de longueur, ayant une séquence complémentaire à sa cible. Ces sondes oligonucléotidiques sont généralement couplées à une molécule fluorescente nommée fluorochrome afin de pouvoir les localiser dans l'échantillon.

La cible la plus couramment utilisée est l'ARN ribosomal (sous-unités 16S et 23S pour les procaryotes ou 18S et 28S chez les eucaryotes) puisque les microorganismes actifs peuvent en contenir plusieurs milliers de copies. De plus, puisque les sous-unités d'ARN ribosomales sont utilisées comme marqueur en taxonomie microbienne, on retrouve plus de 300 000 séquences des différents groupes microbiens, autant procaryotes qu'eucaryotes, enregistrées dans les banques de données (GenBank, EMBL). La présence de séquences hautement conservées flanquée de séquences variables permet la conception de sondes oligonucléotidiques ciblant divers niveaux taxonomiques (souche, espèce, genre ou groupe). Loy *et al.* (2003) ont instauré une nomenclature pour le nom de ces sondes ainsi qu'une banque des sondes publiées (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/intro.asp>).

La résolution de l'hybridation *in situ* est fonction de l'activité cellulaire des microorganismes, de l'accessibilité de la séquence cible et du fluorochrome utilisé. Plus il y a de ribosomes, plus le signal récupéré sera abondant. Des études ont été effectuées sur l'accessibilité des différentes régions de l'ARN ribosomal 16S chez une eubactérie, une archaebactérie et un eucaryote (18S) (Fuchs *et al.* 1998; Behrens *et al.* 2003). Elles

ont montré certains repliements de la molécule appelés hélices. Certaines hélices, telles les hélices 4, 5, 6, 10 et 14, sont très accessibles tandis que d'autres hélices 18, 22, 26 et 37 ne le sont pas. L'inaccessibilité peut être due, entre autres, à la présence de protéines ribosomales, à la localisation intérieure des séquences dans le ribosome ou à une fixation au paraformaldéhyde trop importante des bactéries.

Afin d'améliorer l'intensité du signal, plusieurs modifications peuvent être apportées soit l'utilisation d'oligonucléotides auxiliaires (« oligo-helper ») ou de plusieurs sondes ciblant un même organisme, l'amplification du signal par un rapporteur (CARD ou TSA) ou, encore, un marquage avec plusieurs molécules fluorescentes sur une même sonde (marquage en 5' et 3'). Récemment, Yilmaz et Noguera (Yilmaz and Noguera 2004) ont montré que les sondes ayant une énergie libre de Gibbs (ΔG) inférieure à -13 kcal/mol produisaient une meilleure fluorescence.

Grâce à l'hybridation *in situ*, on a pu analysés et caractérisés les différents types de bactéries contenues dans: des biofilms oraux (Thurnheer *et al.* 2004), des boues activées (Wong *et al.* 2004), des procédés de nitrification (Okabe *et al.* 2005), des procédés de déphosphatation (Zeng *et al.* 2003) et de biorémediation, et même des bactéries dans des tissus humains tels la peau ou la vessie.

2.6.5 Étude de fonctionnalité d'une communauté microbienne

L'association entre un microorganisme et son activité métabolique dans un échantillon complexe est très difficile à établir. Il y a quelques années encore, seuls les microorganismes cultivables pouvaient être étudiés. Heureusement, les méthodes d'analyse des complexes microbiens se sont raffinées et permettent maintenant l'étude fonctionnelle des organismes, indépendamment de leur cultivabilité. Ces méthodes, apparues en 1999, sont la microautoradiographie (MAR), le marquage par isotope stable (SIP), l'isotope « array », ainsi que l'utilisation de microélectrode. Les deux premières méthodes sont décrites plus en détail ci-après.

2.6.5.1 *Microautoradiographie (MAR ou STAR)*

La microautoradiographie consiste en l'incubation de matériel biologique avec un substrat marqué avec un radio-isotope tel ^{14}C , ^{32}P et ^3H pour un court laps de temps. En cours de croissance, les microorganismes assimilent le substrat et incorporent le radio-isotope dans les constituants cellulaires. Par la suite, la radioactivité incorporée par les microorganismes peut être détectée par autoradiographie ou avec un compteur à scintillation.

La technique de l'autoradiographie existe depuis de nombreuses années. Initialement, la résolution était de l'ordre du millimètre. L'autoradiographie a été suggérée par Brock et Brock (1966) pour des études d'écologie microbienne. L'utilisation d'une émulsion plutôt que d'une membrane a amélioré la résolution, puisque cette dernière est fonction de la distance entre la matrice et le radio-isotope. L'utilisation d'une émulsion liquide avec des cristaux d'argent microscopiques (diamètre inférieure à un μm) couplée à une coloration ou encore à la microscopie électronique permet d'associer un microorganisme à une fonction dans un échantillon. Plus récemment, Lee *et al.* (1999) et Ouverney et Fuhrman (1999) ont utilisé en concomitance la microautoradiographie et l'hybridation *in situ* fluorescente afin de suivre l'incorporation de différentes sources de carbone. Grâce à la combinaison de ces deux techniques (MAR+FISH), l'activité d'un microorganisme a pu être associée à une fonction particulière dans le complexe microbien (sol, biofilm). Le signal de fluorescence identifie le microorganisme tandis que le signal de microautoradiographie indique s'il était actif dans les conditions expérimentales. Le MAR-FISH a été utilisé avec succès pour l'étude de procédés de nitrification (Gieseke *et al.* 2005; Okabe *et al.* 2005), de dénitrification (Lee *et al.* 1999; Ginige *et al.* 2004) de déphosphatation (Chua *et al.* 2004; Kong *et al.* 2005) et de boues activées (Nielsen *et al.* 2002).

2.6.5.2 *Marquage à isotope stable (Stable isotope probing : SIP)*

Boschker *et al.* (1998), Hinrichs *et al.* (1999), et Radajewski *et al.* (2000) ont proposé l'utilisation des isotopes stables à des fins d'écologie microbienne. Cette technique consiste à cibler l'ADN ou l'ARN des microorganismes ayant incorporés un isotope

stable (^{13}C , ^2H , ^{15}N). La séparation des brins d'ADN légers ^{12}C et lourds ^{13}C (typiquement) s'effectue par centrifugation dans un gradient de chlorure de césium. Les brins d'ARN sont, quant à eux, séparés sur un gradient de trifluoroacétate de césium. Cette technique récente est de plus en plus utilisée en écologie microbienne pour déterminer les microorganismes actifs selon les conditions du milieu ou le substrat donné. Elle permet de recueillir de l'information sur la fonction des microorganismes d'un habitat sans la nécessité de les cultiver en culture pure. L'utilisation de l'ADN comme cible comporte des avantages et des inconvénients par rapport à l'ARN. Le marquage de l'ADN nécessite une incubation plus longue (habituellement de plus de 20 jours) en présence de l'isotope stable, mais sa récupération et sa séparation sont beaucoup moins fastidieuses.

L'incubation avec l'isotope stable est également plus longue en comparaison avec la microautoradiographie puisque une petite partie de l'isotope (contenue dans l'ADN) est récupérée. Les protéines, lipides et autres constituants de la cellule peuvent aussi être ciblés pour fin d'analyse. Le marquage avec isotope stable a notamment été utilisé pour l'étude des populations de bactéries méthylophiles (Radajewski *et al.* 2002; Ginige *et al.* 2004) et de bactéries dégradant le pentachlorophénol (Mahmood *et al.* 2005).

Le SIP et la microautoradiographie sont maintenant couramment utilisés pour étudier les complexes microbiens et ce, de façon complémentaire. Le marquage à isotope stable sert à déterminer les bactéries présumément actives alors que la microautoradiographie permet de confirmer le rôle associé à un groupe d'organismes. La principale limite de ces méthodes est la disponibilité et le coût des substrats radio-marqués ou isotopiques.

2.7 Microscopie

2.7.1 Fluorochromes (Fluorescence)

Les fluorochromes sont des molécules chimiques ou biologiques ayant la propriété d'absorber un rayon d'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée puis de le ré-émettre à une longueur d'onde plus longue et donc moins énergétique. Ce phénomène est régi par la loi de Stokes (Gilbault 1990). Chaque fluorochrome possède un spectre

d'excitation et d'émission qui lui est propre. Ce spectre sera plus large (évasé) ou plus étroit selon le cas. Plus les spectres sont étroits, plus il est possible de récupérer des signaux différents sans chevauchement de signal. En microscopie, la limite est actuellement de quatre signaux différents à la fois. Par exemple, le DAPI (bleu), la fluorescéine (vert), le CY3 (orangé) et le CY5 (rouge lointain) peuvent être utilisés simultanément sans observer de chevauchement. L'excitation de ces molécules se fait dans une grande variété de longueurs d'onde allant de l'ultraviolet à la limite de l'infrarouge (tableau 2-5). La fluorescence émise peut être récupérée par des tubes photomultiplicateurs (PMT) ou par des caméras CCD. Les fluorochromes peuvent soit se fixer à l'ADN ou l'ARN, soit être incorporés à des oligonucléotides, des protéines ou des « quantum dot ». Des fluorochromes naturels se retrouvent également dans les cellules comme par exemple le NADH et la chlorophylle. La fluorescence des molécules est due à des groupements appelés chromophores. Le noyau benzénique est le chromophore le plus fréquemment retrouvé. Des colorants à ADN sont utilisés comme contre-coloration. Il en existe plusieurs selon la longueur d'onde désirée (tableau 2-6).

Tableau 2-5 : Exemples de fluorochromes utilisés pour marquer des sondes oligonucléotidiques.

Fluorochrome	Excitation maximale (nm)	Émission maximale (nm)	Couleur de fluorescence
FITC	490	520	Vert
Alexa488	495	519	Vert
CY3	552	570	Orangé
TRITC	550	573	Orangé
CY5	649	666	Rouge

Tableau 2-6: Exemple de colorants fluorescents utilisés pour colorer les cellules microbiennes.

Colorant	Excitation maximale (nm)	Émission maximale (nm)	Couleur de fluorescence	de Perméable à la membrane	Cible
Dapi	359	461	Bleu	Oui	ADN (A-T)
YOYO-1	491	508	Vert-Jaune	Non	ADN, ARN
TOTO-3	642	660	Rouge	Non	ADN, ARN
7AAD	546	647	Rouge	Oui	ADN
Iodure de propidium	370 et 560	631	Rouge	Non	ADN
Acridine orange	502 et 460	526 et 650	Vert et Rouge	Oui	ADN et ARN
Calcofluor	395	440	Bleu	NA	Protéine, EPS*

*EPS : Exopolysaccharide

2.7.2 Microscope en épifluorescence

Le principe de la microscopie en épifluorescence consiste à exciter un échantillon marqué avec une sonde fluorescente puis à recueillir la lumière fluorescente émise. Des filtres d'émission et de détection sont installés de façon à exciter le fluorochrome dans un intervalle de longueurs d'onde précis et de visualiser le signal désiré. Contrairement à la microscopie conventionnelle, le faisceau lumineux passe en premier lieu dans l'objectif. Seule la fluorescence émise par l'échantillon est détectée laquelle provient de la ré-émission du signal par l'échantillon.

Les principales sources lumineuses utilisées sont les lampes à arc au mercure, au xénon et tungstène-halogène (Lichtman and Conchello, 2005). La lampe au mercure possède plusieurs pics d'émission soit : 313, 334, 365, 406, 435, 546, 578 nm. La lampe à arc au xénon offre une plus grande uniformité dans le spectre d'émission (250-1000 nm) et offre en sus une durée de vie plus longue. La troisième source d'émission, la lampe tungstène-

halogène, donne une faible luminosité dans l'ultra-violet, mais elle est très brillante dans les autres longueurs d'onde (350-1000 nm).

La microscopie en épifluorescence s'applique uniquement à des échantillons minces (cellule ou coupe mince). Les échantillons plus épais produisent une fluorescence diffuse qui provient du signal hors foyer.

2.7.3 Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

La microscopie confocale à balayage laser se distingue de la microscopie en épifluorescence par deux aspects. Premièrement, la source d'excitation des fluorochromes est attribuable à une source laser plutôt qu'à une lampe. Le laser a la particularité d'émettre un signal à une longueur d'onde précise (tableau 2-7). Deuxièmement, la dimension de la source lumineuse ainsi que celle du détecteur sont réduites à un seul point (figure 2-2).

Tableau 2-7: Sources lasers utilisées pour la microscopie confocale.

Source d'excitation	Ligne d'excitation (nm)	Fluorochrome compatible
UV-Ar	351, 364	DAPI, Hoechst
Kr-Ar	488	FITC, YOYO-1, GFP
Kr-Ar	568	CY3
He-Ne	543	TRITC, CY3
He-Ne	633	CY5
Diode rouge	637	CY5, TOTO-3

Figure 2.2: Schéma d'un microscope confocal à balayage laser (Nikon: <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>).

L'image de la figure a dû être retirée en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

La figure peut être vue à l'adresse URL suivante:

<https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocal-concepts>

La figure peut être également vue dans la version imprimée du mémoire selon les directives de l'éditeur :

Your student has our permission to use the figure translated into French. You do not, however, have permission to post this image on a website

Le microscope confocal à balayage laser permet de faire du sectionnement optique ce qui élimine le signal hors foyer. Cette fonction permet d'analyser des échantillons plus épais qu'avec la microscopie standard sans y perdre en résolution. Selon la transparence de l'échantillon, la pénétration maximale est de 10 à 100 μm de profondeur (Semwogerere and Weeks, 2005). Ce type de microscopie permet l'étude de biofilms intacts et de structures en trois dimensions. L'acquisition des images est effectuée à l'aide d'un tube photomultiplicateur (PMT) qui amplifie le signal de fluorescence détecté.

Une nouvelle forme de source d'excitation a été développée récemment. Il s'agit de la technique dite à deux photons (ou multiphotons) qui consiste à exciter le fluorochrome à l'aide de deux photons de longueur d'onde supérieure soit l'équivalent d'une énergie dégagée par un photon de longueur d'onde deux fois moindre. Cette technique permet

d'exciter uniquement les molécules se trouvant au foyer en plus de réduire considérablement la formation de radicaux libres et le « photobleaching ». De plus, une plus grande proportion de la fluorescence émise est récoltée puisque le trou sténopéïque (« pinhole ») du détecteur n'est plus nécessaire. La source laser de ce type de microscopie est le titane-saphir.

3. CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

3.1 Article 1

3.1.1 Mise en contexte de l'article 1

Très peu d'études ont porté sur les bioprocédés de dénitrification en eau de mer. Les conditions d'opération du procédé de dénitrification acheté par le Biodôme de Montréal ont été examinées dans le cadre de la maîtrise en ingénierie d'Isabelle Sauvé inscrite à l'École Polytechnique de Montréal. Ces études ont montrées que le système de dénitrification marin du Biodôme produisait peu d'activité malgré plusieurs modifications d'ordre technique. Une des hypothèses découlant des travaux d'Isabelle Sauvé était que les conditions du milieu ne favorisaient pas la dénitrification.

Quelques essais d'amélioration du procédé de dénitrification ont été effectués, notamment l'ajout de métaux traces en fiole ou dans le système de dénitrification. La carence en métaux traces a été suspectée, car l'eau de mer est pauvre en métaux. De plus, l'ozonation est reconnue pour appauvrir davantage l'eau en métaux. Qui plus est, les enzymes de la dénitrification nécessitent plusieurs cofacteurs métalliques afin de les rendre fonctionnelles. Les métaux testés lors de ces travaux étaient le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène. Ceux-ci ont permis d'obtenir une dénitrification plus efficace de la microflore dénitrifiante sans augmentation nette du coût.

3.1.2 Contribution de l'étudiant à l'article 1

Les travaux présentés dans cet article ont tous été effectués par l'étudiant sous la supervision du Dr Parent et du Dr Villemur. Ceux-ci ont également contribué à la rédaction et à la révision de l'article. L'analyse des métaux traces dans l'eau du Biodôme de Montréal a été préparée puis envoyée pour son analyse chez PSC service analytique de Montréal.

3.1.3 Article 1

ADDITION OF TRACE METALS INCREASES DENITRIFICATION RATE IN CLOSED MARINE SYSTEMS

Normand Labbé¹, Serge Parent^{2M*} and Richard Villemur¹

¹ INRS - Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval H7V 1B7, Canada

² Research and Development Division, Biodôme de Montréal, 4777 Pierre-De Coubertin, Montreal H1V 1B3, Canada

* Author to whom all correspondence should be addressed. E-mail: sparent@ville.montreal.qc.ca

Key words: denitrification, seawater, trace metals, iron, closed systems

Short title: Trace metals and denitrification in seawater

Cet article a été publié dans la revue *Water Research* (2003), 37(4):914-20.

3.1.3.1 *Résumé*

Dans cet article, nous avons examiné l'effet de métaux traces tel le fer, le manganèse, le cuivre, le zinc et le molybdène sur la filière de dénitrification du Biodôme de Montréal. Deux dosages des cinq métaux ont été testés sur les bactéries dénitrifiantes prélevées dans le dénitrificateur. La capacité de dénitrification a été vérifiée par des cultures de 250 mL dans de l'eau de mer artificielle. Le faible dosage a mené à une augmentation de la dénitrification de l'ordre de 20% tandis que le dosage plus élevé a montré une amélioration de 250%. Durant l'essai, la croissance bactérienne a été similaire dans toutes les conditions suggérant que seule l'activité a été affectée. Lorsque les métaux ont été testés séparément, le fer a montré un effet similaire à l'essai impliquant tous les métaux. Lorsque le fer a été ajouté conjointement avec le manganèse, l'effet est légèrement meilleur que lors de l'ajout de tous les éléments traces.

Nous avons également testé l'addition de fer, de manganèse et de cuivre dans l'unité de dénitrification du Biodôme de Montréal. Le haut dosage en métaux traces a montré une augmentation de 250% de l'activité de dénitrification, laquelle est passée de 200 g N-NO_x/j à plus de 700 g N-NO_x/j. Nos résultats ont montré que l'ajout de métaux traces est crucial pour une bonne activité de dénitrification en eau de mer.

3.1.3.2 *Abstract*

We investigated the effect of trace metals (Fe, Mn, Cu, Zn and Mo) on the denitrification unit at the Montreal Biodome. Two dosages of the five trace metals were tested on a denitrifying bacterial population which was extracted from the denitrification unit and cultured in 250 mL chemostats with artificial seawater. The low dosage showed a 20% increase in the denitrification rate whereas the high dosage had a more pronounced effect with a 250% increase. No increase in bacterial growth was observed, suggesting that the trace metals had an effect on the denitrification activity. When the trace metals were tested separately, only iron had a significant effect similar to the increase in the denitrification rate observed when the five trace metals were added. The combination of Fe and Mn caused a small but significant increase compared to the five trace metals. We

then tested the effect of adding Fe, Mn and Cu to the denitrification unit at the Montreal Biodome. A high dosage of these trace metals showed a 250% increase in the denitrification rate, which went from 200 g NO_x-N/d to 700 g NO_x-N/d. Our results showed that the addition of trace metals is crucial for denitrification activities.

3.1.3.3 Introduction

The concentration of nitrate in marine environments is rarely higher than 1 mg N/L (Yeats 1990). However, it reaches more than 50 mg NO₃-N/L in marine aquariums where seawater is recycled in a closed circuit (Grguric *et al.* 2000; Parent and Morin 2000). This level can be toxic for marine ecosystems. Nitrates are primarily produced by bacteriological nitrification of excreted ammonium nitrogen (Strotzman and Windecker 1997). The treatment of seawater with ozone provides an additional oxidation pathway from ammonium to nitrate (Honn and Chavin 1976). Performing regular water changes is impractical for large inland aquariums because the tank size makes it operationally difficult to replace a significant portion of the water. In addition, the expense of preparing large volumes of artificial seawater in locations with no available seawater can be prohibitive (Grguric 1990).

Biological denitrification was shown to be an efficient method for controlling nitrate concentrations in ground water (Gomez *et al.* 2000), drinking water (Hollo and Czako 1987; Fuchs *et al.* 1997) and wastewater (Metcalf and Eddy inc 1991; Lemmer *et al.* 1997). Basically, denitrifying bacteria reduce nitrate to gaseous nitrogen via their respiratory chain (Zumft 1997).

Few studies on denitrification in closed marine systems have been conducted. Although denitrification can be achieved, the process generally decreases as the salinity of the water increases (Yang *et al.* 1995; Glass and Silverstein 1999; Intrasungkha *et al.* 1999). It is believed that the conditions are not optimal for denitrifying microorganisms in such environments. However, Van der Hoek *et al.* (1987) observed a significant increase in the denitrification rate in water over a period of three weeks after 25 g/L of NaCl was added. Grguric *et al.* (2000) studied the performance of a commercial denitrification unit, similar

to that of the Montreal Biodome (see below), at the New Jersey State Aquarium. During 100 days of operation, the nitrate level of the 2,900 m³ tank decreased by 25% from 133 mg NO_x-N/L to 98 mg NO_x-N/L. Catalan-Sakairi *et al.* (1996) obtained high denitrification efficiency in water containing 30 g/L of NaCl, by using a new porous cellulose carrier to denitrify artificial waste water. They also showed that denitrification was not completed until a trace element solution, containing iron, molybdenum, manganese and copper, was added.

Bruland *et al.* (1991) found that iron and other bioactive trace metals, such as copper, manganese and zinc were often limiting factors in oceanic waters. They showed that, as a result, these trace metals influence the biological production of phytoplankton, species composition and trophic structure of marine systems.

The Montreal Biodome operates a large closed marine system referred to as the St. Lawrence Mesocosm (SLM; Parent and Morin, 2000). A denitrification unit was integrated into the SLM life support system in 1998. For three years, the unit was operating below capacity and was removing less than 0.2 kg N/d rather than 1.2 kg N/d as predicted by the manufacturer based on the SLM condition. The nitrate concentration decreased from 180 mg NO₃-N/L in 1998 to 135 mg NO₃-N/L in 2001, instead of the 20 mg NO₃-N/L it should have reached, even though 16-18% of the water was replaced annually with fresh artificial seawater. We therefore decided to test the effect of adding trace metals on the denitrification performance, first in lab-scale assays and second in a full-scale assay on the SLM denitrification unit at the Montreal Biodome.

3.1.3.4 *Materials and methods*

3.1.3.4.1 *Lab-scale assays*

Five trace metals were tested in lab-scale assays: iron ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Fisher, Fair Lawn, NJ, USA), zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Anachemia, Montreal, QC, Canada), copper ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Fisher, Fair Lawn, NJ, USA), molybdenum ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; American Chemicals, Montreal, QC, Canada) and manganese ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Fisher, Fair Lawn, NJ, USA). All salts were reagent grade or ACS. The ratio of each trace metal was based on Catalan-Sakairi *et al.* (1996).

Lab-scale assays were done in triplicate, at room temperature, using 250 mL closed chemostats, with a working volume of 200 ml freshly prepared seawater. Preliminary results showed that trace metals had the same effect on both newly prepared and 6 years old seawater. The bacterial culture medium was composed of 30 g/L artificial seawater (Instant Ocean® salt mix; Aquarium systems, Mentor, OH, USA), 400 mg NaNO_3 -N/L, 18 mg KH_2PO_4 -P/L and trace metals as described in Table 3-1. The pH was adjusted to 8.0 and the culture medium was autoclaved. At $t=0$, each chemostat was inoculated with bacterial biomass extracted from 25 EcoLink® carriers (EcoMat Inc, Hayward, CA, USA) of the SLM denitrification unit and 0.5 ml of 50% methanol/water solution (v/v; VoPac, Richmond, BC, Canada) was added. Each chemostat was then made anoxic by filling it with helium gas, and was capped. Water samples (5 mL) were taken every 12 h for 96 h and were used to determine denitrification activity and bacterial growth.

Table 3-1: Concentrations of trace metals ($\mu\text{g/L}$) in laboratory-scale assays.

Test	Fe	Cu	Zn	Mo	Mn
Artificial seawater	2	2	2	3	1
High dosage of trace metals	181	11	11	199	78
Low dosage of trace metals	20	3	3	23	9
Fe	181	2	2	3	1
Mn	2	2	2	3	78
Fe + Mn	181	2	2	3	78
Cu	2	11	2	3	1
Zinc	2	2	11	3	1
Mo	2	2	2	199	1
Cu + Zn + Mo	2	11	11	199	1

3.1.3.4.2 Full-scale assay in the SLM denitrification unit

The SLM contains 3,250 m³ of cold (10°C) artificial seawater (28-30‰). It comprises two life support systems (LSS) and four pools, as described by Parent and Morin (2000). In 1998, a denitrification unit (EcoMat Inc, Hayward, CA, USA), operating in a parallel circuit, was added to the main LSS. It consists of a 1 m³ deaeration tank, a 1 m³ denitrification reactor, a foam fractionator and an overflow tank. The deaeration tank is a fixed-bed reactor and is filled with 9 cm NuPac® plastic packings (Lantec Products, Agoura Hill, CA, USA). The reactor is a fluidized-bed type and contains 0.3 m³ of 8 mm EcoLink® macro-porous cellulose carriers. Both the deaeration tank and reactor are methanol-fed.

The assay with the SLM denitrification unit was carried out for 42 days with incoming water at pH 7.8-7.9, 28-29‰ salinity, and 135 mg NO₃-N/L. We chose to add the two trace metals that had a significant effect on denitrification in our lab assays (iron and manganese) plus copper which had an effect on denitrification elsewhere (Catalan Sakairi *et al.* 1996; Granger and Ward 2003) and was needed to maintain a natural Fe:Mn:Cu

ratio. The unit was operated with a water flow of 5-6 L/min and at a water temperature between 16 and 20°C. Water temperature was higher in the denitrification unit than in the SLM because of the heat generated by bacterial activity and the recirculation pump. A methanol solution (50% v/v) was added to the deaeration tank at 1.5 mL/min and to the denitrification reactor at 4.5 mL/min. For 13 days, no trace metals were added (Phase 1). Then, twice a day for five days, a trace metal solution, containing 30 mg FeSO₄·7H₂O and 13 mg MnSO₄·4H₂O was added to the deaeration tank (Phase 2), in order to maintain a minimum concentration of 11 µg/L of iron and 3 µg/L of manganese. On day 19, trace metals were increased by adding 370 mg FeSO₄·7H₂O, 130 mg MnSO₄·4H₂O and 20 mg CuSO₄·5H₂O twice a day in order to maintain concentrations of 150 µg Fe/L, 30 µg Mn/L and 10 µg Cu/L (Phase 3).

3.1.3.4.3 Analytical methods

All analyses were done accordingly to standard methods (APHA 1995). Trace metals were chelated and analyzed by ICP-MS (standard methods 3030K and 3120B) by PSC Services Analytiques, Montreal, QC, Canada. Nitrate levels were determined on a Tecator FIAstar 5010 using the automated cadmium reduction method. Nitrite levels were determined using the sulfanilamide colorimetric method.

Bacterial growth was evaluated by measuring the total cellular protein concentration. Samples were centrifuged and deposits were resuspended in distilled water to remove interference from salts. NaOH 10 N was then added (final NaOH concentration of 0.1 N) and samples were heated at 100°C for 5 min. Proteins were quantitated using the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA., US), with bovine serum albumin as a standard.

3.1.3.4.4 Statistics

Lab test results were compared using repeated measures analysis (Systat version 9). When denitrification was linear, the relationship between mean residual NO_x concentration in chemostats and time was quantified by linear regression analysis. The slope of each regression was then used as an expression of the denitrification rate of the

assay. Each time that linear regression was used, regression analysis between mean residual NO_x concentration and its standard deviation showed mean residual NO_x concentrations to be homoscedastic.

3.1.3.5 Results

3.1.3.5.1 Lab-scale assays

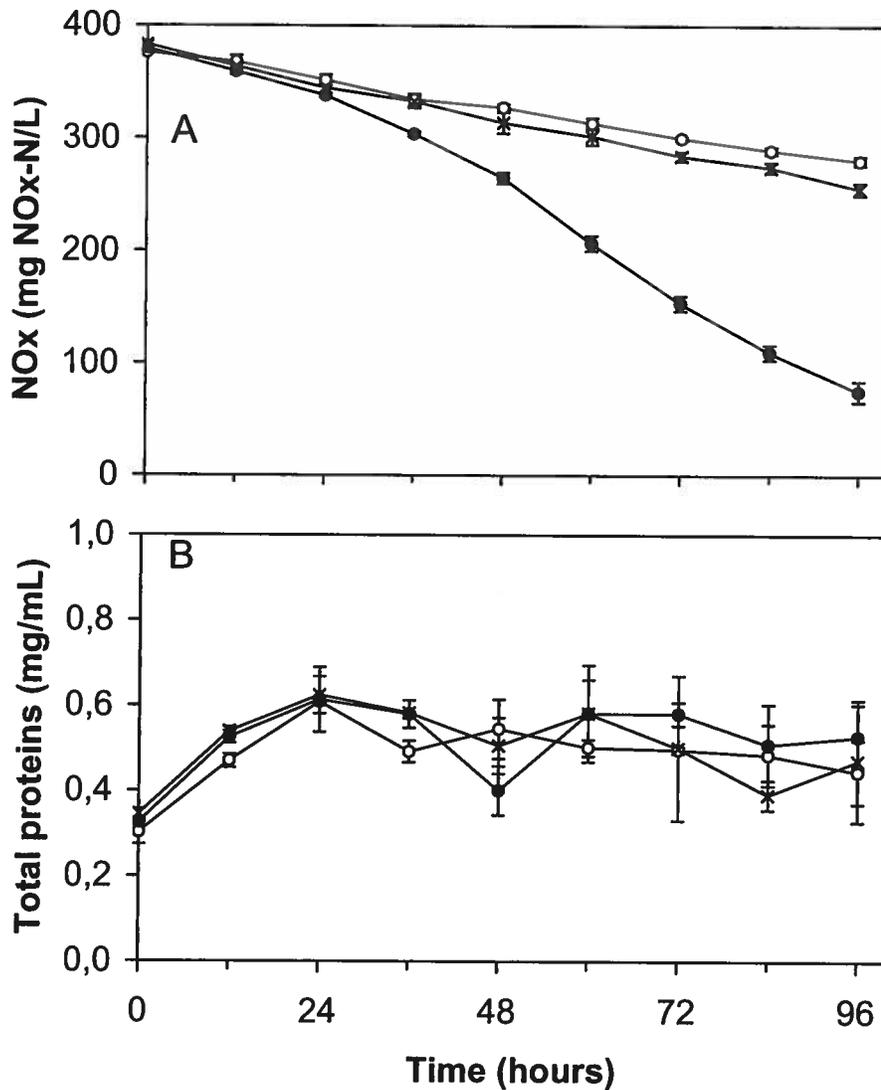
The bacterial population extracted from the SLM denitrification unit was first cultured in presence of a high or low dosage of all five trace metals (Fig. 3-1). The high dosage addition resulted in the removal of more than 75% of NO_x in 96 h and a denitrification rate of 3.38 mg NO_x-N L⁻¹ h⁻¹. In comparison, approximately 25% of NO_x was removed in control chemostats (no trace metals added) and their denitrification rate was 1.03 mg NO_x-N L⁻¹ h⁻¹. The low dosage addition produced a small but significant increase over control chemostats (F= 28.5, p=0.001, n=6) with a denitrification rate of 1.24 mg NO_x-N L⁻¹ h⁻¹. (Table 3-2)

Table 3-2: Linear regression models of the laboratory-scale assays.

Test	Model*	n	F	p	R ²	95% confidence interval of the slope
Artificial seawater	NO _x = - 1.03 T + 376	9	1226	4,02E-09	0,99	-1.10 < β ₁ < -0.96
High dosage of trace metals	NO _x = - 3.38 T + 406	9	344	3,28E-07	0,98	-3.81 < β ₁ < -2.95
Low dosage of trace metals	NO _x = - 1.24 T + 380	9	2266	4,72E-10	0,99	-1.30 < β ₁ < -1.18

*Model: NO_x = -AT + B , where NO_x is the concentration of NO_x in mg NO_x-N L⁻¹, A (the slope) is the denitrification rate (in mg NO_x-N L⁻¹ h⁻¹), T is the time in hours and B is in mg

Figure 3-1 Effect of low and high dosages of trace metals and of ammonia on denitrification (A) and bacterial growth (as total proteins) (B). A denitrifying bacterial population from the SLM denitrification unit was cultured in 200 mL chemostats (mean \pm SD, n = 3) with (•) high dosage of trace metals (TM); (x) low dosage of TM; and (o) without added TM.

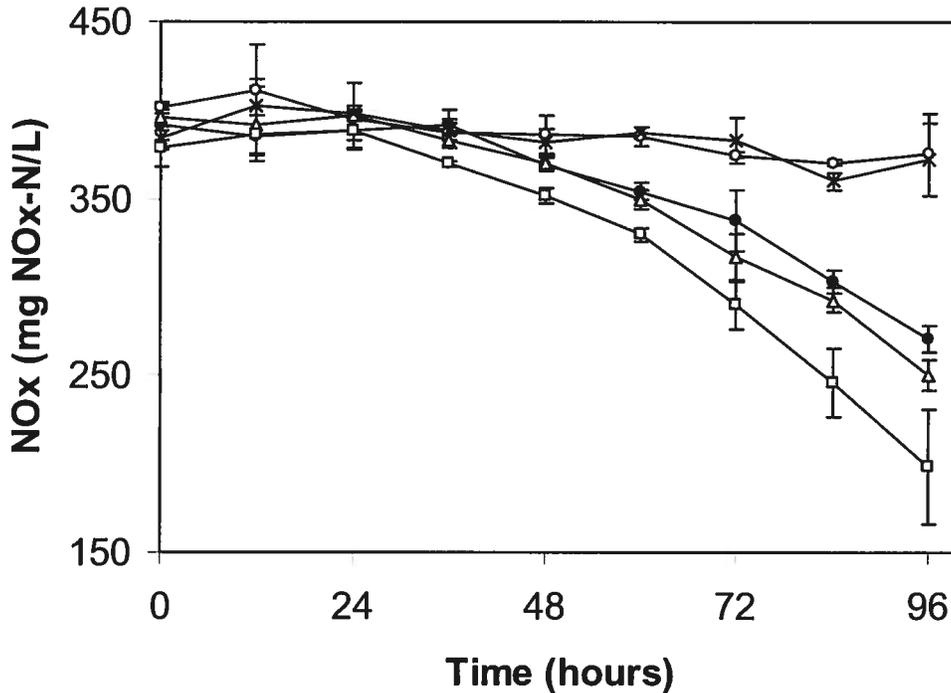


The addition of trace metals caused an increase in bacterial metabolism rather than an increase in bacterial growth. Bacterial mass, as measured by total proteins, was similar in all assays (Fig. 3-1B). It increased during the first 12 h, then remained relatively constant

throughout the experiment. Interestingly, the denitrification rate in the high dosage chemostats increased significantly although the bacterial mass did not change i.e. remained in stationary phase.

To determine which trace metal(s) had an effect on denitrification, another bacterial population was extracted from the SLM denitrification unit and was cultured in presence of {1} each trace metal separately, {2} iron and manganese, and {3} copper, molybdenum and zinc (Table 3-1). The addition of manganese (Fig. 3-2) did not significantly increase the denitrification rate compared to the control cultures. The same result was obtained by adding copper, molybdenum or zinc, or with all three together (data not shown). However, the addition of iron produced the same denitrification rate as adding a high dosage of all five trace metals ($F=1.14$, $p=0.346$, $n=6$) (Fig. 3-2). The addition of iron and manganese together have more effect on denitrification than iron only ($F=29.3$, $p=0.006$, $n=6$). Interestingly, iron and manganese together had a greater effect on denitrification than the high dosage of all five trace metals ($F=21.76$, $p=0.010$, $n=6$) (Fig. 3-2).

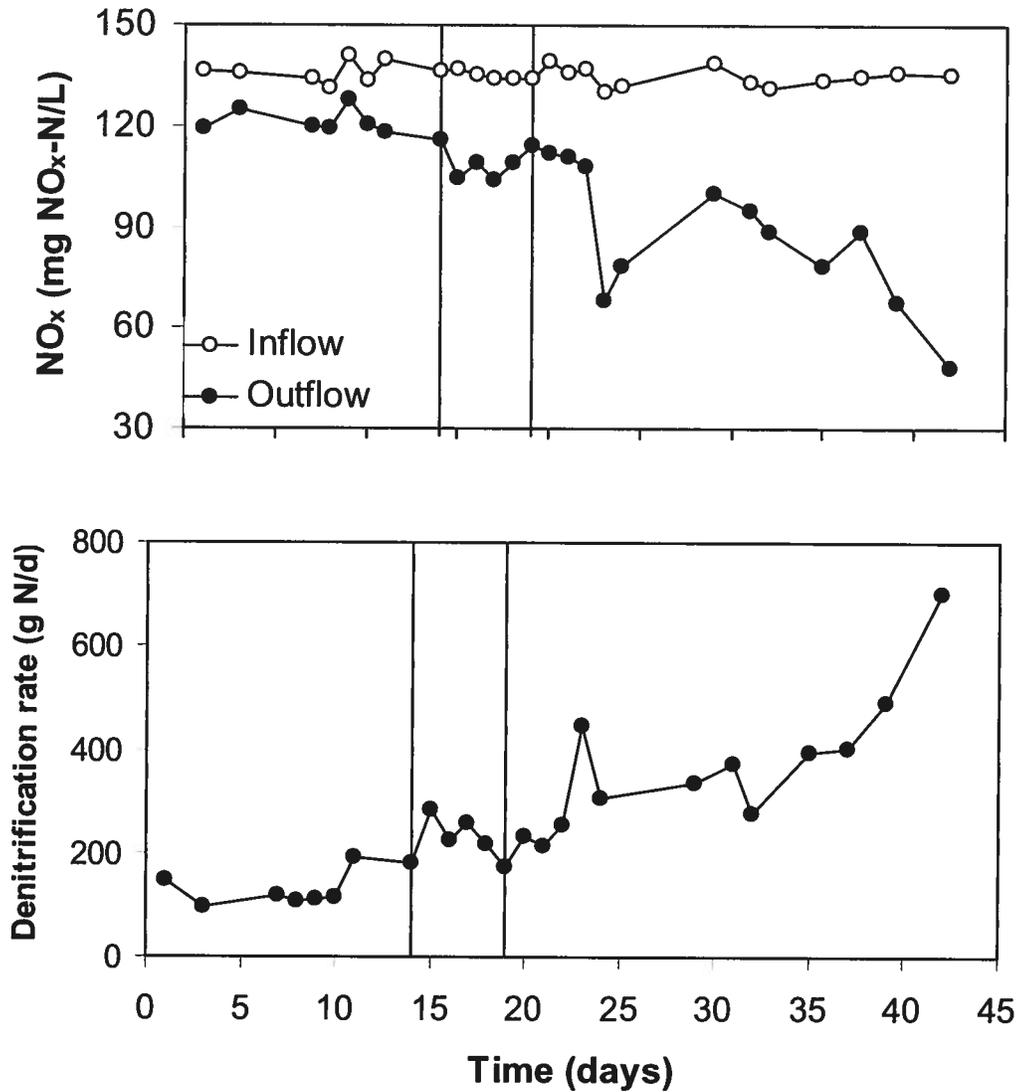
Figure 3-2: Effect of iron and manganese on denitrification. A denitrifying bacterial population from the SLM denitrification unit was cultured in 200 mL chemostats (mean \pm SD, n = 3) with: (•) high dosage of all five trace metals (TM); (Δ) FeSO₄*7H₂O; (x) MnSO₄*4H₂O; (\square) FeSO₄*7H₂O and MnSO₄*4H₂O; and (o) without added TM.



3.1.3.5.2 Full-scale assay in the SLM denitrification unit

The effect of trace metals was monitored during all three phases of the assay done in the SLM denitrification unit (Fig. 3-3B). During Phase 1, when no trace metals was added, the denitrification rate was constant and remained less than 200 g NO_x-N/d. The addition of a low dosage of iron and manganese (Phase 2) increased the denitrification rate to 280 g NO_x-N/d during the first day, but it returned to its initial rate after 5 days. The NO_x level did not decrease significantly during that time (Fig. 3-3A). With the addition of a high dosage of trace metals, the denitrification rate rose progressively to 700 g NO_x-N/d (Fig 3-3B) with a 60% decrease in the NO_x level from 135 to 50 mg NO_x-N/L in the outflow at the end of phase (Fig. 3-3A).

Figure 3-3: Time course of the NO_x level (A) and the denitrification rate (B) in the SLM denitrification unit (see text).



Measurements of trace metals in the denitrification unit during Phase 3 showed that iron concentration was identical in the inflow and outflow, despite the addition (Table 3-3). Iron may have been fully utilized by the denitrifying bacteria or precipitated in the denitrification unit during the experiment. In contrast, manganese outflow was eight times inflow level and copper outflow was three times inflow level suggesting that these two metals were overdosed.

Table 3-3: Concentrations ($\mu\text{g/L}$) of trace metals in the inflow and outflow of the denitrification unit.

	Fe	Cu	Mn
Denitrification unit ^a			
Inflow	1	0.7	1
Outflow	1	2.3	8
Newly prepared seawater	2	2	1
Natural seawater ^b	2	0.5	0.2

^a Concentrations were determined during phase 3 of the experiment (see figure 3-3)

^b From Adey and Loveland (Adey and Loveland 1998)

3.1.3.6 Discussion

Denitrification is trace metal limited, and especially iron limited, in closed marine systems such as the SLM. The addition of even a low dosage of all five trace metals produced a significant increase (20%) in chemostat cultures. The increase was 250% with the addition of a high dosage. Denitrification is a respiratory process involving several membrane proteins with metal-containing cofactors. Iron is needed by cytochrome for electron transfers; copper acts as a cofactor for both the nitrite and the N_2O reductases; molybdenum is involved in the regulation of nitrate reductase and other reducing enzymes; zinc is found in certain enzymes and protohemes; and manganese is necessary for electron transfer and iron replacement. (Zumft 1997; Niven *et al.* 1999). These trace metals are also needed to metabolize methanol, since a number of electron transfers are involved. Iron and manganese are constitutive elements of the cytochromes used in this metabolic pathway (Braker *et al.* 1998).

Iron and manganese have very short residence times in the ocean, 70 and 32 years respectively (Taylor and McLennan 1985). As they enter seawater, they are quickly oxidized and precipitated over the bottom. The same phenomenon occurs in closed

marine systems, especially in those equipped with an ozone contactor such as the SLM. Iron and manganese are oxidized by ozone and precipitated in filters or pool sediments (Reckhon *et al.* 1991; Spotte 1991). As a result, less iron was found in the SLM than in newly prepared seawater.

In the ocean, iron is more abundant where there is strong biological activity, which maintains it in its ferrous form. Two peaks of abundance are observed in the water column. The first is near the surface and is caused by photosynthetic activity. The second is at a depth of about 50 m and is caused by heterotrophic activity. For instance, in the Black Sea, the peak values of iron are 11 µg/L at 0 m and 44 µg/L at 50 m (Millero and Sohn 1992). Iron is a limiting factor for many ocean plankton organisms. Phytoplankton blooms have been generated by adding iron to ocean surface water (Martin and Fitzwater 1988; Baar de *et al.* 1995).

Denitrification generally occurs at the sediment level, where trace metals are more abundant than in the water column. For example, concentrations of iron are around 6.5×10^{-3} g/g in the sediments and 6×10^{-8} g/g, in the water column (Taylor and McLennan 1985). Denitrification in natural sediments is limited by carbon, nitrogen or phosphorus, rather than by trace metals. On the other hand, the Nutrients : Carbon : Trace metals ratio is much higher in closed marine systems such as the SLM, thus making trace metals the limiting factor for denitrification. Trépanier *et al.* (2002) showed that the Nitrogen : Phosphorus ratio has been constant at 10 in the SLM since 1992 although nitrogen and phosphorus reached high values of 180 mg N/L and 18 mg P/L in 1998. Since iron did not increase accordingly during that period, its level became even lower than in newly prepared seawater and the Iron : Nutrients ratio decreased dramatically. As a result, iron became a limiting factor for denitrification and, most probably, for other bacterial and algal activities as well.

As shown by the lab-scale assays, iron and manganese had a synergistic effect on denitrification. Martin and Fitzwater (1988) observed that these two metals also had a synergistic effect on phytoplankton. It is thought that manganese stimulates cell activity

either directly or by facilitating iron transfer across the cell membrane. Also, Brand *et al.* (1983) found that limitation of marine phytoplankton reproductive rate by both iron and manganese was stronger than limitation by either iron or manganese alone.

The addition of trace metals caused an increase in metabolic activity, rather than an increase in bacterial growth. In fact, in the chemostat cultures with a high dosage of trace metals, the denitrification rate was at its highest during the stationary phase. Since clogging is a major problem previously encountered in the denitrification unit, the addition of trace metals to a denitrification unit should not result in increased biofilm production. Church *et al.* (2000) studied bacterial photosynthesis and also found that adding trace metals increased bacterial activity, rather than bacterial growth. They used the number of cells to measure population growth, and the leucine assimilatory rate to measure bacterial activity. The addition of 0.14 µg/L of iron produced an increase in leucine incorporation but not an increase in the number of cells.

3.1.3.7 Conclusion

The addition of five trace metals to ozonated artificial seawater increased denitrification by as much as 250% in both the laboratory-scale assays and the mixed-bed denitrification unit at the Montreal Biodome. Like Bruland *et al.* (1991), we found that iron was the most important of all bioactive trace metals and was mainly responsible for the increase. Copper, molybdenum and zinc had no effect on denitrification in our lab assays. Manganese caused a slight increase in denitrification but only in the presence of iron. Interestingly, these two trace metals had a larger effect on denitrification than the solution containing all five trace metals.

The addition of trace metals should also be beneficial to other biological treatments in closed marine systems such as mineralization, nitrification and phosphate removal. These processes are usually done in rapid sand filter beds, trickling filters or fluidized beds where bacteria must also rely on dissolved trace metals. The addition of trace metals could, among other positive impacts, reduce the size of the systems needed for water treatment.

3.1.3.8 Acknowledgments

This research was supported by the Montreal Biodome, by a scholarship to N. Labbé from the INRS-Institut Armand-Frappier and by a grant to R. Villemur from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We are grateful to Rachel Léger, Head of Live Collections and Research for her continuous support. We also wish to thank Jean Bouvrette, Mec. Eng. and Maintenance and Operation Manager, and the engineering staff of the Biodome for their technical help and cooperation. Brian Colwill, C.Tr., kindly revised the English style and grammar, and two anonymous reviewers provided helpful comments on an earlier version of this paper.

3.2 Article 2

3.2.1 Mise en contexte de l'article 2

Les performances et les microorganismes impliqués dans la dénitrification d'un aquarium marin étaient peu connus. Tant pour les aquariums marins publics que pour l'industrie piscicole, la dénitrification de l'eau est importante. La connaissance de l'écologie microbienne de ce type de procédé peut mener à l'amélioration des performances des systèmes de dénitrification.

Ce travail est le seul à avoir été effectué sur la microbiologie d'un procédé de dénitrification marin. Il présente la diversité microbienne retrouvée dans le dénitrificateur du Biodôme de Montréal et le profil de colonisation de nouvelles biobilles. Ce travail a notamment montré que cet écosystème complexe regorgait d'organismes nouveaux.

3.2.2 Contribution de l'étudiant à l'article 2

Les travaux présentés dans cet article ont tous été effectués par l'étudiant sous la supervision du Dr Parent et du Dr Villemur. Le séquençage a été effectué par la compagnie DNA LandMarks (St-Jean-sur-Richelieu). Le Dr Juteau a contribué à la mise au point de la technique du DGGE utilisée dans cet article. Les Drs Parent et Villemur ont aussi contribué à la rédaction et à la révision de l'article.

3.2.3 Article 2

BACTERIAL DIVERSITY IN A MARINE METHANOL-FED DENITRIFICATION REACTOR AT THE MONTREAL BIODOME, CANADA

Normand Labbé¹, Pierre Juteau¹, Serge Parent² and Richard Villemur^{1*}

¹ INRS - Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval H7V 1B7, Canada

² Biodôme de Montréal, 4777 Pierre-De Coubertin, Montreal H1V 1B3, Canada

*Author to whom all correspondence should be addressed.

Richard Villemur

INRS-Institut Armand-Frappier

531 Boul. des Prairies

Laval, Qc, Canada

H7V 1B7

Phone: 450-687-5010

Fax: 450-686-5501

E-mail: richard.villemur@iaf.inrs.ca

Running head: Bacterial diversity of a sea water denitrification reactor

Cet article a été publié dans la revue *Microbial ecology* (2003), 46(1):12-21

3.2.3.1 Résumé

La flore microbienne du dénitrificateur utilisé pour le traitement de l'eau de mer du Biodôme de Montréal a été examinée par une méthode basée sur la culture et une méthode de biologie moléculaire. Le méthanol est la source de carbone utilisé dans ce dénitrificateur. La microflore a été prélevée dans le dénitrificateur puis étalé sur trois types de géloses. Trois types d'isolats ont été purifiés puis une partie de leur ADN ribosomal 16S a été séquencée. Cette analyse a permis de voir que les trois isolats étaient apparentés aux *alpha*-protéobactéries. Plus précisément, ils étaient affiliés à *Hyphomicrobium*, à *Paracoccus* et à la famille des Phyllobacteriaceae respectivement. Les bactéries dites non-cultivables ont aussi été examinées suite au criblage d'une génothèque des gènes 16S ribosomaux issue de l'ADN total extrait du biofilm dénitrifiant. Les différents clones ont été criblés selon leur profil de restriction et leur migration sur DGGE. Plus de 70% des clones obtenus avaient le même profil de restriction et s'affiliaient au *Methylophaga* de la famille des Piscirickettsia (*gamma*-protéobactérie). Les autres séquences s'apparentaient à des bactéries dénitrifiantes ou marines. La diversité microbienne a été évaluée à 15 espèces microbiennes différentes. La colonisation de nouveau média a également été révélée par DGGE. Le profil de diversité de ces échantillons a évolué durant les cinq premières semaines puis est demeuré constant par la suite. La technique du DGGE a aussi été utilisée pour voir le profil de population de différent endroit de l'aquarium. Les profils de population a différé grandement d'un endroit à l'autre à l'exception des filtres à sable et du nitrificateur qui ont montré des profils similaires.

3.2.3.2 Abstract

The bacterial biota of a methanol-fed denitrification reactor used to treat seawater at the Montreal Biodome were investigated using culture-dependent and molecular biology methods. The microbiota extracted from the reactor carriers was cultivated on three media. Three isolate types were recovered and their 16S ribosomal DNA (rDNA) genes were determined. The analysis showed that the isolate types were related to *alpha*-Proteobacteria. They are members of the *Hyphomicrobium* and *Paracoccus* genera and

the Phyllobacteriaceae family. Uncultured bacteria were identified through a 16S rDNA library generated from total DNA extracted from the microbiota. Clones were screened for different restriction profiles and for different DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) migration profiles. More than 70% of clones have the same restriction profile, and the sequence of representative clones showed a relation with the *Methylophaga* members of the Piscirickettsia family (*gamma*-Proteobacteria). Sequences from other profiles were related to bacterial species involved in denitrification. The number of species in the denitrification reactor was estimated at 15. Bacterial colonization on newly added carriers in the denitrification reactor was monitored by PCR-DGGE. The DGGE migration profiles evolved during the first 5 weeks and then remained essentially unchanged. PCR-DGGE was also used to monitor the microbial profiles in various aquarium locations. As expected, bacterial populations differed from one location to another, except for the sand and trickling filters which presented similar DGGE migration profiles.

3.2.3.3 Introduction

The nitrate level in natural marine environments is rarely higher than 1 mg N/L (Yeats, 1990). However, it can reach more than 50 mg N/L in marine aquariums where seawater is recycled in a closed circuit (Grguric *et al.* 2000; Parent and Morin 2000) and can be toxic for marine ecosystems. Regular large water changes are impractical for inland aquariums because tank size makes it operationally difficult to replace a significant portion of the water. In addition, the expense of preparing large volumes of artificial seawater can be prohibitive (Grguric 1990). Biological denitrification was shown to be an efficient method for controlling nitrate concentrations in groundwater (Gomez *et al.* 2000), drinking water (Fuchs *et al.* 1997; Hollo and Czako 1987) and wastewater (Lemmer *et al.* 1997; Metcalf and Eddy 1991). Basically, denitrifying bacteria reduce nitrate to gaseous nitrogen via their respiratory chain (Zumft 1997). Although denitrification can be achieved, its rate generally decreases as water salinity increases (Glass and Silverstein 1999, Intrasungkha *et al.* 1999, Yang *et al.* 1995).

Few studies on denitrification in saltwater or seawater have been published. Van der Hoek *et al.* (1997) observed that denitrification is feasible in the presence of 10-30 g/L sodium chloride or sodium bicarbonate in a combined ion exchange/methanol-fed denitrification process for nitrate removal from ground water. Grguric *et al.* (2000) studied the performance of a commercial, methanol-fed denitrification unit similar to the one installed at the Montreal Biodome (see below). During 100 days of operation, the nitrate level of the 2.9 million L marine tank decreased by 25% from 133 mg NO_x-N/L to 98 mg NO_x-N/L. The researchers presumed that *Pseudomonas* sp. was involved in the process. Catalan-Sakairi *et al.* (1996) achieved considerable denitrification efficiency by treating artificial wastewater containing 30 g/L of NaCl with methanol and porous cellulose carriers. They presumed that *Hyphomicrobium* sp. was involved in the process. By using cultivation methods and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified 16S ribosomal RNA (16S rDNA) genes, Yoshie *et al.* (2001) found that Halomonadaceae were the predominant bacterial group involved in an acetate-fed denitrification process for saline metallurgic wastewater (over 3.2% NaCl). Brettar *et al.* (2001) isolated the denitrifier *Shewanella baltica* in the Baltic Sea. Finally, Braker *et al.* (2000) investigated the nitrite reductase genes in marine sediments and found sequences related to those of *Pseudomonas* sp. and *Halobacterium* sp.

Methanol is the carbon source most frequently used in denitrification systems because it is inexpensive and easily available (Bilanovic *et al.* 1999, Lemmer *et al.* 1997). The few denitrifying bacteria known to use methanol as a carbon source are freshwater members of the *Hyphomicrobium*, *Paracoccus*, *Hydrogenophaga*, *Rhodobacter* and *Blastobacter* genera (Lemmer *et al.* 1997; Neef *et al.* 1996). However, since characterization of methanol-fed bacteria was mainly done using culture-dependent methods, important bacterial groups may have been missed. Moreover, no studies have been done on bacteria involved in marine denitrification systems except for the recent study by Tal *et al.* (2003) on nitrogen transformation processes in a closed mariculture system. Tal *et al.* (2003) found that nitrifiers (*Nitrospira* and *Nitrosomonas*), denitrifiers (*Pseudomonas*) and anammox bacteria (Planctomycetes) were associated with their system.

The Montreal Biodome operates a large closed marine aquarium referred to as the St. Lawrence Mesocosm (SLM) (Parent and Morin 2000). Water salinity and temperature are 28 g/L and 10°C. A denitrification unit was integrated into the SLM life support system in 1998. In this report, the bacterial biota of the methanol-fed reactor were investigated using culture-dependent and molecular biology methods (PCR-DGGE). Molecular biology methods were also used to monitor the bacterial colonization of newly added carriers, to compare two carrier types and to compare the reactor flora with that of other SLM locations.

3.2.3.4 *Material and methods*

3.2.3.4.1 *The SLM denitrification system*

The SLM denitrification system (EcoMat Inc, Hayward, CA) operates in a circuit parallel to the main life support system. It comprises a 1 m³ deaeration tank, a 1 m³ denitrification reactor, a foam fractionator and an overflow tank. The deaeration tank is a fixed-bed reactor filled with 9 cm NuPac® plastic packing. The reactor is a fluidized-bed type which contained 0.3 m³ of EcoLink® cellulose carriers (EcoMat) prior to July 2001, and has contained 0.3 m³ of Bioflow® 9 mm carriers (1.020 density; Rauschert, Steinwiessen, Germany) since then. The deaeration tank and reactor are both methanol-fed. Water temperature in the reactor varies between 16 and 24°C depending on the water flow. Twice a day, 370 mg FeSO₄·7H₂O, 130 mg MnSO₄·4H₂O and 20 mg CuSO₄·5H₂O are added to the deaeration tank to enhance the denitrification rate (Labbé *et al.* 2003). The denitrification rate of the system varied between 100 to 200 g d⁻¹ NO_x-N when operated with the EcoLink® cellulose carriers, and reached 900 g d⁻¹ NO_x-N with the Bioflow® carriers and the added metals.

3.2.3.4.2 *Cultivation media*

To isolate bacteria from the denitrification reactor, EcoLink® carriers were collected and homogenized. Samples were diluted with water in a 10-fold series. 100 µL of each dilution were spread on trypticase soy agar (TSA), R2A agar and Winogradsky modified agar (Blaszczyc *et al.* 1981). The Winogradsky modified agar was prepared with artificial seawater and supplemented with 0.3% methanol, 1 g NO₃-N/L, 10 mg K₂HPO₄-P/L, and

5 mL/L of the following mineral solution: 50 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$, 25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, 1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, 1 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, 1 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, and 0.1 g CaCO_3/L . The culture media were then incubated in the presence or absence of oxygen (helium gas replaced the oxygen) at room temperature for three weeks.

3.2.3.4.3 Analytical methods

Nitrate levels were determined on a Tecator FIAstar 5010 using the automated cadmium reduction method. Nitrite levels were determined using the sulfanilamide colorimetric method. A dissolved oxygen meter (YSI Inc, Yellow Springs, Ohio, USA) was used to measure the dissolved oxygen concentration.

3.2.3.4.4 DNA extraction

For the isolates, colonies were dispersed in 250 μL of TEN (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0 and 150 mM NaCl) and then mixed with 250 mg of sterilized glass beads 0.4-0.5 mm (B. Braun Co. Melsungen, Germany). The suspension was homogenized for 3 min with a glass mill homogenizer (B. Braun Co.) and then centrifuged at 16,000 g for 10 min. The supernatant was extracted twice with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and once with chloroform/isoamyl alcohol (24:1). DNA was precipitated by adding 0.25 volume of 10 M ammonium acetate and two volumes of 95% ethanol. The resulting pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in 50 μL of water.

The carrier biomass was dispersed by vortexing in 500 μL of TEN containing 2.5 mg lysozyme (Roche, Laval, QC) and then incubated 30 min at 37°C. 50 μL of sodium dodecyl sulfate and 5 μL of β -mercaptoethanol were added. Cells were lysed by a freeze-thaw protocol (three cycles of 10 min at -80°C and 5 min at 65°C). 50 μg of proteinase K (Roche) were added and the sample was incubated 2 hours at 42°C. DNA was then extracted and precipitated the same way it had been for the isolates.

3.2.3.4.5 PCR amplification of 16S rDNA sequences

Eubacteria 16S rDNA sequences were amplified by PCR in a DNA thermal Cycler (Perkin Elmer) using Eubacteria primers (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') which correspond to positions 8 to 27 and 1521 to 1540 in the *Escherichia coli* 16S rDNA gene (GenBank accession # J01695). PCR amplifications were performed in a 50 µL reaction volume with 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 µg bovine serum albumin, 200 µM dNTP, 10 pmol of each primer and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Amersham-Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe, QC). DNA (10-20 ng) was added to the pre-heated PCR mixture at 80°C (3 min) and amplifications were then done at 94°C for 5 min, 55°C for 5 min, then 30 cycles at 72°C for 2 min, 94°C for 40 s, 55°C for 1 min, and finally an extension period of 10 min at 72°C.

3.2.3.4.6 Cloning and screening of the 16S rDNA

PCR products were cloned in a T-vector according to the manufacturer's specifications (p-Gem-T easy, Promega, Madison, WI). Plasmid was extracted using the method of Serghini *et al.* (1989). Clones were screened by restriction endonuclease digestions and by DGGE (see below). Plasmids were double-digested with EcoRI (excision of the insert from the plasmid) and RsaI (Amersham-Pharmacia Biotech). DNA segregation on agarose gel electrophoresis was carried out as described in Sambrook *et al.* (1989). Rarefaction and Chao 1 analysis were achieved with the BIODIVERSITY PRO software package (<http://www.sams.ac.uk/dml/projects/benthic/bdpro/>).

3.2.3.4.7 DNA sequence and phylogenetic study

Plasmid DNA from chosen clones was extracted using the alkaline lysis protocol and purified by polyethylene glycol precipitation (Sambrook *et al.* 1989). Plasmids were linearized by digestion with ScaI (Pharmacia) before sequencing. Sequences were analyzed using BioEdit software, version 5.0.9.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>). Comparisons of sequences in gene databases (bacterial sequences only) were done with the BLASTN program (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the FASTA3

program (European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>). All sequences were analyzed with the CHIMERA_CHECK program from the Ribosome Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/html>). The CLUSTALW program 1.4 included in the Bioedit software package was used to align sequences. Phylogenetic analyses were carried out with different software applications from PHYLIP package 3.5 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). A bootstrap of 1,000 replicates was derived using the SEQBOOT program. Pairwise comparisons were done with the DNADIST program. Distance matrixes representing the number of changes per site for each pairwise comparison were generated. The FITCH program was used to derive the best phylogenetic trees for each replicate. Lastly, the CONSENSE program was used to derive consensus trees.

3.2.3.4.8 PCR-DGGE

PCR amplifications were performed as described previously with approximately 25 ng of total DNA or 10 ng of plasmid DNA using primer 341f with a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCGCGG GCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') (Muyzer *et al.* 1993) and primer 534r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') resulting in 250-bp DNA fragments. DGGE were done using a D-code system (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON) with PCR products (approximately 300 ng) electrophoresed onto 8% polyacrylamide gels (acrylamide: N-N'-methylenebisacrylamide 37.5:1) containing a linear denaturing gradient (100% denaturing gel contained 7 M urea and 40% deionized formamide). Electrophoresis was carried out using a TAE running buffer (40 mM Tris-HCl, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) for 16 hours at 100 volts and 60°C. The gels were stained with ethidium bromide (10 µg/mL).

3.2.3.5 Results

3.2.3.5.1 Culture methods

Three isolate types, designated as NL8, NL21 and NL23, were obtained from the EcoLink® cellulose carriers cultivated on various nutrient agars. All isolates grew on R2A agar. NL21 and NL8 also grew on TSA, but none grew on the Winogradsky

modified agar. NL23 was the most abundant in the reactor carriers with 2×10^8 CFU/cm³, followed by NL21 with 8×10^6 CFU/cm³ and NL8 with 1×10^6 CFU/cm³ (Table 3-4). NL23 grew more slowly than NL8 or NL21 on the R2A agar. NL23 growth was stimulated by adding 0.3% methanol to the medium. All isolates showed denitrification activity when cultured in anoxic R2A agar supplemented with nitrate.

Analysis of PCR-amplified 16S rDNA sequences showed that the isolates belonged to *alpha-Proteobacteria*. 16S rDNA sequences of NL23 and NL8 were highly related to *Hyphomicrobium zavarzinii* and *Paracoccus denitrificans* respectively, while the NL21 sequence was related to the *Phyllobacteriaceae* family (Table 3-4, Fig. 3-4A).

Table 3-4 : Possible affiliation of the 16S rDNA sequences of the strains isolated from the denitrification reactor.

Isolate	Concentration*	Possible affiliation	Identity %**	Accession #
NL23	2×10^8	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i>	99	AF534572
NL21	8×10^6	<i>Phyllobacteriaceae</i>	95	AF534573
NL8	1×10^6	<i>Paracoccus denitrificans</i>	99	AF534574

*CFU/cm³ of carrier

**Percentage of identity with the most related 16S rDNA sequence.

3.2.3.5.2 Molecular biology methods

To identify uncultured bacteria, a 16S rDNA gene library was developed with the PCR-amplified 16S rDNA sequences of total DNA extracted from the EcoLink® cellulose carriers. Ninety-four clones were screened for different *RsaI* restriction profiles, and 11 different profiles were found. At least one clone of each profile was sequenced (Table 3-5). Only one chimerical sequence, represented by two clones, was detected among them.

Table 3-5: Possible affiliation of the 16S rDNA clones isolated from the denitrification reactor.

Clone	Accession #	Clones	Possible affiliation	Identity % ³
		<i>RsaI</i> ¹ DGGE ²		
alpha-Proteobacteria				
IAFDn93	AY090121	3	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i>	99
		NL23	isolate	100
IAFDn44	AY090122	3	<i>Sulfitobacter mediterraneus</i>	97
IAFDn48	AY090123	1	Marine bacteria (AB015579)	88
beta-Proteobacteria				
IAFDn90	AY090115	1	<i>Delftia acidovorans</i>	100
gamma-Proteobacteria				
IAFDn24	AY090120	3	<i>Dechloromarinus chlorofilus</i>	96
IAFDn2	AY090116	65	<i>Methylophaga alcalica</i>	97
IAFDn39	AY090119		<i>Methylophaga alcalica</i>	97
IAFDn7	AY090117		<i>Methylophaga spp.</i>	88-90
epsilon-Proteobacteria				
IAFDn27	AY090124	1	<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	94
IAFDn30	AY090125	7	Unclassified <i>Proteobacteria</i>	< 91
IAFDn4	AY090127	6	Candidate OP11	< 85
IAFDn55	AY090130	2	<i>Planctomycetales</i>	< 95

¹ Number of clones having the same *RsaI* restriction profile.

² Number of clones having the same DGGE migration profile among the 65 clones related to *Methylophaga* spp.

³ Percentage of sequence identity with the most related sequences in the affiliation group.

Sixty-five clones (71%) had the same *RsaI* restriction profile and were screened by DGGE. Three DGGE migration profiles were found: 57 clones shared the same profile, and the remaining 8 clones shared the other two profiles (Table 3-5). Sequencing of one representative clone of each DGGE profile (clones IAFDn2, IAFDn7, IAFDn39) showed that they were related to each other (90.2-99.2%). Phylogenetic analysis revealed that

those sequences belonged to *gamma*-Proteobacteria. The most highly related sequences were *Methylophaga* spp. of the *Piscirickettsia* family (90 to 97% identity) (Table 3-5 and Fig. 3-4B).

Figure 3-4: Phylogenetic analyses of 16S rDNA. Evolutionary distance among rDNA and representative members of related families is illustrated by unrooted phylogenetic trees (*Geobacter metallireducens* is used as an outgroup species). A: *alpha*-Proteobacteria; B: *gamma*- and *epsilon*-Proteobacteria; C: Planctomycetales and Candidate OP11. Trees were inferred from a matrix of pairwise distances using sequences of at least 550 nucleotides. The scale bar indicates 0.05 nucleotide substitution per position. The number indicates the percentage of 1000 bootstrap resamplings. Only values above 50% are shown. Unnamed species are referred to by their GenBank accession number.

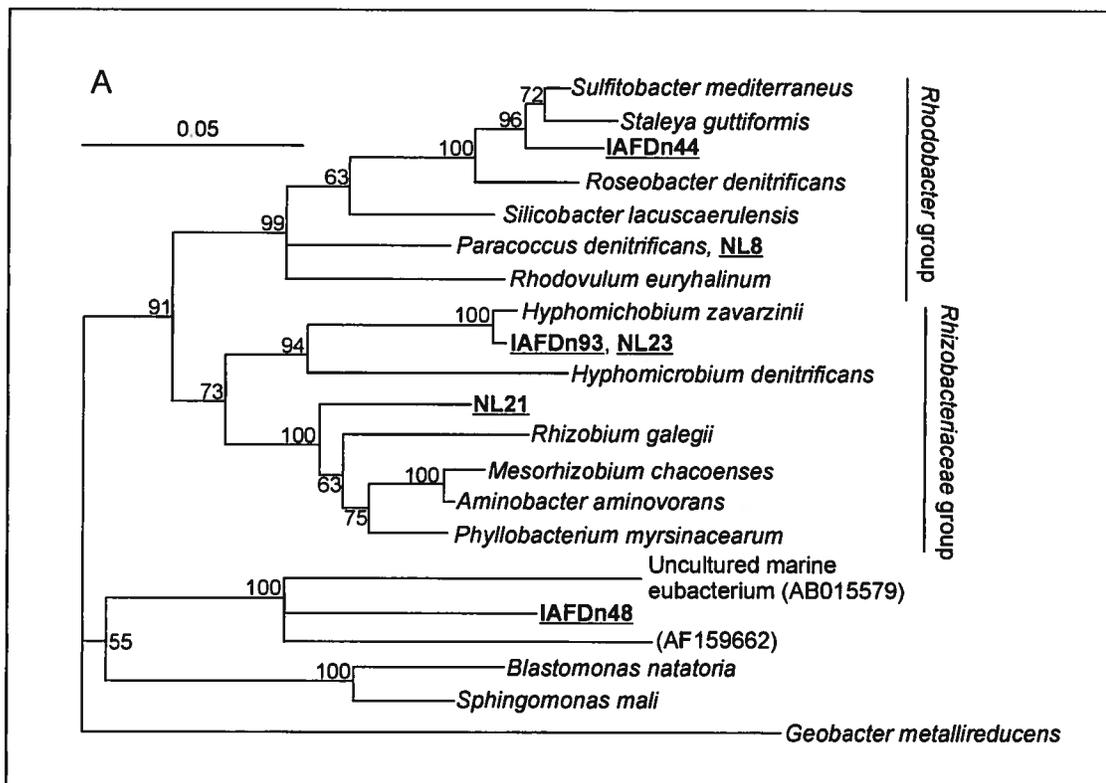
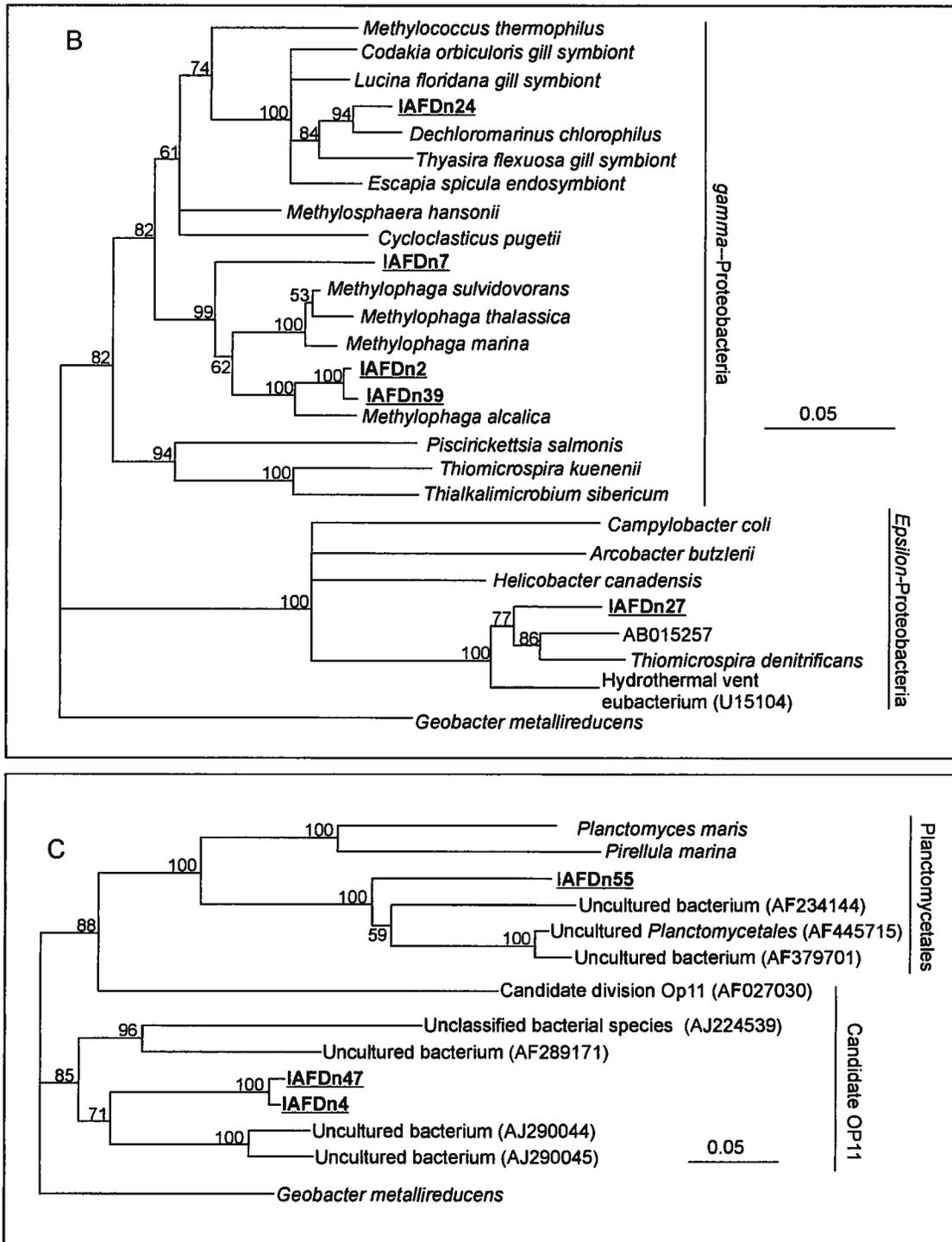


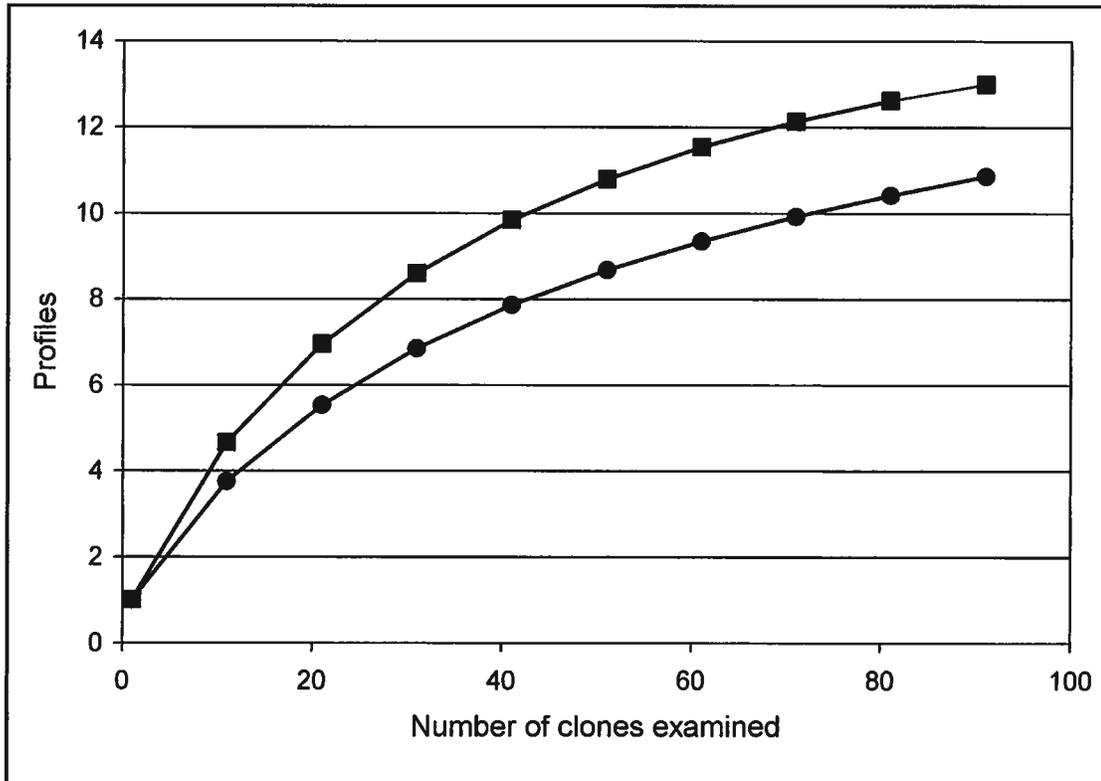
Figure 3-4: Phylogenetic analyses of 16S rDNA. (Suite)



Three groups of clones were related to bacteria found in other denitrification systems (Table 3-4, Fig. 3-4). Clones IAFDn90, IAFDn93 and IAFDn27 were related to *Delftia acidovorans*, *Hyphomicrobium zavarzinii* (= NL23 isolate) and *Thiomicrospira denitrificans*, respectively. Other *Proteobacteria* clones were mainly related to marine species such as *Sulfitobacter mediterraneus* (clone IAFDn44) and *Dechloromarinus chlorofilus* (clone IAFDn24) (Table 3-5, Fig. 3-4). In addition, sequences of clones representative of two *RsaI* restriction profiles were related to the Candidate OP11 and *Planctomycetales* groups (Table 3-4, Fig. 3-4C).

Total diversity in the clone library was estimated at between 12 and 15 species by rarefaction analyses on the 16S restriction and DGGE migration profiles (Fig. 3-5). The Chao 1 algorithm gave an estimate of 14 species.

Figure 3-5: Rarefaction analyses of the 16S rDNA gene library. The rarefaction curves were derived from examined clones having different *RsaI* restriction profiles (●) or different DGGE migration profiles (■). In the latter case, the V3 region of the 16S rDNA gene was PCR-amplified for each examined clone, and the PCR products were migrated onto DGGE.

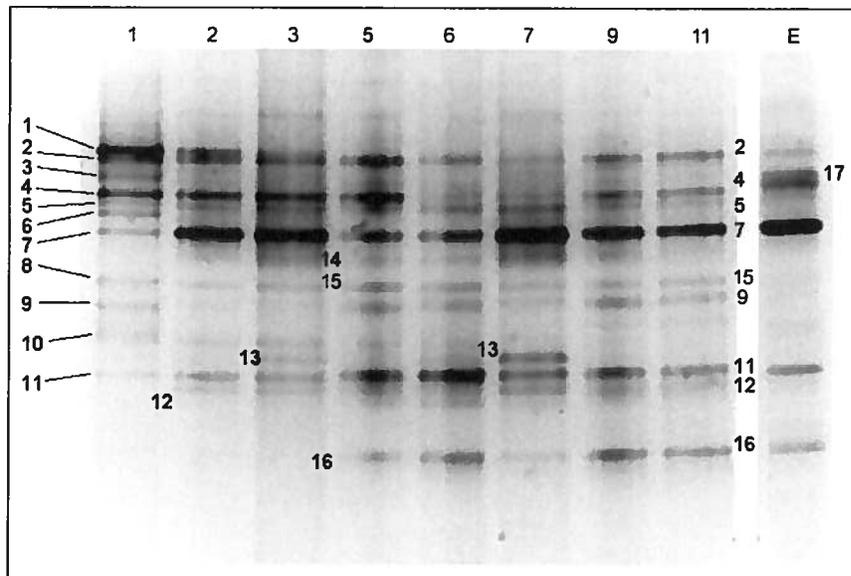


3.2.3.5.3 Bacterial dynamics

The establishment of bacterial biota on the new Bioflow® 9mm carriers was monitored by sampling carriers every week for 11 weeks. Total DNA was extracted, bacterial 16S rDNA sequences were amplified and then separated by DGGE. The migration profiles evolved from week 1 to week 5 (Fig. 3-6) and then remained essentially unchanged from week 5 to week 11. At least 11 DNA bands were observed in week 1. Bands 1, 3, 6, 8 and 10 present in the week 1 sample were no longer detected in the week 5 sample, whereas bands 2, 4, 5, 7, 9 and 11 remained throughout the 11 weeks. Three other bands (bands 12, 15 and 16) appeared during the next four weeks. Band 13 appeared only in the week 3 and 7 samples, and band 14 was only clearly detected in the week 5 to 9 samples. A

DGGE migration profile was also derived for the biomass that grew on the EcoLink® carriers. Except for band 17, all DNA bands observed in that profile were also present in the Bioflow® sample. Bands 5, 9, 12 and 15 were not revealed in Figure 3-6 for the EcoLink® sample, but were observed in other gels.

Figure 3-6: PCR-DGGE monitoring of the colonization of new Bioflow® carriers. Total DNA was extracted from Bioflow® carriers at weeks 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 and 11 (lanes 1 to 11) and from EcoLink® carriers (lane E). The V3 region of the 16S rDNA gene was PCR-amplified. PCR products were separated by DGGE with a 25% to 70% denaturant gradient.

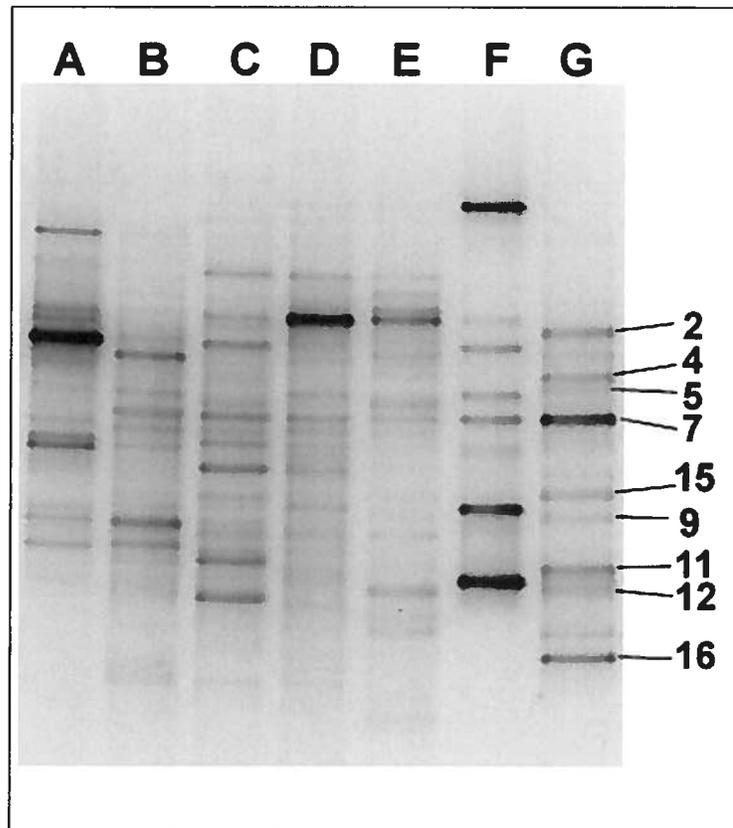


3.2.3.5.4 Bacterial diversity profiles of other SLM locations by DGGE

Seven biomass samples were collected at different SLM locations. In the main tank, the biomasses were associated with periphyton, sand and wall slime. In the life support system, they were associated with filter sand, plastic supports from the trickling filter (nitrification), and carriers from the deaeration tank and denitrification reactor. Bacterial diversity was examined by PCR-DGGE (Fig. 3-7). Each of the seven biomass samples collected at various SLM locations generated a unique migration profile with one or more bands common to two or more samples. One band was common to all samples except for

periphyton. It corresponded to reactor band 7 and was related to *Methylophaga* spp. (DGGE co-migration experiments, data not shown).

Figure 3-7: Bacterial diversity profiles of different SLM locations determined by PCR-DGGE. Total DNA was extracted from samples taken in the i) main pool: periphyton (lane A), sand (lane B) and wall (lane C); ii) life support system: filter sand (lane D), trickling filter bioball (lane E); iii) denitrification unit: deaeration tank carriers (lane F) and EcoLink® carriers (lane G). The V3 region of the 16S rDNA gene was PCR-amplified. PCR products were separated by DGGE with a 20% to 70% denaturant gradient.



3.2.3.6 Discussion

Only three isolate types were obtained by cultivating the cellulose carrier biomass on various solid media. All belonged to *alpha-Proteobacteria*. For two of the isolate types, the 16S rDNA sequence was highly related to the denitrifying bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Hyphomicrobium zavarzinii*. These microorganisms are known to be tolerant of salt conditions as high as 30 g/L NaCl (Kocur 1984; Hirsch 1989). Moreover, they have also been found in methanol-fed denitrification systems for fresh water (Lemmer *et al.* 1997; Neef *et al.* 1996). However, unlike those authors, we did not detect *Hydrogenophaga* in our cultures.

The *Hyphomicrobium*-related isolate was 200 times more abundant in the carrier biomass than the *Paracoccus*-related isolate. Claus and Kutzner (1985) co-cultured *Paracoccus* and *Hyphomicrobium* in a methanol-fed fermentor. They found that *Hyphomicrobium* was twice as abundant as *Paracoccus*, and noticed that *Paracoccus* grew more slowly on methanol when cultured alone. They suggested that *Paracoccus* used methanol degradation intermediates such as formate and acetate provided by *Hyphomicrobium*.

The 16S rDNA sequence of NL21 is related to members of the Phyllobacteriaceae with no specific genus closely related. Phyllobacteriaceae include bacteria such as *Mezorhizobium*, *Pseudaminobacter*, *Aminobacter*, *Aquamicrobium*, *Defluviobacter* and *Phyllobacterium*. Most members of that family fix nitrogen. Some are able to reduce nitrate and nitrite, and many are plant symbionts. NL21 exhibited denitrification activity. The *Cu-nir* gene was not detected in the NL21 isolate but was detected in two other similar isolates (NL31 and NL32; data not shown).

To identify unculturable bacteria present in the denitrification reactor, a 16S rDNA library representing the bacterial diversity of the EcoLink carrier biomass was generated. Twelve different sequences were found in the clone library using restriction and DGGE migration profiles. One of them was related to the NL23 isolate (*Hyphomicrobium zavarzinii*) but none were related to the NL8 or NL21 isolates. The biomass cell

concentration of those two isolates was possibly too low compared to the other bacteria, and several hundred clones would have been required in order to detect their 16S rDNA sequences. Including the NL8 and NL21 isolates, 14 different 16S rDNA sequences were identified from the denitrification biomass. Rarefaction analyses of the restriction and DGGE migration profiles resulted in an estimate of between 12 and 15 different clones in the library whereas the Chao 1 method gave an estimate of 14. The DGGE migration profiles representing the bacterial diversity of the Ecolink® and Bioflow® carriers revealed the presence of 10 to 15 bands. All these results suggest that the denitrification reactor comprises about 15 bacterial species and that our analysis identified most of them.

Sequence analyses revealed the prevalence (67/94) of clones related to *Methylophaga* members of the *gamma*-Proteobacteria/Piscirickettsia family. Those bacteria are known to occur in marine environments but are obligate aerobes (Janvier *et al.* 1985; Bowman *et al.* 1997). Their presence is therefore difficult to explain in a reactor dedicated to denitrification. It could be attributable to the low but significant level of dissolved oxygen in the denitrification reactor (0.3-0.8 mg O₂/L). The deaeration reactor reduces the oxygen level of incoming seawater from saturation level (9 mg O₂/L) to only 1.5 mg O₂/L. However, the methanol consumed by aerobic activity in the denitrification reactor has been estimated to represent only 1% of the methanol consumed by denitrification, the latter taking place in the anoxic zone of the biofilm. Consequently, the presence of dissolved oxygen could hardly explain the abundance of *Methylophaga* species. Instead, it is suggested that certain *Methylophaga* species which have not yet been isolated and characterized are capable of denitrification. A predominance of 16S rDNA sequences related to *gamma*-Proteobacteria was also found by PCR-DGGE in an acetate-fed denitrification reactor for saline metallurgic wastewater (Yoshie *et al.* 2001).

In other respects, the investigation of microbial diversity revealed that the bacterial composition of a marine denitrification system differs greatly from that of a freshwater denitrification system. The 16S rDNA library showed sequences related to bacteria found in marine or anoxic environments such as *Sulfitobacter mediterraneus* (Mediterranean Sea), (Pukall *et al.* 1999); mariculture system (Tal *et al.* 2003), *Delftia acidovorans*

(methanol-fed denitrification systems), (Neef *et al.* 1996), *Dechloromonas chlorophilus* (anaerobic chlorate reduction reactor), (Coates *et al.* 1999) and *Thiomicrospira denitrificans* (autotrophic denitrification systems), (Zhang and Lampe 1999). Two types of clones were also related to Planctomycetales and Candidate OP11. Planctomycetales are obligate anaerobes; some are involved in anaerobic ammonia oxidation (anammox bacteria) and are able to produce N₂ from ammonia and nitrite via hydroxylamine and hydrazine intermediates (Strous *et al.* 1999). The presence of Planctomycetales suggests that anammox occurred in the denitrification reactor and was partly responsible for the observed nitrate reduction. Planctomycetales have also been detected in a (denitrifying) moving bed bioreactor connected to a marine recirculating aquaculture system (Tal *et al.*, 2003). Candidates OP11 are uncultured bacteria that were observed first in 1998 in a hot spring at Yellowstone National Park (Hugenholtz *et al.* 1998), then in an anoxic marine environment (Bowman *et al.* 2000) and in groundwater (Watanabe *et al.* 2001). However, these results must be interpreted with caution. Mitochondria, chloroplasts or endosymbiont bacteria could produce 16S rDNA sequences resembling those identified in this study as Candidate OP11 and unclassified Proteobacteria (IAFDn30 and AIFDn69).

The PCR-DGGE analysis of the new Bioflow® carriers showed that it took 5 weeks for the bacterial biota to become established. In addition, the DGGE migration profiles of the plastic and cellulose carriers were almost identical, suggesting that the same denitrification microbiota colonized both carriers. Carbon sources and electron acceptors, both of which remained the same throughout this study, are probably more important than carrier type in determining the microbiota composition of a denitrification system. The PCR-DGGE analysis also suggests that the bacterial populations of a denitrification reactor remain stable over time.

The DGGE band representing *Hyphomicrobium* (band 16) was one of the last bands to appear in the DGGE profiles of the first 5 weeks, suggesting that *Hyphomicrobium* were the last to become established on the carriers. Eleven populations appeared at the beginning of the Bioflow® colonization (week 1). Those populations might be necessary for the establishment of the biofilm on the carriers and the attachment of

Hyphomicrobium and other bacterial species (Kolenbrander *et al.* 2002). In an experiment where *Pseudomonas putida* and *Hyphomicrobium* sp. strain ZV620 were co-cultured in a laminar flow-cell, Banks and Bryers (Banks and Bryers 1991) observed that the faster-growing *Pseudomonas putida* quickly became dominant in the biofilm, but that the slower-growing *Hyphomicrobium* sp. strain ZV620 remained established within the biofilm and continued to increase in number over time. Fluorescence *in situ* hybridization should help determine the community structure and interaction.

Finally, the results suggest that the SLM tank contained all the microorganisms needed to colonize the denitrification reactor. As expected, the samples collected from different SLM locations had different DGGE migration profiles. Those differences may arise from substrate type (algae, concrete or sand) or, in the case of the algae profile, from the 16S rDNA of the chloroplasts and mitochondria. But most differences are probably attributable to carbon sources and electron acceptors. For instance, tank sand contains more organic detritus than tank walls and, unlike tank walls, includes anoxic zones. Although the deaeration tank and denitrification reactor were both methanol-fed, their biomass used different electron acceptors - oxygen in the first case, nitrate in the second - and grew at different temperatures (11°C vs. ~20°C). As a result, their DGGE migration profiles were very different. In the DGGE migration profiles of samples from the sand and trickling filters, four or five bands were common. From a biological point of view, this result suggests that both treatment units play a similar role.

3.2.3.7 Acknowledgments

This research was supported by a grant to R. Villemur from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, by funding from the Montreal Biodome and by a scholarship to N. Labbé from the INRS-Institut Armand-Frappier. We are grateful to Rachel Léger, Head of Live Collections and Research, for her continuous support. We also wish to thank Jean Bouvrette, Mec. Eng. and Maintenance and Operations Manager, and the engineering staff of the Biodome for their technical help and cooperation. Brian Colwill, C.Tr., kindly revised the English style and grammar.

3.3 Article 3

3.3.1 Mise en contexte de l'article 3

L'environnement regorge de bactéries qui n'ont pas encore été cultivées et décrites. L'exploration d'écosystèmes particuliers, tel celui du dénitrificateur marin du Biodôme de Montréal, permet un enrichissement de bactéries qui sont peu favorisées à l'ordinaire. Lors de la caractérisation des microorganismes du dénitrificateur (article 2), une souche non apparentée aux espèces connues jusqu'à présent a été isolée.

En microbiologie, la découverte d'une nouvelle bactérie permet de toucher à plusieurs techniques tels les acides gras membranaires, le ratio guanine-cytosine (% G+C) de l'ADN et une caractérisation des sources de carbones utilisées par la bactérie. La caractérisation implique également une analyse phylogénétique complète afin de classer la bactérie dans le groupe auquel elle appartient. Du point de vue des connaissances, la découverte d'une nouvelle bactérie permet d'augmenter l'information disponible pour la reconstruction de l'arbre de la vie et le profil évolutif des organismes.

Cet article présente *Nitratireductor aquibiodomus* un nouveau genre et espèce bactérien isolé du dénitrificateur du Biodôme de Montréal.

3.3.2 Contribution de l'étudiant à l'article 3

Les travaux présentés dans cet article ont tous été effectués par l'étudiant sous la supervision du Dr Parent et du Dr Villemur, sauf la caractérisation des acides gras membranaires laquelle a été effectuée par M. Serge Messier à la faculté de médecine vétérinaire à St-Hyacinthe. Les Drs Villemur et Parent ont également contribué à la rédaction et à la révision de l'article.

3.3.3 Article 3

Nitratireductor aquibiodomus gen. nov., sp. nov., a new *alpha*-proteobacterium isolated from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada).

Normand Labbé¹, Serge Parent² and Richard Villemur*¹

¹ INRS - Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval H7V 1B7, Canada

² Biodôme de Montréal, 4777 Pierre-De Coubertin, Montreal H1V 1B3, Canada

*Author to whom all correspondence should be addressed.

Richard Villemur

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, Québec, Canada

H7V 1B7

Phone: 450-687-5010

Fax: 450-686-5501

E-mail: richard.villemur@iaf.inrs.ca

Key words: Phyllobacteriaceae, *Nitratireductor aquibiodomus*, *alpha*-Proteobacteria, seawater,

Running title: *Nitratireductor aquibiodomus*

Subject categories: new taxa, Proteobacteria

The GenBank accession number for the 16S rDNA gene sequence of strain NL21^T is AF534573.

Cet article a été publié dans la revue International journal of systematic and evolutionary microbiology (2004), 54(1):269-73.

3.3.3.1 Résumé

Le Biodôme de Montréal opère une filière de dénitrification alimentée avec du méthanol pour le traitement de l'eau de mer de son aquarium de trois millions de litres. Une bactérie inconnue, la souche NL21^T, a été isolée de ce système. Elle croît sur des géloses de type TSA et R2A. Ce bâtonnet (1 x 3 microns) à parois Gram négative est aérobie facultatif. Ses conditions optimales de croissance sont entre 30-35°C, pH 7-7,5, et 1% NaCl. L'analyse phylogénétique de son gène 16S ribosomal révèle que la souche NL21^T s'apparente à la famille des Phyllobacteriaceae dans le deuxième sous groupe des *alpha*-protéobactéries. Les genres bactériens les plus près sont *Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*, *Aminobacter*, *Pseudaminobacter* et *Defluviobacter*. Les acides gras membranaires les plus abondants sont le 18:1 ω7c (75%), le 19:0 cyclopropane ω8c (9.4%) et le 18:0 (4.2%). Le pourcentage G+C de la souche NL21^T est de 57 mol% et diffère des autres Phyllobacteriaceae (60-64 mol%). La souche NL21^T réduit le nitrate en nitrite mais ne peut le transformer en azote gazeux (N₂). Seulement quelques sucres et acides aminés peuvent servir de source de carbones. NL21^T tolère jusque 5% de NaCl. Tant l'analyse phylogénétique, physiologique que biochimique de la souche NL21^T ont différé des autres genres microbiens validement décrits. La souche NL21^T représente un nouveau genre et une nouvelle espèce nommés *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov. sp. nov.

3.3.3.2 Abstract

The Montreal Biodome operates a methanol-fed denitrification system that treats the water in its 3 million liter marine mesocosm. An unknown bacterium, named strain NL21^T, was isolated from this system on TSA and R2A agars. The organism is a Gram-negative, rod-shaped (1 μm x 3 μm) facultative aerobe. Optimal growth conditions on R2A are 30-35°C, pH 7-7.5 and 1% w/w NaCl. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequence revealed that strain NL21^T is a new lineage in the Phyllobacteriaceae family within the *alpha*-2 subgroup of Proteobacteria. The closest related genera are *Aminobacter*, *Pseudaminobacter*, *Mesorhizobium* and *Defluviobacter*. Major cellular fatty acids were 18:1 ω7c (75%), 19:0 cyclopropane ω8c (9.4%) and 18:0 (4.2%). The DNA G+C content of strain NL21^T (57 mol%) differs from all other Phyllobacteriaceae (60-64

mol%). Strain NL21^T reduces nitrate to nitrite but does not reduce nitrite to nitrogen gas. Only a few sugars and amino acids can serve as carbon sources. Strain NL21^T is able to grow without salt and is tolerant to up to 5% NaCl. Phylogenetic analysis as well as physiological and biochemical tests showed that strain NL21^T was different from all other validly described Phyllobacteriaceae. Strain NL21^T therefore represents a new genus, for which the name *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov. is proposed, with type strain = DSM 15645 = ATCC BAA-762.

3.3.3.3 Introduction

Nitrate is a pollutant which quickly accumulates in closed systems such as marine aquariums. It is usually biologically removed in a denitrification system where oxygen is replaced with nitrate as an electron receptor in bacterial respiration. A large variety of bacterial species are able to reduce nitrate to nitrite or to molecular nitrogen (see Zumft (1997)) for an exhaustive list). Many of those species belong to the Phyllobacteriaceae family of *alpha*-Proteobacteria comprising the genera *Phyllobacterium* (Knösel 1984), *Aminobacter* (Urakami *et al.* 1992), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.* 1997), *Pseudaminobacter* (Kampfer *et al.* 1999), *Defluviobacter* (Fritsche *et al.* 1999) and *Aquamicrobium* (Bambauer *et al.* 1998). This family was originally described by Knösel (1984). It may also contain the uncharacterized strain BIG-2 isolated by Duncan *et al.* (Duncan *et al.* 2001) and the *Mesorhizobium* strain WG recently isolated from a denitrification process by Costa *et al.* (Costa *et al.* 2000).

During the characterization of organisms isolated from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Labbé *et al.* 2003), strain NL21^T was recovered on R2A and TSA agars. Sequence analysis of the 16S ribosomal RNA gene (rDNA) revealed that this bacterium was related to the family of Phyllobacteriaceae. The goal of the present study was to further characterize strain NL21^T and to classify it within the Phyllobacteriaceae.

3.3.3.4 *Methods, results and discussion*

Gram staining was performed as described by Gerhardt *et al.* (1994). Cell morphology was observed under a Nikon light microscope at 1000X with cells grown for three days at 35°C. Physiological characteristics were investigated using API systems. API 50CH strips inoculated with the medium described by Velazquez *et al.* (2001) were used for acid production and sugar assimilation. API 20NE strips were used for biochemical reactions (nitrate reduction, nitrite reduction, urease, indole formation) and the assimilation of selected carbon sources. API ZYM strips were used to examine extra-cellular enzyme activity. Strips were incubated at 30°C for 72 hours (API 50CH and API 20NE) or 24 hours (API ZYM). Strain NL21^T differs from most Phyllobacteriaceae by being positive for citrate assimilation, negative for urease and positive for the presence of N-acetyl-beta-glucosamidase (Table 3-6). Other differences in substrate assimilation between NL21^T and other Phyllobacteriaceae are shown in Table 3-6.

Table 3-6: Physiological characteristics of the *Phyllobacteriaceae*.

	<i>Pseudaminobacter</i>	<i>Aminobacter</i>	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Defluviobacter</i>	
	NL21	<i>salicylatoxidans</i>	<i>aminovorans</i>	<i>myrsinacearum</i>	<i>tianshanense</i>	<i>lusatiensis*</i>
	DSM15645	DSM 6986	DSM 7048	LMG 6465	DSM 11417	DSM 11099
Major fatty acid [#]	18:1 ω7c	18:1 ω7c	18:1 ω7c	18:1 ω7c	18:1 ω7c	18:1 ω7c
	19:0 ω8c	19:0 cyclo ω8c	19:0 ω8c	16:0	19:0 cyclo ω8c	19:0 cyclo ω8c
	18:0	17:0	16:0	16:0 3-OH	16:0	16:0
nitrate reduction	+	+	-	-	+	-
nitrite reduction	-	-	-	-	-	-
urease	-	+	+	+	+	-
esculin	-	-	-	(+)	+	-
Assimilation of:						
adipate	(+)	(+)	(+)	-	-	-
malate	(+)	(+)	-	+	+	v
citrate	+	-	-	(+)	-	-
sucrose	-	-	+	+	+	-
gluconate	-	-	-	-	+	+
adonitol	-	+	-	+	+	+
trehalose	-	-	+	+	+	-
D-xylose	-	+	+	-	v	v
galactose	-	v	+	(+)	+	-
D-turanose	-	-	+	+	-	-
rhamnose	-	-	+	+	+	-
mannitol	-	+	+	+	+	-
Maltose	-	-	+	+	+	-
Sorbitol	-	+	+	+	+	ND
Extracellular activity of:						
NAG [†]	+	-	-	-	+	ND
Esterase C4	+	-	+	+	+	ND
Esterase-lipase C8	+	-	+	+	+	ND
β-	-	-	-	-	(+)	-

Table 3-6: Physiological characteristics of the *Phyllobacteriaceae*. (Suite)

	<i>Pseudaminobacter</i> NL21 DSM15645	<i>Aminobacter</i> <i>salicylatoxidans</i> DSM 6986	<i>aminovorans</i> DSM 7048	<i>Phyllobacterium</i> <i>myrsinacearum</i> LMG 6465	<i>Mesorhizobium</i> <i>tianshanense</i> DSM 11417	<i>Defluviobacter</i> <i>lusatiensis</i> * DSM 11099
galactosidase						
β-	-	-	-	-	+	ND
glucosidase						
α-	-	-	-	+	-	ND
chymotrypsin						
G+C (mol%) [#]	57	63.9	62.5	60-61	59-63	61.4

All strains were positive for assimilation of D-glucose, D-arabinose, D-fructose, ribose, D-xylose and L-fucose.

All strain were positive for presence of alkaline phosphatase, acid phosphatase, leucine arylamidase, cysteine arylamidase, trypsin, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and α-glucosidase.

All strain were negative for indole formation, gelatinase; assimilation of caprate, phenyl-acetate, salicin, inulin, starch, erythritol.

All strain were negative for the presence of α-galactosidase, β-glucuronidase, α-mannosidase, α-fucosidase and lipase C14.

*Data from Fritsche et al. (1999) and Lechner et al. (1995).

Data from Kampf et al. (1999) for *Pseudaminobacter salicylatoxidans*; from Urakami et al. (1992) for *Aminobacter aminovorans*; from Knösel (1984) for *Phyllobacterium myrsinacearum*; from Chen et al. (1995) for *Mesorhizobium tianshanense*.

Data from Kampf et al. (1999) for *Pseudaminobacter salicylatoxidans* and for *Aminobacter aminovorans*; from Mergaert et al. (2002) for *Phyllobacterium myrsinacearum*; from Tighe et al. (2000) for *Mesorhizobium tianshanense*.

ND: not determined, + positive reaction, - negative reaction, (,) weak positive reaction.

† NAG: N-acetyl-β-glucosamidase

The fatty acid profile was traced with cells grown on TSA for three days at 35°C. The analysis was carried out in accordance with the standard protocol of the Microbial Identification system (MIDI: Microbial ID). The major cellular fatty acids of strain NL21^T are 18:1 ω 7c (75%), 19:0 cyclo ω 8c (9.4%) and 18:0 (4.2%). This profile supports the affiliation of strain NL21^T to Phyllobacteriaceae where most species have 18:1 ω 7c and 19:0 cyclo ω 8c as major components. The fatty acid profile of strain NL21^T (Table 3-7) differs from that of all *Mesorhizobium* species (Tighe *et al.* 2000) because of the absence of 11 methyl 18:1 ω 7c. The two genera also have different hydroxy fatty acids. Compared to *Pseudaminobacter*, strain NL21^T has a lower amount of 17:0 and 19:0 cyclo ω 8c and a higher amount of 18:1 ω 7c. Compared to *Aminobacter*, NL21^T has a higher amount of 18:1 ω 7c, less unknown fatty acids, and different hydroxylate fatty acids (Table 3-7). Compared to *Phyllobacterium*, strain NL21^T has 17 carbon long fatty acids (17:0, 17:1, 17 iso, 17 cyclo) and different hydroxy fatty acids. Finally, it differs from *Defluviobacter* in that it lacks 16:1 ω 7c, 20:1 ω 7c, 12:0 3-OH and 19:0 10 methyl fatty acids. Additional differences in fatty acid profiles are shown in Table 3-7.

Table 3-7: Fatty acids profile of *Phyllobacteriaceae* bacteria.

Taxa: 1. *Aquabiodomus nitratireducens* NL21^T DSM 15645, 2. *Pseudaminobacter salicylatoxidans* DSM 6986 (data from Kampfer *et al.* 1999), 3. *Aminobacter aminovorans* DSM 7048 (data from Kampfer *et al.* 1999), 4. *Phyllobacterium myrsinacearum* LMG 2t2 (data from Mergaert *et al.* 2002), 5. *Mesorhizobium tianshanense* DSM 11417 (data from Tighe *et al.* 2000), 6. *Defluviobacter lusatiensis* DSM 11099 (data from Lechner *et al.* 1995).

Fatty acids:	1	2	3	4	5	6	
Saturated fatty acids	16:0	2.16	2.3	4.9	6	12.25	4.33
	17:0	1.72	9.1	0.7		0.83	2.08
	18:0	4.23	2.6	1.5	2.1	4.99	2.29
	20:0				4.4		
Unsaturated fatty acids#	15:1 ω8c						
	16:1 ω7c						1.22
	17:1 ω8c	0.59	3.4	0.7		0.52	2.08
	17:1 ω6c	0.54	1.2			0.11	1.01
	18:1 ω7c [†]	75.01			64.9		
	18:1 ω9c	0.61					
	19:1 ω12t		1.3				
	20:1 ω7c	0.48					
	20:1 ω9t		0.6	0.8			1.55
	20:2 ω6,9c		0.6				
	15:0 iso		1.2			0.16	
	17:0 iso	1.93	1.5	1		3.34	
	Hydroxy fatty acids	12:0 3-OH			0.3		0.09
13:0 iso 3-OH						0.27	
15:0 iso 3-OH		1.86	0.5				
16:0 3-OH					5.7		
18:0 3-OH		0.52					

Table 3-7: Fatty acids profile of *Phyllobacteriaceae* bacteria. (Suite)

Taxa: 1. *Aquabiodomus nitratreducens* NL21[†] DSM 15645, 2. *Pseudaminobacter salicylatoxidans* DSM 6986 (data from Kampfer *et al.* 1999), 3. *Aminobacter aminovorans* DSM 7048 (data from Kampfer *et al.* 1999), 4. *Phyllobacterium myrsinacearum* LMG 2t2 (data from Mergaert *et al.* 2002), 5. *Mesorhizobium tianshanense* DSM 11417 (data from Tighe *et al.* 2000), 6. *Defluviobacter lusatiensis* DSM 11099 (data from Lechner *et al.* 1995).

Fatty acids:	1	2	3	4	5	6
18:1 2-OH	5.2					
Cyclopropane acids						
17:0 cyclo	0.5			0.16		
19:0 cyclo ω8c	9.35	25.4	13.7	4.8	12.37	3.92
Others						
19:0 10 methyl					0.16	0.4
11 methyl 18:1 ω8c					9.99	
Summed feature 2*					4.7	
Summed feature 3	0.56	0.4	0.5	2.3	0.06	
Summed feature 5	0.42					
Summed feature 7	43.4		46.4		53.22 80.48	
Unknown	1	6.7	26.4			

*Summed feature 2 comprises any combination of 12:0 aldehyde, 14:0 3-OH and 16:1 iso.

Summed feature 3 comprises any combination of 15:0 iso 2-OH and 16:1 ω7c.

Summed feature 5 comprises any combination of 18:0 ANTE + 18:2 ω6,9c

Summed feature 7 comprises any combination of 18:1 ω7c, 18:1 ω9t and 18:1 ω12t

For unsaturated fatty acids, the position of the double bond is located counting from the methyl (ω) end of the carbon chain. Cis and trans isomers are indicated by the suffixes c and t, respectively.

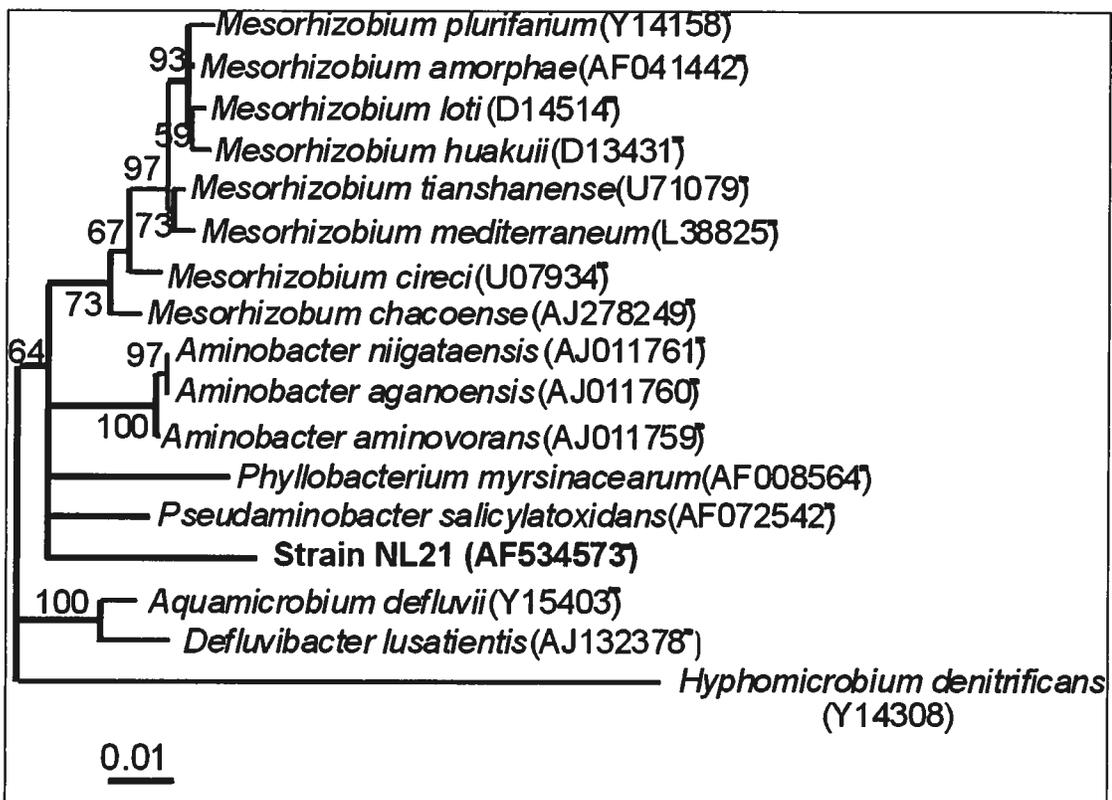
† This unsaturated fatty acid is also included in summed feature 7

DNA extraction was performed by dispersing strain NL21^T colonies in 250 µL of TEN (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0 and 150 mM NaCl) and then mixing them with 250 mg of sterilized 0.4-0.5 mm glass beads (B. Braun Co. Melsungen, Germany). The DNA pellet was prepared as described by Labbé et al. (2003) and was then washed with 70% ethanol and resuspended in 50 µL of water.

The DNA base composition of strain NL21^T was determined as described by Mesbah et al. (1989) using two 15 cm C18 columns. Lambda DNA was used for calibration while salmon sperm served as control. The G+C content of NL21^T was lower than other characterized *Phyllobacteriaceae* (57 mol% vs 60-64 mol%). The 16S rDNA sequence of NL21^T was reported by Labbé *et al.* (2003) (accession number AF534573). Both DNA strands of the resulting PCR product were sequenced.

Sequences were analyzed using BioEdit software, version 5.0.9.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>). Comparisons of bacterial sequences in gene databases were done with the BLASTN program (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The CLUSTALW program 1.4 included in the BioEdit software package was used to align sequences. Phylogenetic analyses were carried out with software applications from PHYLIP package 3.5 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). A bootstrap of 1000 replicates was derived using the SEQBOOT program. The DNADIST program was used to generate a distance matrix for each bootstrap replicate. Each number in the matrix represented the distance between a pair of sequences. The FITCH program was used to calculate a tree according to the Fitch and Margoliash algorithm. Lastly, the CONSENSE program was used to derive consensus trees. The strain designation and 16S rDNA accession numbers of the reference strains are given in Fig. 3-8.

Figure 3-8: Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences. Evolutionary distance among rDNA of strain NL21 and representative members of related genera is illustrated by an unrooted phylogenetic tree (*Hyphomicrobium denitrificans* was used as outgroup species). The tree was inferred from a matrix of pairwise distances using 1,400 nucleotides (DNADist). The FITCH program was used to derive the best phylogenetic tree for each replicate. Lastly, the CONSENSE program was used to derive the consensus tree. The scale bar indicates 0.1 nucleotide substitution per position. Number indicates the percentage of 1,000 bootstrap resamplings. Only values above 50% are shown.



Representative members of Phyllobacteriaceae showed sequence similarity of approximately 95% with strain NL21^T. The closest validly described species of strain NL21^T were *Mesorhizobium tianshanense* and *Mesorhizobium chacoense* (95.1%). However, phylogenetic analysis showed that strain NL21^T is not closely related to any genera within the Phyllobacteriaceae family (Fig. 3-8). Parsimony and neighbor joining analyses were also done with the Phylip software (DNAPars and NJ). These two methods

produced phylogenetic trees similar to the consensus tree. Sequence similarity analysis also revealed that strain NL21^T shows 99.8% similarity (only 3 different nucleotides) with the as yet undescribed strain TUT1018 (GenBank annotation AB098586) which was isolated from a biowaste sequence-batch composting system.

3.3.3.5 Description of *Nitratireductor* gen. nov.

Nitratireductor (gen. nov.) (ni.tra.ti're.duc.tor. L. neut. n. nitras nitrate; L. v. reducto reducing; nitratereducing bacterium).

Gram-negative rods are 1 µm in diameter and 2-3 µm in length. Bacterium multiplies by budding. Cells are pleomorphic in rapid growth, motile as well as oxidase and catalase positive. Colonies on R2A agar are white, 2-3 mm in diameter, smooth, circular and convex. Optimum growth conditions are 30-35°C and pH 7-7.5. No growth occurs under pH 7. Major fatty acids are 18:1 ω7c (75%), 19:0 cyclo ω8c (9.4%) and 18:0 (4.2%). G+C content is 57 mol%. Physiological characteristics are shown in Table 3-6.

Phylogenetically, the genus is a member of the *alpha*-subclass of *Proteobacteria*. The type species is *Nitratireductor aquibiodomus*.

3.3.3.6 Description of *Nitratireductor aquibiodomus* sp. nov.

Nitratireductor aquibiodomus (aqui'bio.do.mus L. fem. n. aqua water, L. fem. n. biodomus Biodome; Bacteria living in the water of the Montreal Biodome).

Description is the same as for the genus. Cells can reduce nitrate to nitrite but not to nitrogen gas. NaCl was not required for growth but 1% stimulated growth. Strain NL21^T can grow in a range of 0-50 g/L of NaCl. Physiological characteristics are shown in Table 3-6. The type strain is NL21^T (DSM 15645, ATCC BAA-762).

3.3.3.7 *Acknowledgments*

This research was supported by a grant to R. Villemur from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, by funding from the Montreal Biodome and by a scholarship to N. Labbé from the INRS-Institut Armand-Frappier. We are grateful to Encarna Velazquez for providing *Phyllobacterium myrsinacearum* and to Serge Messier for the fatty acid analysis. Brian Colwill, C.Tr., kindly revised the English style and grammar of this paper.

3.4 Article 4

3.4.1 Mise en contexte de l'article 4

Le domaine de l'écologie microbienne est en plein essor. La connaissance du dynamisme microbien et de fonctionnalité indique le rôle des différents organismes au sein d'une population. Dans l'article présenté ci-dessous, le profil diversité bactérienne du dénitrificateur marin du Biodôme de Montréal est présenté par une approche moléculaire : l'hybridation *in situ* fluorescente. Cette technique a également été couplée à la microautoradiographie afin de déterminer les espèces bactériennes responsables de la dénitrification avec méthanol dans le procédé. Une originalité de l'étude a consisté en l'utilisation de biofilm intact pour l'hybridation *in situ* fluorescente. La majorité des études utilise des biofilms désagrégés ou encore des coupes minces. L'utilisation d'un biofilm entier a permis de mieux observer les interactions possibles entre les groupes microbiens et la structure du biofilm. L'ajout d'une trappe à CO₂ dans les expériences de microautoradiographie a aussi permis de contrôler la réassimilation de CO₂ radiomarqué par les microorganismes.

3.4.2 Contribution de l'étudiant à l'article 4

Les travaux présentés dans cet article ont été effectués par l'étudiant sous la supervision du Dr Parent et du Dr Villemur. Ceux-ci ont également contribué à la rédaction et à la révision de l'article. Les travaux portant sur l'identification des protozoaires ont été effectués par Véronique Laurin.

3.4.3 Article 4

Microbiological community structure of the biofilm of a methanol-fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms.

Normand Labbé¹, Véronique Laurin¹, Pierre Juteau¹, Serge Parent² and Richard Villemur^{1*}

¹ INRS - Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval H7V 1B7, Canada

² Biodôme de Montréal, 4777 Pierre-De Coubertin, Montréal H1V 1B3, Canada

*Author to whom all correspondence should be addressed.

Richard Villemur

INRS-Institut Armand-Frappier

531 Boul. des Prairies

Laval, Qc, Canada

H7V 1B7

Phone: 450-687-5010

Fax: 450-686-5501

E-mail: richard.villemur@iaf.inrs.ca

Keywords: denitrification, seawater, *Methylophaga*, *Hyphomicrobium*, FISH, MAR-FISH, PCR-DGGE

Running title: Colonization of marine denitrification system.

Cet article a été accepté pour publication dans la revue « Microbial ecology » et est actuellement sous presse (2006).

3.4.3.1 Résumé

Nos études antérieures montrent que la flore microbienne du dénitrificateur marin alimenté en méthanol du Biodôme de Montréal se compose d'au moins 15 phylotypes bactériens. Parmi ceux-ci, plus de 70% des séquences retrouvés dans la génothèque s'affilie au genre *Methylophaga*. Dans cette étude, nous avons examiné la colonisation du biofilm dénitrifiant par la technique de l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) pour déterminer l'abondance relative de différents groupes microbiens. Nos résultats ont montré que le groupe des *gamma*-protéobactéries, principalement des *Methylophaga* spp., représentait jusqu'à 79% de la population bactérienne. Cela confirme la prééminence du groupe des *Methylophaga* dans le biofilm à l'étude. Les *alpha*-protéobactéries constituent de 27 à 57% de la flore bactérienne. Les *Hyphomicrobium* représentaient entre 7 et 8% de la population à partir de la 20^e journée de colonisation. Nous avons également noté l'abondance et la diversité des microorganismes eucaryotes, lesquelles représentaient 20% du biovolume dans un biofilm jeune, mais seulement 3-5% dans le biofilm mature. Nous avons combiné le FISH à la microautoradiographie (MAR-FISH) pour identifier les bactéries méthylotrophes et dénitrifiantes présentes dans le biofilm. Nos résultats montrent que les *alpha*-protéobactéries du biofilm ont utilisé le méthanol en condition dénitrifiante avec nitrate. Malgré leur abondance, les *Methylophaga* spp. n'ont pas assimilé pas le méthanol dans ces mêmes conditions.

3.4.3.2 Abstract

We demonstrated in a previous study that the biofilm of the methanol-fed fluidized marine denitrification reactor at the Montreal Biodome was composed of at least 15 bacterial phylotypes. Among those were 16S ribosomal RNA (rDNA) gene sequences affiliated to *Hyphomicrobium* spp., and *Methylophaga* spp.; this last one made up 70% of a clone library. By using fluorescent *in situ* hybridization (FISH), we investigated the structure of the biofilm during the colonization process in the denitrification reactor by targeting most of the bacterial families that the 16S rDNA gene library suggested they would occur in the biofilm. Our results revealed that *gamma*-Proteobacteria (mostly *Methylophaga* spp.) accounted for up to 79% of the bacterial population, confirming the abundance of *Methylophaga* spp. within the biofilm. *Alpha*-Proteobacteria represented 27

to 57% of the population, which included *Hyphomicrobium* spp. that appeared after 20 days of colonization and represented 7 to 8% of the population. We noticed a great abundance and diversity of eukaryotic cells, which made up 20% of the biomass at the beginning of the colonization but decreased to 3 to 5% in the mature biofilm. We then used FISH combined with microautoradiography (MAR-FISH) to identify the methylotroph in the biofilm. The results showed that *alpha*-Proteobacteria used ^{14}C methanol in the presence of nitrate suggesting their involvement in denitrification. Despite their abundance, *Methylophaga* spp. did not assimilate methanol in those conditions.

3.4.3.3 Introduction

The concentration of nitrate is rarely over 1 mg/L in natural environments (Yeats, 1990). However, in closed circuit aquaria, nitrate can rapidly reach 50 mg NO_x-N/L (Grguric *et al.*, 2000; Parent and Morin, 2000), a level that can be toxic to invertebrates and fishes. Based on various nitrate toxicity studies on aquatic animals, Camargo *et al.* (2005) recommended that 20 mg N/L be the upper acceptable limit of nitrate in marine aquaria. In large marine aquaria such as the Montreal Biodome, maintaining that level requires large and frequent changes of artificial seawater, which is difficult and expensive.

Various methods such as reverse osmosis, resin or electrochemistry are currently used to remove nitrate from freshwater (Schaezel *et al.* 2004; Shrimali *et al.* 2001). Those methods have little use in seawater and are replaced by biological denitrification. Denitrifying bacteria use nitrate as an electron acceptor when oxygen becomes a limiting factor. A variety of enzymes are used in this respiratory chain that reduces nitrate to nitrogen gas (Zumft, 1997).

Few studies on denitrification in saltwater or seawater have been published. Grguric *et al.* (2000) studied the performance of a commercial, methanol-fed denitrification reactor similar to the one installed at the Montreal Biodome. They presumed that *Pseudomonas* spp. were involved in the process. Catalan-Sakairi *et al.* (1996; 1997) achieved very high denitrification efficiency by treating artificial wastewater containing 30 g/L of NaCl with

methanol and porous cellulose carriers, in which *Hyphomicrobium* spp. were detected. By using cultivation methods and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified 16S ribosomal DNA (rDNA) genes, Yoshie *et al.* (2001; 2004; 2005) found that *Halomonadaceae* spp. were the dominant bacterial group actively involved in an acetate-fed denitrification process for saline metallurgic wastewater (over 3.2% NaCl). Tal *et al.* (2003) recently developed a denitrification process for closed maricultures using *Pseudomonas* sp. immobilized in a starch-alginate matrix that also served as a carbon source.

The functionality of microorganisms in an environmental sample can be investigated using techniques such as microautoradiography combined with fluorescent *in situ* hybridization (MAR-FISH), and stable isotope probing (SIP). Those techniques are based on the assimilation by biologically active microorganisms of a substrate marked with a radioactive or stable isotope (Ginige *et al.*, 2004; Hesselsoe *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 1999). By means of MAR-FISH analysis, Ginige *et al.* (2004) suggested that members of Methylophilales were the active denitrifying population of a laboratory-scale methanol-fed system. Radajewski *et al.* (2002) used SIP to investigate methanol-utilizing organisms in soil and found that *Acidobacterium* and *Beijerinckia* actively took up methanol in acidic soil.

The Montreal Biodome operates a large closed marine aquarium referred to as the St. Lawrence Mesocosm (SLM) (Parent and Morin, 2000). Water salinity and temperature are 28 g/L and 10°C. A methanol-fed fluidized denitrification reactor was integrated into the SLM life support system in 1998. Methanol is the carbon source most frequently used in denitrification systems because it is inexpensive, easily available and it produces less biomass than other carbon sources (Bilanovic *et al.*, 1999; Lemmer *et al.* 1997). In earlier investigations, we characterized the microbiota present into the biofilm on the fluidized carriers of the denitrification reactor by cultivable and molecular techniques. Three different isolates were isolated which were affiliated with *alpha*-Proteobacteria, including two known denitrifying bacteria -- *Hyphomicrobium zavarzinii* and *Paracoccus denitrificans* -- and a newly described bacterium -- *Nitratireductor aquibiodomus* (Labbé

et al., 2003; Labbé *et al.*, 2004). Using a 16S rDNA gene library, we estimated at 15 the number of different phylotypes present into the biofilm (Labbé *et al.*, 2003). For instance, sequences related to *Methylophaga* spp. (*gamma*-Proteobacteria) composed more than two-third of clones found in this library, suggesting they are in high abundance into the biofilm. However, these methylophags are not known to grow in denitrifying conditions. Bias introduced by DNA extraction, PCR amplification and sequence cloning could explain the high percentage of clones of these unexpected bacteria.

Our research investigates the link between the phylotypes found in the methanol-fed marine denitrification system of the Montreal Biodome and their functions. In this report, we monitored the colonization of the reactor using PCR-amplified 16S rDNA gene sequences migrated on PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), evaluated the abundance of the microorganisms in the biofilm by means of FISH, and determined which of the major biofilm constituents – *Methylophaga* spp., *Hyphomicrobium* spp. and *alpha*-Proteobacteria – were methanol-utilizing bacteria in the presence of oxygen, nitrate or nitrite as electron acceptors by MAR-FISH.

3.4.3.4 *Materials and methods*

3.4.3.4.1 *The SLM denitrification system*

The SLM denitrification system operates in a circuit parallel to the main life support system. It comprises a 1 m³ deaeration tank, a 1 m³ denitrification reactor and an overflow tank. The deaeration tank is a fixed-bed reactor filled with 9 cm NuPac® plastic packing. The reactor is a fluidized-bed type which contained 0.3 m³ of Bioflow® 9 mm carriers (1.020 density; Rauschert, Steinwiessen, Germany). The deaeration tank and reactor are both methanol-fed. Water temperature in the reactor varies between 16-18°C depending on the water flow. Twice a day, 370 mg FeSO₄·7H₂O, 130 mg MnSO₄·4H₂O and 20 mg CuSO₄·5H₂O are added to the denitrification unit to enhance the denitrification rate (Labbé *et al.*, 2003). The nitrate removing performance of the system during the colonization experiment varied from 65 to 90%.

3.4.3.4.2 Biofilms sampling

The slides were incubated between 7 and 37 days in order to monitor the colonization process and to preserve the biofilm integrity. One to two cm² of biofilm was left on each collected slide for the FISH analysis, and the rest of it was preserved for DNA extraction and DGGE analysis. The biofilm was fixed by soaking the slides for two hours at 4°C in a freshly prepared 4% paraformaldehyde solution buffered at pH 7.2. The slides were then washed three times with PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7.2) and kept at -20°C until further use.

3.4.3.4.3 DNA extraction and PCR-DGGE

Each sample of biofilm collected for DNA extraction was mixed with 500 µL of TEN (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM EDTA pH 8.0 and 150 mM NaCl), 250 mg of glass bead and 500 µL of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). The biofilm was broken twice for 20 s with FastPrep and then centrifuged at 16,000 g for 10 min. The supernatant was extracted once with chloroform/isoamyl alcohol (24:1). DNA was precipitated by adding 0.25 volume of 10 M ammonium acetate and two volumes of 95% ethanol. The resulting pellet was resuspended in 50 µL of water.

PCR amplifications of 16 rDNA genes were performed as described by Labbé *et al.* (2003) with approximately 25 ng of total DNA or 10 ng of plasmid DNA corresponding of clones isolated from a 16S rDNA gene library derived from the denitrification reactor and representing *Methylophaga* spp., candidate OP11 and *Hyphomicrobium* spp. Primer 341f with a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGG CAGCAG-3') and primer 534r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') were used and resulted in 250-bp DNA fragments. DGGE were done using the D-code system (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON) with PCR products (approximately 300 ng) electrophoresed onto 8% polyacrylamide gels (acrylamide: N-N'-methylene bisacrylamide 37.5:1) containing a linear denaturing gradient (100% denaturing gel contained 7 M urea and 40% deionized formamide). Electrophoresis was carried out using a TAE running buffer (40 mM Tris-HCl, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)

for 16 hours at 100 volts and 60°C. The gels were stained with ethidium bromide (10 µg/mL).

3.4.3.4.4 FISH

The biofilm samples collected on slides for FISH analysis were permeabilized with 70% ethanol for 48 hours at 4°C. They were then dehydrated with 95% ethanol. Prior to the FISH, samples were acetylated to limit non specific hybridization: 12.5 µL of acetic anhydride were added to 5 mL of triethanolamine buffer and drops were left over the samples for 15 min before being washed out with water (Lanthier *et al.* 2005). The fluorescent probes (AlphaDNA, Montreal, Canada) used are listed in Table 3-8. A probe concentration of 30 ng/µL was used for thick biofilm samples (Thurnheer *et al.* 2004), whereas a probe concentration of 10 ng/µL was used for thin or dispersed biofilm samples (MAR-FISH). Samples were incubated with the appropriate hybridization buffer (Table 3-8) in small sealed chambers for 3 hours at 46°C, then for 2 min at 48°C. Samples were then washed for 20 minutes with a washing buffer having the appropriate NaCl concentration (Table 3-8). FISH samples were mounted with Vectashield™ antifading agent (Vector laboratories, Burlingame, California, USA) whereas MAR-FISH samples were mounted with Prolong™ Gold agent (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). The antifading agent Vectashield™ remained aqueous throughout the microscopic observation period and maintained the hydration of the biofilm. It was very useful when unknown or uncultured organisms had to be observed. It also preserved biofilm integrity and cells size. The use of the antifading agent Prolong™ gold dried before the start of the microscopic observations, which allowed longer preservation of the slide samples and provided a better superposition of the MAR and FISH signals. A hybridization control with probe NON338 did not produce any nonspecific signal. An autofluorescent control resulted in a few autofluorescent signals in the green and red channels. Each FISH experiment was done with 10-15 samples.

Table 3-8 : List of probes used in this study

Probe name	Usual name	Sequence	Fluorochrome	Target	%Formamide/NaCl	References
S-Sc-aProt-0019-a-A-17	Alf1B	5' CGTTCGYTCTGAGC CAG 3'	FITC	<i>Alpha, delta</i> and spirochetes	20% / 210 mM	Manz et al. 1992
S-*-Bact(D,V)-0338-a-A-18	Eub3 38-mix	5' GCWGCCWCCCGTA GGWGT 3'	CY5	Almost all bacteria	0-35% / 900-70 mM	Amann et al. 1990, Daims et al. 1999
	Euk5 16	5'ACCAGACTTGCCC TCC 3'	FITC	most eukarya	35% / 70 mM	Amann et al. 1990
L-C-gProt-1027-a-A-17	Gama42a	5'GCCTTCCCACATC GTTT 3'	CY3	<i>Gamma-Proteobacteria</i>	35% / 70 mM	Manz et al. 1992
	MPII-730	5' CAGTAATGGCCCAG TGAGTCGCC 3'	CY3	Genus <i>Methylophaga</i> spp. except <i>natronica</i>	20% ^a / 210 mM	Janvier et al. 2003
S-*-OTU14-0129-a-A-20		5' TCCGTACCGATAGG AAGATT 3'	CY3	<i>Hyphomicrobium</i> spp.	20% / 210 mM	Juretscko et al. 2002
L-C-bProt-1027-a-A-17	Bet42a	5' GCCTTCCCCTTCG TTT 3'	FITC	<i>Beta-Proteobacteria</i>	35% / 70 mM	Manz et al. 1992
	NON 338	5' ACTCCTACGGGAGG CAGC 3'	CY3	Negative control	0-20%	Amann et al. 1990
	CF31 9a	5' TGGTCCGTGTCTCA GTAC 3'	CY3	<i>Cytophaga-Flexibacter</i> groups	35% / 70 mM	Manz et al. 1996
	AMX 368	5' CCTTTCGGGCATTG CGAA 3'	FITC	Anammox bacteria	15% / 318 mM	Schmid et al. 2003

^aThe published formamide concentration was 0%.

3.4.3.4.5 Microscopy

Samples were examined under a confocal microscope Nikon E600 equipped with Biorad laser Kr-Ar (line 488 and 568 nm) and a red diode (line 637 nm). Filter sets HQ515/30, HQ600/40 and HQ660LP were used for FITC, CY3 and CY5 respectively. Images were acquired by averaging eight Kalman frames taken with a 60X Plan Apo oil immersion objective.

3.4.3.4.6 Image Analysis

Hybridization signals were quantified with the MetaMorph software version 4.5r0 (Universal Imaging Corporation). Picture thresholds were manually adjusted to between 45 and 60 pixel intensity. Pictures were then transformed into binary images. A single cycle of dilate (3*3 pixels) and erode (3*3 pixels) filter was applied. Single pixels were then removed and pixel areas measured. Except for eukaryotes, the proportion of a given microbial group (e.g. *Methylophaga* spp.) was estimated by comparing the total pixel area produced by a specific probe with the total pixel area produced by probe Eub-mix. The proportion of eukaryotes was estimated by comparing the total pixel area produced by probe Euk516 with the total area produced by both Euk516 and Eub-mix. For each probe, at least 20 binary images from a representative sample were analyzed (Lanthier 2005).

3.4.3.4.7 MAR-FISH

MAR biofilms were homogenized and suspended in artificial seawater at pH 8 (per liter: 27.5 g NaCl, 5 g MgCl₂, 2 g MgSO₄, 1 g KCl, 0.5 g CaCl₂, 1 mg FeSO₄, 256 mg KH₂PO₄, 170 mg Na₂HPO₄, plus trace metals). Incubations were done in 80 mL serum vials with radioactive 0.02% methanol v/v (50 mCi/mmol, American radiochemical, St-Louis MO USA). An equivalent of 1.8 mg dry weight of suspended solids (± 0.6 mL) and 3 ml of medium (seawater supplemented with 256 mg KH₂PO₄ and 170 mg Na₂HPO₄*7H₂O per liter, pH 8) were added to each vial. Four assays were done with or without a CO₂ trap, each in triplicate, with various electron acceptors: with oxygen (oxic assays), nitrate (NaNO₃) or nitrite (NaNO₂) (anoxic assays), or without oxygen/nitrate/nitrite (anaerobic assays). Two controls were also done once: one with live biomass, oxygen and ¹²C-methanol; the other with oxygen, ¹⁴C-methanol and biomass

fixed with paraformaldehyde (sterile control). The anoxic assays were done by adding 200 mg N/L in each vial (C/N ratio of 1.5). A trace of nitrate (0.4 mg N-NO₃/L) was added to each anaerobic vial as a nitrogen source. CO₂ traps (1 mL of KOH 1 M) were used to prevent bacteria from using ¹⁴C-¹⁴CO₂ produced by mineralization. Nitrogen gas was injected in anoxic and anaerobic vials to flush oxygen and these vials were pre-incubated for one hour before adding the ¹⁴C-methanol to allow microorganisms to remove residual oxygen. At t=0 h, 10 µCi of ¹⁴C-methanol (0.02% methanol v/v) were added to each vial. All vials were incubated for 17 hours at room temperature. Revelation of silver grain of autoradiographic emulsion LM1 (Amersham) was achieved with Kodak D19, as described by Lee *et al.* (1999), and then fixed with 30% thiosulfate. The exposure time varied from 7 to 21 days depending of the electron acceptor source. Corresponding FISH analyses were also done in triplicate.

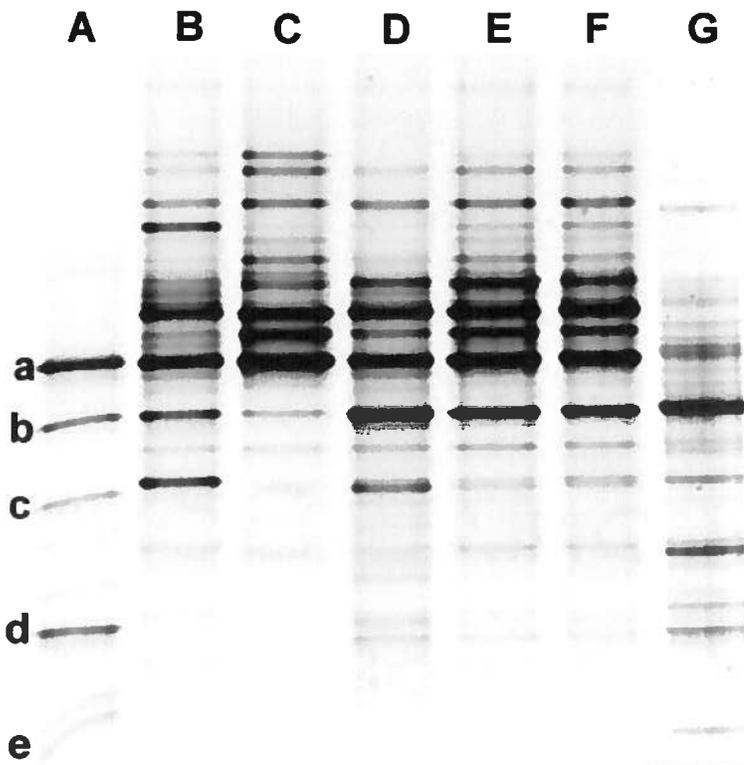
3.4.3.5 Results

3.4.3.5.1 Monitoring biofilm colonization

Microscope slides were incubated in the denitrification reactor to allow the development of the denitrifying biofilm. To monitor the dynamics of biofilm colonization on the slides, total DNA was extracted from the biofilm, followed by PCR amplification of 16S rDNA sequences and resolution of the PCR products by DGGE. From Day 7 to Day 37, the DGGE-migrating profiles revealed at least 18 different bands (Fig. 3-9). A maximum diversity of 22 bands was observed on Day 22 (Fig. 3-9). Most of the bands were found throughout the colonization period, except for the pair corresponding to *Hyphomicrobium* spp. (Fig. 3-9, band e), which were detected once only on Day 22. Bands corresponding to *Methylophaga* spp. (Fig. 3-9, bands a and b) were intense throughout the colonization process. The colonization profile was stable from Day 30. A previous study (Labbé *et al.* 2003) showed a similar DGGE profile even though plastic carriers or microscope slides were used for the microbial colonization.

Figure 3-9 : Monitoring of biofilm colonization by PCR-DGGE.

Microscope slides were incubated for 37 days in the Biodome denitrification reactor, and total DNA was extracted from microscope slides on Days 7, 12, 22, 30, and 37 (lanes B-F). The marker (lane A) was made from a plasmidic clone with sequences affiliated to *Methylophaga* (bands a and b), *E. coli* (band c), candidate OP11 (band d) and *Hyphomicrobium* (band e). Lanes G show the DGGE profile denitrificator samples incubated for 5 days in completely anoxic media (batch culture). The V3 region of the 16S rDNA gene was PCR-amplified. PCR products were separated by DGGE with a 25% to 70% denaturant gradient.



Oxygen concentration in the Biodome denitrification reactor was recorded at 0.5 ppm. To determine if the absence of oxygen (ref. MAR-FISH experiments described below) would affect bacterial diversity, we batch cultured several carriers with the denitrifying biofilm in strict denitrifying conditions (no oxygen detected) for 5 days, as described by Labbé *et al.* (2003). The PCR-DGGE migration profile of that biomass was very similar to the biomass on the microscope slides (Fig. 3-9G), although the band representing the *Hyphomicrobium* spp. was more prominent.

3.4.3.5.2 Biofilm structure

The biofilm structure was monitored during the colonization of the microscope slides. Observation by phase contrast microscopy or by fluorescent microscopy with DAPI coloration or with fluorescent probes (Fig. 3-10) revealed no apparent classic biofilm structure (channels, associations, regularities) although the integrity of the biofilm was well preserved during sampling and processing. The biofilm surface was randomly uneven, with bumps and depressions as well as thick and thin areas. The constant erosion/rejuvenation/remodeling of the biofilm surface by the fluidized bed and protozoan grazing probably prevented the biofilm from being macrostructurally organized.

Figure 3-10: FISH images of a 30 day-old biofilm.

A) Hybridization with probes Euk516-FITC (green), Gam42a-CY3 (red) and Eub-mix-CY5 (blue). Magenta signals resulted from the merge of signals from Gamma42a and Eub-mix; B) Hybridization with probes Alf1B-FITC (green) and S*-OTU14-0129-a-A-20-CY3 (*Hyphomicrobium*) (red); C) Hybridization with probes Alf1B-FITC (green), MPH-730-CY3 (red), and Eub-mix-CY5 (blue) Cyan and magenta signals resulted from the merge of Eub-mix-CY5 with the green or the red probes; D) Hybridization with probes Alf1B-FITC (green), MPH730-CY3 (red) and Eub-mix-CY5 (blue). Magenta signals resulted from the merge of signals from MPH730 and Eub-mix.

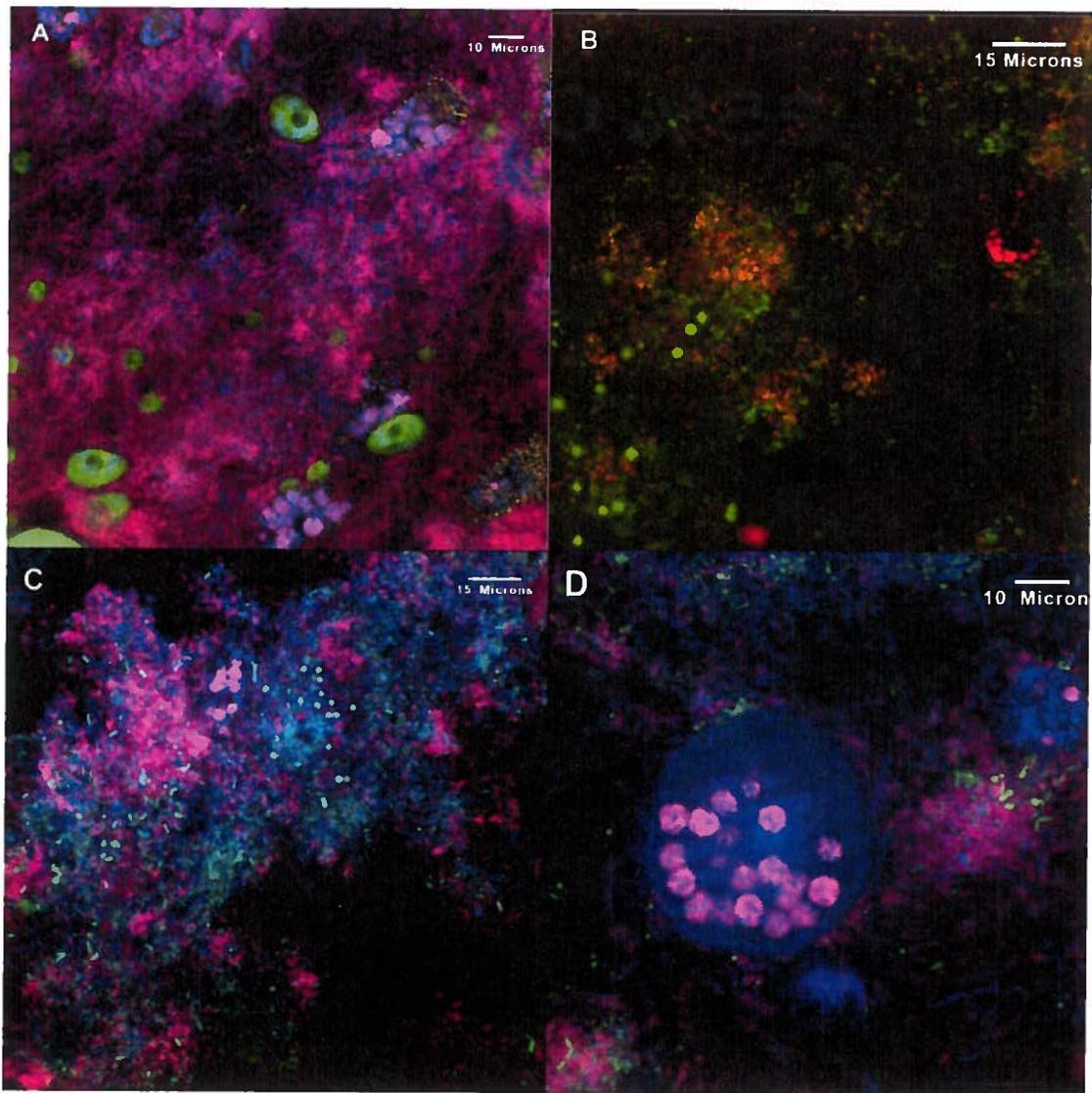


Table 3-9: Quantification of FISH signals expressed as a percent of Eub338-mix, except for Euk516 which is expressed as a percent of Eub338-mix plus Euk516 (mean \pm SD, n \geq 20 binary images).

Probes Colonization	Gamma42a	MPH-730	Alf1B	S-*-OTU14-0129- a-A-20 (<i>Hyphomicrobium</i>)	Euk516
7 days	62 \pm 19	50 \pm 15	54 \pm 16	- ^a	20 \pm 10
12 days	79 \pm 13	79 \pm 12	29 \pm 9	-	11 \pm 4
22 days	39 \pm 11	36 \pm 9	44 \pm 14	7 \pm 3	10 \pm 5
30 days	53 \pm 13	51 \pm 14	44 \pm 11	8 \pm 4	3 \pm 2
37 days	67 \pm 13	57 \pm 14	27 \pm 9	7 \pm 5	5 \pm 2

^aundetected

Colonization of different bacterial families was monitored by means of FISH with representative probes selected according to the sequences obtained from the 16S rDNA gene library (Labbé *et al.* 2003) (Table 3-8). No *Archaea* or anammox bacteria were detected in the biofilm with probes Arc915 and AMX368. *Beta*-Proteobacteria and *Cytophagales* were detected with probes Beta42a and CF319a but at very low levels. The most abundant bacterial populations detected during the colonization process were affiliated to the *gamma* (Gamma42a) and *alpha* (Alf1B) subclasses of Proteobacteria, with percentages varying from 39 to 79% and 27 to 54% respectively (Table 3-9). *Methylophaga* spp. (MPH-730) made up the vast majority of the *gamma*-Proteobacteria, representing 36 to 79% of the total bacterial population. *Hyphomicrobium* spp. (S-*-OTU14-0129-a-A-20), which are affiliated to *alpha*-Proteobacteria, were detected in the biofilm only after Day 22 and represented 7 to 8% of the bacterial population. Bacteria detected with probes Gamma42a and MPH730 were mostly rods and filaments, whereas those detected with probe Alf1B were mostly rods and large cocci (up to 5 microns). Microcolonies of *Methylophaga* spp. and *Hyphomicrobium* spp. were dispersed throughout the biofilm (Fig. 3-10).

FISH analysis also revealed a great abundance of eukaryotes, mostly on the biofilm surface. They represented up to 20% of the total pixel area of binary images at the beginning of the colonization process, but decreased in relative abundance as the bacterial biofilm grew (Table 3-9). Microscope examination of slides freshly collected from the denitrification reactor showed that most eukaryotes were protists such as Choanoflagellates, *Vorticella*, *Uronema*, *Cyclidium* and *Bodo*. FISH signals were observed with probes MPH-730 and Gamma42a inside a *Vorticella*-like cell, suggesting ingestion of *Methylophaga* spp. and *gamma*-Proteobacteria by the protists (Figure 3-10D).

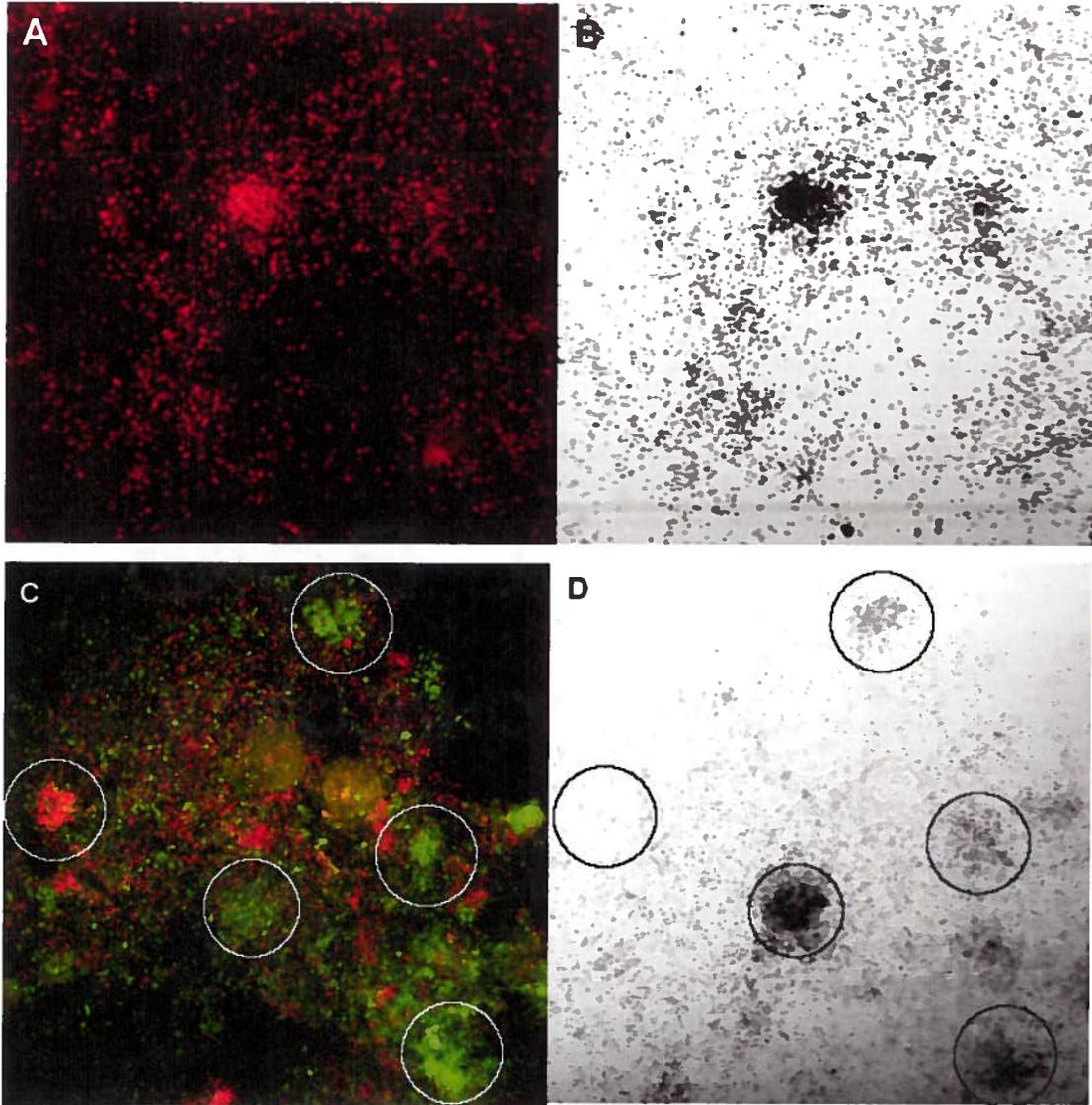
3.4.3.5.3 Biofilm functionality

We fed the biofilm with ^{14}C -methanol and tried to identify the active methylotroph microorganisms by means of MAR-FISH. The biomass from the marine denitrification system was incubated for 17 hours in the presence of one of the following electron acceptors: O_2 , NO_2 , and NO_3 , or with none of these (anaerobic conditions). Half of the assays were performed with a CO_2 trap to limit the bias introduced by the $^{14}\text{CO}_2$ assimilation after substrate mineralization. For each condition, *gamma*-Proteobacteria, *Methylophaga* spp., *alpha*-Proteobacteria, *Hyphomicrobium* spp. and Eukarya were monitored because they represent most of the microbiota in the denitrification reactor, as described earlier.

In oxic conditions (O_2), most *Methylophaga* cells revealed by the MPH-730 probe produced MAR signals (silver grains) (Fig 3-11A-B). *Alpha*-Proteobacteria also produced positive MAR signals. However, few MAR signals corresponding to *Hyphomicrobium* cells were detected. In anoxic conditions with nitrite and in anaerobic conditions, no FISH signals and very few MAR signals were observed, suggesting that the biomass was not active in taking up methanol in those conditions.

Figure 3-11 MAR-FISH images from biofilms cultured in oxic (A-B) and anoxic (C-D) conditions.

A) Hybridization with probe Gamma42a-CY3, B) MAR image of the same field,
C) Hybridization with probes Alf1b-FITC (green) and MPH-730-CY3 (red), D) MAR image of the same field.



In anoxic conditions with nitrate, MAR signals corresponded to the bacteria cells that hybridized with the probe Alf1B (*alpha*-Proteobacteria) (Fig. 3-11C-D). Weak positive FISH signals showed the presence of *Hyphomicrobium* but a clear correspondence with the MAR signals was not possible. When superimposed, very few or none of the MAR signals matched the FISH signals of probe MPH-730 (Fig 3-11C-D), suggesting that *Methylophaga* spp. did not take up methanol in anoxic conditions with nitrate.

No MAR signals were observed with both controls (^{12}C and killed biomass). In all assays, no MAR signals corresponded to Eukarya hybridized with probe Euk516. In the anoxic assays, the use of a CO_2 trap did not produce significantly different results than those without a trap. However, in the oxic assays, the CO_2 trap significantly reduced the incorporation of ^{14}C into the biomass. Incorporation of ^{14}C - methanol was 12% with the CO_2 trap and 30% without the trap. The intensity of the MAR signals was slightly weaker with the CO_2 trap than without, but there was no difference in the bacteria species that produced signals.

3.4.3.6 Discussion

In this study, we showed that the bacterial population on the microscope slides and the dynamics of the colonization process were similar to those of the carriers of the methanol-fed fluidized denitrification reactor at the Montreal Biodome. The late colonization of the biofilm by *Hyphomicrobium* spp. is not surprising since they are slow-growing bacteria with an optimal division time close to 10 hours (Hirsch 1989). The presence of fast-growing bacteria did not prevent *Hyphomicrobium* spp. from colonizing the denitrification reactor.

The FISH analyses revealed that *gamma*-Proteobacteria were very abundant in the reactor and most of them were affiliated to *Methylophaga* spp. This finding confirmed our previous study that showed that two thirds of the 16S rDNA gene library clones were affiliated to *Methylophaga* spp. This finding also agreed with the results of the PCR-DGGE analyses where strong bands corresponding to *Methylophaga* spp. were present

throughout the biofilm colonization process. The presence of *Methylophaga* spp. in the denitrification reactor was puzzling as they are considered strictly aerobic (Janvier *et al.* 1985; Doronina *et al.* 2003). The usual explanation is the continuous presence of residual dissolved oxygen (± 0.5 ppm) during the colonization period. However, this explanation is not sufficient for two reasons. First, *Methylophaga* spp. were still present when the carriers were batch cultured in strict anoxic conditions with nitrate and no oxygen for 5 to 7 days (Fig. 3-9B). Second, residual dissolved oxygen could not diffuse deep enough into the biofilm to reach the *Methylophaga* populations where they were found. Assuming a zero order reaction rate for the oxygen consumption and knowing that the carbonaceous substrate (methanol) is not limiting, this maximum diffusion depth (beta) can be estimated by the following equation (Henze *et al.* 2002):

$$\beta = [(2 DS)/k]^{1/2} \quad (1)$$

where D is the diffusion coefficient of the target substrate (here the oxygen), S is its concentration at the biofilm surface and k is the first order consumption rate in the biofilm. In the case of the Biodome's denitrification reactor, using mean values generally accepted for biofilters ($D_{O_2} = 1.7 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2/\text{d}$, $k_{O_2} = 100,000 \text{ g}/\text{m}^3 \cdot \text{j}$), for $S_{O_2} = 0.5 \text{ mg}/\text{L}$, we calculated that oxygen would not penetrate more than 40 μm deep into the biofilm. Denitrification is known to be inhibited when there is more than 0.2 mg/L of dissolved oxygen. Using the same model, we can estimate that these conditions are met only in the upper 20 μm of the biofilm. On the other hand, during the same period, the nitrate concentration (S_{NO_3}) in the reactor was 50 mg/L. Filling in the equation 1 with values for nitrate ($D_{NO_3} = 0.7 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2/\text{d}$, $k_{NO_3} = 30,000 \text{ g}/\text{m}^3 \cdot \text{j}$), we calculated a penetration depth of 500 μm , which correspond to the biofilm thickness as it was observed on microscope slides. The abundance of *Methylophaga* spp. in the deeper parts of the biofilm therefore suggests that those species can survive without oxygen. What is known about *Methylophaga* spp. is based on a limited number of studies done on a few strains. The genus is widely distributed and is found in diverse marine environments. They were described as strict aerobes by Doronina *et al.* (2003; 2005), Janvier *et al.* (1985) and de Zwart *et al.* (1996). In natural habitats, *Methylophaga* spp. are associated with benthic and planctonic algae. Algae can produce methanol through demethylation of organic compounds (Janvier *et al.* 1985). Sequences of proven *Methylophaga* species in GenBank

showed similarity ranging from 94 to 98%, which suggests high intrageneric diversity. Further characterization of the genus *Methylophaga* is definitely needed.

Alpha-Proteobacteria were also found in high percentages during the colonization of the slides. Potential denitrifiers affiliated to that class of bacteria were previously isolated from the same reactor and identified as *Paracoccus* sp., *Nitratireductor aquibiodomus* and *Hyphomicrobium* sp. (Labbé *et al.* 2003). After 22 days of incubation, *Hyphomicrobium* spp. made up 7 to 8% of the total bacteria. Those slow-growing species have been found in almost all methanol-fed denitrification systems at ratios varying from 1 to 35% of total bacteria (Neef *et al.* 1996; Lemmer *et al.* 1997; Juretschko *et al.* 2002; Ginige *et al.* 2004). They are also found in marine environments (McAnulla *et al.* 2001). It was therefore not surprising to find *Hyphomicrobium* spp. in such abundance in the Biodome's denitrification reactor. *Paracoccus* sp. and *Nitratireductor aquibiodomus* were not examined by FISH because they were expected to be present in less than 1% into the biofilm. Labbé *et al.* (2003) showed that these two bacteria were respectively 200 and 25 times less concentrated than *Hyphomicrobium* sp. Finally, numerous *alpha*-Proteobacteria are known to be denitrifiers among them some are able to use methanol such as Rhizobiaceae and Rhodobacterales (Shapleigh 2000; Lidstrom 2001).

Although some *Archaea* are known denitrifiers (Philippot 2002), we did not detect any of them in the Biodome's denitrification reactor. No *Archaea* or anammox bacteria have ever been found in a denitrification system. Tal *et al.* (2006) found anammox bacteria in a marine denitrification reactor after enrichment in anammox conditions. These suggest that *Archaea* and anammox bacteria probably play a minor role in methanol-fed marine denitrification systems or cannot be targeted yet.

Microscope observation of freshly mounted slides revealed a high diversity of Eukarya, mainly protists. More than 30 types of protists were estimated to co-exist with the biofilm bacteria in the Biodome's denitrification system (Villemur, unpublished data). Our results showed that Eukarya represented up to 20% of the biomass and were most abundant during the early days of the colonization process. The quantification of protists

determined here by FISH analysis were probably underestimated since unattached cells were flushed during the FISH washing steps. The protists found on the FISH slides were mostly stalked and were members of the *Vorticella*-like and Choanoflagellate-like groups. Interestingly, we were able to record a strong FISH signal with probes MPH-730 and Gamma42a from the digestive vacuoles of those protists.

MAR-FISH experiments in anoxic conditions with nitrate showed positive MAR signals for the Alf1B probe, suggesting that *alpha*-Proteobacteria were active in assimilating methanol during denitrification. However, very few, if any, *Hyphomicrobium* spp. were detected with MAR signals. The low proportion of *Hyphomicrobium* in the biofilm (7 to 8%) might make detection difficult. Although they made up 35% of the bacterial population in a sequential batch reactor (SBR) denitrification system, Ginige *et al.* (2004) observed that *Hyphomicrobium* spp. did not appear positive for assimilation of methanol as determined both by SIP and MAR. On the other hand, *Hyphomicrobium* spp. are known to be effective denitrifiers with methanol as the carbon source (Sperl and Hoare 1971; Claus and Kutzner 1985). The absence of a positive response from *Hyphomicrobium* spp. in anoxic conditions is probably linked to their slow growth rate that makes the use of SIP and MAR techniques problematic.

Most *Methylophaga* cells generated strong MAR signals in the presence of O₂, which is not surprising since those bacteria are well known as aerobic methylotrophs and make limited use of other carbon and energy sources. *Alpha*-Proteobacteria and *Hyphomicrobium* spp. produced positive MAR signals in oxic conditions. Those bacterial groups are known to assimilate methanol from the serine pathway. *Hyphomicrobium* spp. is also known to use a limited range of carbon sources, mostly C1 compounds such as methanol.

When superimposed, the MAR signals recorded in anoxic conditions with nitrate did not match the FISH signals for *Methylophaga* spp. or *gamma*-Proteobacteria which suggests that *Methylophaga* spp. did not assimilate methanol in those conditions. On the other hand, this result suggests that *Methylophaga* spp. were active and could survive in anoxic

environment. However, the short incubation time (17 hours) could have been insufficient to decrease cell activities. Nevertheless, *Methylophaga* spp. were clearly present in the denitrifying biofilm attached to the carriers incubated in batch culture for more than five days in anoxic conditions with nitrate (Fig. 3-9B). *Methylophaga* spp. were also present and abundant in a denitrification pilot unit that did not contain residual oxygen and that was filled with active carriers from the Biodome's denitrification reactor (Villemur, unpublished results). A possible explanation for their abundance in those conditions is that *Methylophaga* spp. had access to a carbon reserve, such as polyhydroxyalkanoate (PHA), exopolysaccharide (EPS) or protist waste, and used methanol as an energy source rather than as a carbon source. A good example is phosphorus accumulating organisms (PAO) that use this growing strategy when carbon source and electron acceptor were not occurring together (Seviour *et al.* 2003). Lueders *et al.* (2004) showed that more than 90% of the methanol consumed by methylotrophs was converted into CO₂ in rice field soil and only 10% of carbon was incorporated into the biomass. In the Biodome's denitrification reactor, residual oxygen can support the accumulation of an intracellular carbon reserve or EPS production. It is possible that in such conditions, *Methylophaga* spp. prefer to consume EPS rather than methanol, which would explain the lack of MAR signals from *Methylophaga* cells in our anoxic incubation tests. Finally, some *Methylophaga* strains, such as *M. alcalica*, *M. murata* and *M. natronica*, are strictly aerobic but can convert nitrate to nitrite (Doronina *et al.* 2003; Doronina *et al.* 2005). This suggests a possible nitrate reduction activity for *Methylophaga* spp. although our results with MAR do not support that.

In each test, a CO₂ trap was added in half of our vials to see if it would reduce the bias caused by the assimilation of the ¹⁴CO₂ resulting from the substrate mineralization. As discussed by Hesselsoe *et al.* (2005), most bacteria are able to assimilate CO₂ during growth. The addition of the trap should allow for longer incubation periods with limited bias. Little radioactivity was retained by the biomass in anoxic conditions even after 17 hours of incubation. In this case, a bias from the reassimilation of ¹⁴CO₂ produced by mineralization is not suspected. However, in oxic conditions, fewer amounts of methanol were consumed in the presence of the CO₂ trap and a lower proportion of methanol was

incorporated into the biomass (12%) compared to the biomass without the trap (30%). In the absence of the CO₂ trap, the biomass may have assimilated ¹⁴CO₂ along with methanol in serine pathways for methanol or with the Calvin-Benson-Bassham cycle by other methylotrophs (Anthony 1982). CO₂ traps should be useful in SIP tests which require an incubation period of over 7 days. They should prove particularly useful when testing slow-growing organisms such as *Hyphomicrobium* spp.

In conclusion, we showed by means of FISH that *Methylophaga* spp. are very abundant in the biofilm of the Biodome's denitrification reactor, confirming our previous results with PCR-DGGE experiments and the 16S rDNA gene library. However, the MAR-FISH experiments suggest that *Methylophaga* spp. are not active in denitrification conditions and that denitrification is done mostly by *alpha*-Proteobacteria.

3.4.3.7 Acknowledgments

This research was supported by the Montreal Biodome, by a scholarship to N. Labbé from the INRS-Institut Armand-Frappier and by two grants to R. Villemur from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We are grateful to Rachel Léger, Head of Live Collections and Research, for her continuous support. We also wish to thank Jean Bouvrette, Mec. Eng. and Maintenance and Operation Manager, and the engineering staff of the Biodome for their technical help and cooperation. Brian Colwill, C.Tr., kindly revised the English style and grammar.

4. CONCLUSION

Le but de ce projet de recherche était de caractériser la flore microbienne du procédé de dénitrification marin du Biodôme de Montréal. Ce système de dénitrification est en opération depuis 1998 et présente des caractéristiques uniques soit une eau de mer froide et l'utilisation du méthanol comme source de carbone. Or, depuis son installation, le rendement de ce procédé était bien en dessous des attentes de (200 g N-NO₃/j vs 1000 g N-NO₃/j).

Les caractéristiques d'opération de ce système de dénitrification favorisent l'établissement d'une communauté microbienne peu étudiée jusqu'à présent. En effet, la dénitrification est bien connue pour les eaux douces et les sédiments marins, mais beaucoup moins pour les bioprocédés fonctionnant avec une eau de mer ou salée.

Il a été suggéré que les conditions du milieu soient responsables du faible rendement du procédé de dénitrification marin du Biodôme de Montréal. Il est notamment connu que l'eau de mer est normalement très pauvre en métaux traces. De plus, l'utilisation de l'ozone dans le traitement de l'eau du bassin appauvrit davantage l'eau en métaux par la précipitation de ceux-ci. Ce constat nous a amené à ajouter des métaux traces, notamment du fer, du manganèse et du cuivre dans des microcosmes et dans l'unité de dénitrification à grande échelle. Dans les deux cas, l'ajout de métaux traces (fer et manganèse principalement) a permis d'améliorer l'activité des bactéries dénitrifiantes de l'ordre de 250%. À grande échelle, cette étape a permis d'augmenter la dénitrification au delà de 700 g N-NO₃/j. La présence de métaux traces a augmenté l'efficacité des bactéries, mais n'a pas influencé la production de biomasse. Ce point est fort intéressant puisqu'il suggère que l'ajout de métaux traces dans le dénitrificateur n'augmente pas le colmatage des médias (biobilles) et des grilles du dénitrificateur, un des problèmes majeurs d'opération du procédé.

Ces travaux ont notamment permis d'établir que la dénitrification dans le système de dénitrification marin du Biodôme de Montréal était dépendante de la concentration en métaux traces de l'eau à traiter. Suite à nos résultats, des essais réalisés sur des unités

pilotes par Marc-André Labelle et par Marianne Dupla, tous deux étudiants à la maîtrise à l'École Polytechnique de Montréal, ont aussi montré l'importance de l'ajout de métaux traces afin d'obtenir des activités de dénitrification plus élevées. Le Biodôme de Montréal est en voie de modifier le design du réacteur suivant les recommandations de M. Labelle et de Mme Dupla. Ces modifications comprendront l'ajout automatisé de métaux traces au dénitrificateur. Il a été déterminé que le ratio carbone/azote optimal pour la dénitrification avec méthanol était de 1,5. Des unités pilotes ont été opérées dans le cadre de la maîtrise de M. Labelle. L'efficacité de ces unités pilotes a montré un excellent potentiel de dénitrification des microorganismes présent. L'efficacité de ces unités pilotes était comparable à celle obtenue dans des bioréacteurs opérés en condition d'eau douce. Lors des expérimentations sur les unités pilotes, l'importance de l'ajout de métaux traces a été observée tous comme pour le réacteur à pleine échelle. Malheureusement, les problèmes d'opération et de maintenance du dénitrificateur du SLM ont limité l'obtention de taux de dénitrification comparable à ceux obtenus à échelle pilote.

L'étude de la microflore du biofilm dénitrifiant a ensuite été entamée par des approches de microbiologie classique et par biologie moléculaire. Ces deux approches complémentaires ont permis d'identifier les microorganismes cultivables et ceux dits « non cultivables » présents dans le dénitrificateur à l'étude.

Avec l'approche par culture sur gélose nutritive, l'homologie du gène ribosomal 16S des différentes colonies a montré que deux des types bactéries isolées du dénitrificateur appartiennent à des espèces couramment retrouvées dans des dénitrificateurs nourris avec du méthanol soit *Paracoccus denitrificans* et *Hyphomicrobium zavarzinii*. Nous avons démontré que ces deux espèces effectuaient la dénitrification complète dans des conditions d'eau salée. Un troisième type de bactéries s'apparentait aux Phyllobacteriaceae. Cette dernière ne peut effectuer que la transformation du nitrate en nitrite et elle tolère un milieu salin jusqu'à 5% NaCl. Nous l'avons établie comme un nouveau genre et espèce bactérienne validement décrits selon le code de la nomenclature et nommée *Nitratireductor aquibiodomus*. Ce nouveau genre bactérien fait partie de la famille des Phyllobacteriaceae dans le grand groupe des *alpha*-protéobactéries.

Complémentaire à la diversité sur milieu de culture, la diversité microbienne retrouvée dans le dénitrificateur par l'approche moléculaire basée sur le gène 16S ribosomal a révélé une très forte proportion de bactéries affiliées au genre *Methylophaga*. Ces *gamma*-protéobactéries représentaient plus de 70% des clones obtenus dans la génothèque. Des séquences affiliées aux espèces des *Hyphomicrobium* et d'autres bactéries dénitrifiantes ont aussi été retrouvés par cette approche moléculaire. De plus, des séquences de bactéries très éloignées de toutes celles connues jusqu'à présent ont été observées. Une forte proportion des séquences retrouvées dans la génothèque s'apparentait au groupe des candidates OP11 et à des protéobactéries inconnues.

Les outils disponibles par l'approche moléculaire nous a permis de suivre cette flore lors de la colonisation du biofilm dénitrifiant. Nous avons ainsi montré qu'*Hyphomicrobium* spp. colonisait tardivement le biofilm autour de la cinquième semaine d'incubation. La diversité bactérienne est relativement faible et constante et ce, même après une longue période. Parmi les bactéries présentes, plusieurs étaient connues comme étant dénitrifiantes ou marines.

L'analyse de la diversité microbienne ne nous permet pas de déterminer le rôle associé à ces bactéries ainsi que leur concentration réelle. L'hybridation *in situ* fluorescente nous a permis d'établir les proportions réelles des différentes populations microbiennes au sein du biofilm. Les *Methylophaga* représentaient, par cette méthode, plus de 50% de la flore microbienne totale. Ce genre microbien n'est pas reconnu pour effectuer la dénitrification. En fait, certaines espèces de *Methylophaga* peuvent réduire le nitrate en nitrite, mais aucune n'est connue pour le transformer en azote gazeux. De plus, elles sont reconnues pour être aérobies strictes. Les *Hyphomicrobium* spp. représentaient une proportion de 7-8% après 22 jours d'incubation dans le dénitrificateur. Au total, les *alpha* et les *gamma*-protéobactéries représentaient la presque totalité de la flore bactérienne du dénitrificateur.

L'étude d'un biofilm intégral (non désagrégé et non coupé) par hybridation *in situ* est peu courante. Elle permet notamment d'observer les structures du biofilm et les interactions possibles entre les groupes microbiens. Lors de l'étude par hybridation *in situ*, il a été démontré que l'utilisation d'un milieu de montage, avec antifading, pouvait modifier l'apparence du biofilm. L'utilisation d'un milieu de montage aqueux a permis de préserver la taille réelle des microorganismes. L'impact de cet aspect est considérable pour l'étude de microorganismes non cultivés afin d'obtenir de l'information quant à leur taille. Cela a également permis de mieux préserver la structure tridimensionnelle du biofilm.

Afin de déterminer si les *Methylophaga* et d'autres microorganismes réduisaient le nitrate dans les conditions du dénitrificateur marin du Biodôme de Montréal, des expériences de microautoradiographie couplées à l'hybridation *in situ* fluorescente ont été réalisées. D'après les résultats obtenus avec la microautoradiographie, les *Methylophaga* ont assimilé efficacement le méthanol en aérobiose mais, pas en anoxie. Par contre, il est ressorti que les *alpha*-protéobactéries de la microflore à l'étude sont impliquées dans la dénitrification avec méthanol. Une modification au protocole du MAR-FISH, soit l'ajout d'une trappe à CO₂ dans les incubations, nous a assuré un meilleur contrôle de la réassimilation du CO₂ radiomarqué produit lors de la minéralisation du substrat. La présence d'une trappe à CO₂ nous a permis également d'augmenter la période d'incubation en présence du substrat radioactif. Cette modification serait également utile lors des études de «stable isotope probing» puisque le temps d'incubation requis pour cette méthode est beaucoup plus long (plus d'une semaine).

Pour mieux connaître l'activité associée aux différents groupes bactériens dans le dénitrificateur, l'étude des gènes impliqués dans la dénitrification pourrait être effectuée. La caractérisation des gènes *nar*, *nir*, *nor* et *nos* indiquerait la diversité des microorganismes dénitrifiants. Une approche basée sur le CARD-FISH permettrait par la suite d'associer les différents gènes (ex : différents gènes *nirK*) retrouvés à l'espèce à laquelle ils correspondent. Ces travaux permettraient d'investiguer si les *Methylophaga* possèdent les gènes impliqués dans la dénitrification.

L'utilisation d'autres molécules fluorescentes, tels les Alexa Fluor®, pourraient augmenter la sensibilité de la technique FISH en remplacement de CY5 qui est difficilement détectable avec les outils actuellement disponibles à l'INRS-IAF. De plus, si la technologie devient accessible, l'utilisation d'un microscope confocal multiphotons augmenterait la qualité des images obtenues et l'intensité du signal de fluorescence. De plus, l'utilisation d'un marqueur de cellules actives, tel le CTC, en combinaison avec le FISH permettrait de déterminer quels microorganismes sont actifs lors de la dénitrification. Ce type de coloration nous permettrait aussi de déterminer si les *Methylophaga* sont actifs en condition de dénitrification.

Enfin, l'étude effectuée a permis de mieux connaître la dénitrification en eau de mer au Biodôme de Montréal ainsi que les bactéries retrouvées dans cet habitat particulier. Elle a aussi contribué à l'amélioration de l'activité du procédé de dénitrification marin installé au Biodôme de Montréal. Cette étude complémentaire à une modification du design du dénitrificateur devrait permettre un maintien de la concentration de nitrate dans le Saint-Laurent Marin sous la barre des 50 mg N-NO₃/L.

5. BIBLIOGRAPHIE

- Abraham ZH, Lowe DJ and Smith BE (1993). Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N.C.I.M.B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres. *Biochem J* 295 (2): 587-593.
- Adey WH and Loveland K (1998). Dynamic aquaria: Building living ecosystems. Toronto, Academic Press.
- Anthony C (1982). The biochemistry of methylootrops. New York, Academic Press.
- APHA A, WEF (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington.
- Aravinthan V, Mino T, Takizawa S, Satoh H and Matsuo T (2001). Sludge hydrolysate as a carbon source for denitrification. *Water Sci Technol* 43(1): 191-199.
- Baar de HJW, Jong de JTM, Bakker DCE, Löscher BM, Veth C, Bathmann U and Smetacek V (1995). Importance of iron for plankton blooms and carbon dioxide drawdown in the southern ocean. *Nature* 373: 412-415.
- Bambauer A, Rainey FA, Stackebrandt E and Winter J (1998). Characterization of *Aquamicrobium defluvii* gen. nov. sp. nov., a thiophene-2-carboxylate-metabolizing bacterium from activated sludge. *Arch Microbiol* 169(4): 293-302.
- Banks MK and Bryers JD (1991). Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. *Appl Environ Microbiol* 57(7): 1974-1979.
- Behrens S, Ruhland C, Inacio J, Huber H, Fonseca A, Spencer-Martins I, Fuchs BM and Amann R (2003). In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 69(3): 1748-1758.
- Bilanovic D, Battistoni P, Cecchi F, Pavan P and Mata-Alvarez J (1999). Denitrification under high nitrite concentration and alternating anoxic condition. *Water Res* 33(15): 3311-3320.
- Blaszczyk M (1983). Effect of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrations on the selection of denitrifying bacteria. II. Continuous cultures in packed bed reactors. *Acta Microbiol Pol* 32(1): 65-71.

- Blaszczyk M, Galka E, Sakowicz E and Mycielski R (1985). Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. III. Methanol. *Acta Microbiol Pol* 34: 195-205.
- Blaszczyk M, Mycielski R, Jaworowska-Deptuch H and Brzostek K (1980). Effect of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrations on the selection of denitrifying bacteria. I. Stationary cultures. *Acta Microbiol Pol* 29(4): 397-406.
- Blaszczyk M, Przytocka-Jusiak M, Kruszewska U and Mycielski R (1981). Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. I. Acetic acid. *Acta Microbiol Pol* 30(1): 49-58.
- Boschker HTS, Nold SC, Wellsbury P, Bos D, de Graaf W, Pel R, Parkes RJ and Cappenberg TE (1998). Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by C-13-labelling of biomarkers. *Nature* 392(6678): 801-805.
- Bowman JP, McCammon SA and Skerratt JH (1997). *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes. *Microbiology* 143(4): 1451-1459.
- Bowman JP, Rea SM, McCammon SA and McMeekin TA (2000). Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hils, Eastern Antarctica. *Environ Microbiol* 2(2): 227-237.
- Braker G, Fesefeldt A and Witzel KP (1998). Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64(10): 3769-3775.
- Braker G and Tiedje JM (2003). Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 69(6): 3476-3483.
- Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH and Tiedje JM (2000). Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol* 66(5): 2096-2104.

- Brand LE, Sunda WG and Guillard RRL (1983). Limitation of marine phytoplankton reproductive rate by zinc, manganese and iron. *Limnol Oceanogr* 28: 1182-1195.
- Brettar I, Moore ERB and Hoflo MG (2001). Phylogeny and abundance of novel denitrifying bacteria isolated from the water column of the Central Baltic Sea. *Microbial Ecol* 42(3): 295-305
- Brock TD and Brock ML (1966). Autoradiography as a tool in microbial ecology. *Nature* 209(24): 734-736.
- Bruland KW, Donat JR and Hutchins DA (1991). Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.* 36(8): 1555-1577.
- Burell PC, Phalen CM and Hovanec TA (2001) Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(12): 5791-5800.
- Camargo JA, Alonso A and Salamanca A (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58(9): 1255-1267.
- Casciotti KL and Ward BB (2005). Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 52(2): 197-205.
- Castro-Gonzalez M, Braker G, Farias L and Ulloa O (2005). Communities of nirS-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environ Microbiol* 7(9): 1298-1306.
- Catalan Sakairi MA, Yasuda K and Matsumura M (1996). Nitrogen removal in seawater using nitrifying and denitrifying bacteria immobilized in porous cellulose carrier. *Water Sci Technol* 34(7-8): 267-274.
- Catalan Sakairi MA, Wang PC and Matsumura M (1997). High-rate seawater denitrification utilizing a macro-porous cellulose carrier. *J Ferment Bioeng* 83(1): 102-108.
- Cervantes F, Monroy O and Gomez J (1998). Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol Lett* 20(10): 959-961.

- Chen F, Suttle CA and Short SM (1996). Genetic diversity in marine algal virus communities as revealed by sequence analysis of DNA polymerase genes. *Appl Environ Microbiol* 62(8): 2869-2874.
- Chen W, Wang E, Wang S, Li Y and Chen X (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int J Syst Bacteriol* 45(1): 153-159.
- Choe S, Chang YY, Hwang KY and Khim J (2000). Kinetics of reductive denitrification by nanoscale zero-valent iron. *Chemosphere* 41(8): 1307-1311.
- Chua AS, Eales K, Mino T and Seviour R (2004). The large PAO cells in full-scale EBPR biomass samples are not yeast spores but possibly novel members of the *beta*-Proteobacteria. *Water Sci Technol* 50(6): 123-130.
- Church MJ, Hutchins DA and Ducklow HW (2000). Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter and iron in the Southern ocean. *Appl Environ Microbiol* 66(2): 455-466.
- Claus G and Kutzner HJ (1985). Denitrification of nitrate and nitric acid with methanol as carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 22: 378-381.
- Coates JD, Michaelidou U, Bruce RA, O'Connor SM, Crespi JN and Achenbach LA (1999). Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65(12): 5234-5241.
- Conseil canadien des ministres de l'Environnement (CCME) (1999). Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement. Winnipeg.
- Costa C, Dijkema C, Friedrich M, Garcia-Encina P, Fernandez-Polanco F and Stams AJ (2000). Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 53(6): 754-762.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR and Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol* 49: 711-745.
- Coyne MS, Arunakumari A, Averill BA and Tiedje JM (1989). Immunological Identification and Distribution of Dissimilatory Heme Cd1 and Nonheme Copper Nitrite Reductases in Denitrifying Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 55(11): 2924-2931.

- Crossman LC, Moir JW, Enticknap JJ, Richardson DJ and Spiro S (1997). Heterologous expression of heterotrophic nitrification genes. *Microbiology* 143(12): 3775-3783.
- Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, Schleifer KH and Wagner M (2001). In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 67(11): 5273-5284.
- deGraaf AAV, deBruijn P, Robertson LA, Jetten MSM and Kuenen JG (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142: 2187-2196.
- DeLong EF, Wickham GS and Pace NR (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243(4896): 1360-1363.
- deZwart JMM, Nelisse PN and Kuenen JG (1996). Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp nov: An obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *Fems Microbiology Ecology* 20(4): 261-270.
- Doronina NV, Darmaeva TD and Trotsenko YA (2003). *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(1): 223-229.
- Doronina NV, Li Ts D, Ivanova EG and Trotsenko Iu A (2005). [*Methylophaga murata* sp. nov.: a haloalkaliphilic aerobic methylotroph from deteriorating marble]. *Mikrobiologiya* 74(4): 511-519.
- Duncan KE, Sublette KL, Rider PA, Stepp A, Beitle RR, Conner JA and Kolhatkar R (2001). Analysis of a microbial community oxidizing inorganic sulfide and mercaptans. *Biotechnol Prog* 17(4): 768-774.
- Dupla M, Comeau Y, Parent S, Villemur R and Jolicoeur M (2006). Design optimization of a self-cleaning moving-bed bioreactor for seawater denitrification. *Water Res* 40(2): 249-258.
- Durborow RM, Crosby DM and Brunson MW (1997). Nitrite in fish ponds. *Southern regional aquaculture center* 462: 1-3.
- Eisenmann H, Harms H, Meckenstock R, Meyer EI and Zehnder AJ (1998). Grazing of *Tetrahymena* sp. on adhered bacteria in percolated columns monitored by in situ

- hybridization with fluorescent oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64(4): 1264-1269.
- Finlay BJ, Span ASW and Harman JMP (1983). Nitrate respiration in primitive eukariotes. *Nature* 303(26 may): 333-336.
- Flere JM and Zhang TC (1998). Sulfur-based autotrophic denitrification pond systems for *in-situ* remediation of nitrate-contaminated surface water. *Water Sci Technol* 38(1): 15-22.
- Fritsche K, Auling G, Andreesen JR and Lechner U (1999). *Defluviobacter lusatiae* gen. nov., sp. nov., a new chlorohexol-degrading member of the *alpha*-2 subgroup of *Proteobacteria*. *Syst Appl Microbiol* 22(2): 197-204.
- Fuchs BM, Wallner G, Beisker W, Schwippl I, Ludwig W and Amann R (1998). Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64(12): 4973-4982.
- Fuchs W, Schatzmayr G and Braun R (1997). Nitrate removal from drinking water using a membrane-fixed biofilm reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 48(2): 267-274.
- Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA and Krieg NR (1994). Methods for general and molecular bacteriology. Washinton, American society for microbiology.
- Gieseke A, Nielsen JL, Amann R, Nielsen PH and de Beer D (2005). In situ substrate conversion and assimilation by nitrifying bacteria in a model biofilm. *Environ Microbiol* 7(9): 1392-1404.
- Gilbault GG (1990). Practical fluorescence. Second edition New York, Marcel Dekker inc.
- Ginige MP, Hugenholtz P, Daims H, Wagner M, Keller J and Blackall LL (2004). Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Appl Environ Microbiol* 70(1): 588-596.
- Ginige MP, Keller J and Blackall LL (2005). Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent *in situ* hybridization-microautoradiography. *Appl Environ Microbiol* 71(12): 8683-8691.

- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL and Field KG (1990). Genetic Diversity in Sargasso Sea Bacterioplankton. *Nature* 345(6270): 60-63.
- Glaeser J and Overmann J (1999). Selective enrichment and characterization of *Roseospirillum parvum*, gen. nov. and sp. nov., a new purple nonsulfur bacterium with unusual light absorption properties. *Arch Microbiol* 171(6): 405-416.
- Glass C and Silverstein J (1999). Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Res* 33(1): 223-229.
- Gomez MA, Gonzalez-Lopez J and Hontoria-Garcia E (2000). Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. *J Hazard Mater* 80(1-3): 69-80.
- Granger J and Ward BB (2003). Accumulation of nitrogen oxides in copper-limited cultures of denitrifying bacteria. *Limnol Oceanogr* 48(1): 313-318.
- Grguric G (1990). Maintenance and modeling of chemical balances in an artificial seawater aquarium. Melbourne, Florida Institute of Technology: 62.
- Grguric G, Sondey CJ and DuVall BM (2000). Carbon and nitrogen fluxes in a closed seawater facility. *Sci Total Environ* 247: 57-69.
- Grguric G, Wetmore SS and Fournier RW (2000). Biological denitrification in a closed seawater system. *Chemosphere* 40(5): 549-555.
- Gupta RS (2005). Protein signatures distinctive of *alpha-Proteobacteria* and its subgroups and a model for *alpha-proteobacterial* evolution. *Crit Rev Microbiol* 31(2): 101-135.
- Henze M, Harremoës P, la Cour Jansen J and Arvin E (2002). Wasterwater treatment: Biological and chemical processes. New York, Springer-Verlag.
- Hesselsoe M, Nielsen JL, Roslev P and Nielsen PH (2005). Isotope labeling and microautoradiography of active heterotrophic bacteria on the basis of assimilation of $^{14}\text{CO}_2$. *Appl Environ Microbiol* 71(2): 646-655.
- Hinrichs KU, Hayes JM, Sylva SP, Brewer PG and DeLong EF (1999). Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* 398(6730): 802-805.
- Hirsch P (1989). Genus *Hyphomicrobium*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. JT Staley, MP Bryant, N Pfennig and J Holt. Baltimore, Williams & Wilkins. 3: 1895-1904.

- Hoek van der JP, Latour PJM and Klapwijk A (1987). Denitrification with methanol in the presence of high salt concentrations and at high pH levels. *Appl Microbiol Biotechnol* 27: 199-205.
- Hollo J and Czako L (1987). Nitrate removal from drinking water in a fluidized bed biological denitrification bioreactor. *Acta Biotechnol* 7: 417-423.
- Honn KV and Chavin W (1976). Utility of ozone treatment in the maintenance of water quality in closed marine system. *Marine Biol* 34: 201-209.
- Hoshino T, Terahara T, Tsuneda S, Hirata A and Inamori Y (2005). Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process. *J Appl Microbiol* 99(5): 1165-1175.
- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL and Pace NR (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 180(2): 366-376.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH and Bohannan BJ (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* 67(10): 4399-4406.
- Intrasungkha N, Keller J and Blackall L (1999). Biological nutrient removal efficiency in treatment of saline wastewater. *Water Sci Technol* 39(6): 183-190.
- Janvier M, Frehel C, Grimont G and Gasser F (1985). *Methylophaga marina* gen. nov. sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., Marine Methylophages. *Int J Syst Bacteriol* 35(2): 131-139.
- Janvier M, Regnault B and Grimont P (2003). Development and use of fluorescent 16S rRNA-targeted probes for the specific detection of *Methylophaga* species by in situ hybridization in marine sediments. *Res Microbiol* 154(7): 483-490.
- Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC and Gillis M (1997). Transfer of *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium cirici*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47(3): 895-898.
- Jensen BB and Burris RH (1986). N₂O as a substrate and as a competitive inhibitor of nitrogenase. *Biochemistry* 25(5): 1083-1088.

- Jetten MS, Wagner M, Fuerst J, van Loosdrecht M, Kuenen G and Strous M (2001). Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Curr Opin Biotechnol* 12(3): 283-288.
- Juretschko S, Loy A, Lehner A and Wagner M (2002). The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol* 25(1): 84-99.
- Kaeberlein T, Lewis K and Epstein SS (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296(5570): 1127-1129.
- Kampfer P, Muller C, Mau M, Neef A, Auling G, Busse HJ, Osborn AM and Stolz A (1999). Description of *Pseudaminobacter* gen. nov. with two new species, *Pseudaminobacter salicylatoxidans* sp. nov. and *Pseudaminobacter defluvii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49(2): 887-897.
- Kampfer P, Neef A, Salkinoja-Salonen MS and Buss HJ (2002). *Chelatobacter heintzii* (Auling et al. 1993) is a later subjective synonym of *Aminobacter aminovorans* (Urakami et al. 1992). *Int J Syst Evol Microbiol* 52(3): 835-839.
- Kim EW and Bae JH (2000). Alkalinity requirements and the possibility of simultaneous heterotrophic denitrification during sulfur-utilizing autotrophic denitrification. *Water Sci Technol* 42(3-4): 233-238.
- Kim IS, Oh SE, Bum MS, Lee JL and Lee ST (2002). Monitoring the denitrification of wastewater containing high concentrations of nitrate with methanol in a sulfur-packed reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(1): 91-96.
- Kimura H, Sugihara M, Yamamoto H, Patel BKC, Kato K and Hanada S (2005). Microbial community in a geothermal aquifer associated with the subsurface of the Great Artesian Basin, Australia. *Extremophiles* 9(5): 407-414.
- Knösel D (1984). Genus IV. *Phyllobacterium* (ex Knösel 19620 nom. rev. (*Phyllobacterium* Knösel 1962, 96). Baltimore, Williams and Wilkins.
- Kocur M (1984). Genus *Paracoccus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. JH NR Krieg. Baltimore, Williams & Wilkins.

- Koenig A and Liu LH (2002). Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: continuous flow experiments in pilot-scale packed bed reactors. *J Biotechnol* 99(2): 161-171.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS and Palmer RJ, Jr. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3): 486-505.
- Kong Y, Nielsen JL and Nielsen PH (2005). Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl Environ Microbiol* 71(7): 4076-4085.
- Konstantinidis KT and Tiedje JM (2005). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol* 187(18): 6258-6264.
- Labbé N, Juteau P, Parent S and Villemur R (2003). Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the montreal biodome, Canada. *Microb Ecol* 46(1): 12-21.
- Labbé N, Parent S and Villemur R (2003). Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. *Water Res* 37(4): 914-920.
- Labelle MA, Juteau P, Jolicoeur M, Villemur R, Parent S and Comeau Y (2005). Seawater denitrification in a closed mesocosm by a submerged moving bed biofilm reactor. *Water Res* 39(14): 3409-3417.
- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML and Pace NR (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(20): 6955-6959.
- Lanthier M, Juteau P, Lepine F, Beaudet R and Villemur R (2005). *Desulfitobacterium hafniense* is present in a high proportion within the biofilms of a high-performance pentachlorophenol-degrading, methanogenic fixed-film reactor. *Appl Environ Microbiol* 71(2): 1058-1065.
- Leadbetter JR (2003). Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol* 6(3): 274-281.

- Lechner U, Baumbach R, Becker D, Kitunen V, Auling G and Salkinoja-Salonen M (1995). Degradation of 4-chloro-2-methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description. *Biodegradation* 6(2): 83-92.
- Lee N, Nielsen PH, Andreasen KH, Juretschko S, Nielsen JL, Schleifer KH and Wagner M (1999). Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 65(3): 1289-1297.
- Lee S, Maken S, Jang JH, Park K and Park JW (2006). Development of physicochemical nitrogen removal process for high strength industrial wastewater. *Water Res* 40: 975-980.
- Lemmer H, Zaglauer A and Metzner G (1997). Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 1: Physico-chemical and biological characterization. *Water Res* 31(8): 1897-1902.
- Lemmer H, Zaglauer A, Neef A, Meier H and Amann R (1997). Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 2: Composition and ecology of the bacterial community in the biofilms. *Water Res* 31(8): 1903-1908.
- Lichtman JW and Conchello J-A (2005) Fluorescence microscopy. *Nature Methods* 2(12) 910-919.
- Lidstrom ME (2001). Aerobic methylotrophic prokaryotes. The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. M Dworkin. New York, Springer-Verlag.
- Liu X, Tiquia SM, Holguin G, Wu L, Nold SC, Devol AH, Luo K, Palumbo AV, Tiedje JM and Zhou J (2003). Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico. *Appl Environ Microbiol* 69(6): 3549-3560.
- Lu WP and Ragsdale SW (1991). Reductive activation of the coenzyme A/acetyl-CoA isotopic exchange reaction catalyzed by carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* and its inhibition by nitrous oxide and carbon monoxide. *J Biol Chem* 266(6): 3554-3564.
- Lueders T, Wagner B, Claus P and Friedrich MW (2004). Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic

- interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ Microbiol* 6(1): 60-72.
- Mahmood S, Paton GI and Prosser JI (2005). Cultivation-independent in situ molecular analysis of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soil. *Environ Microbiol* 7(9): 1349-1360.
- Martin JH and Fitzwater SE (1988). Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature* 331: 341-343.
- McAnulla C, McDonald IR and Murrell JC (2001). Methyl chloride utilising bacteria are ubiquitous in the natural environment. *FEMS Microbiol Lett* 201(2): 151-155.
- McDonald IR, Kampf P, Topp E, Warner KL, Cox MJ, Hancock TL, Miller LG, Larkin MJ, Ducrocq V, Coulter C, Harper DB, Murrell JC and Oremland RS (2005). *Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from various terrestrial environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(5): 1827-1832.
- Mergaert J, Cnockaert MC and Swings J (2002). *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend. *Int J Syst Bacteriol* 52(5): 1821-1823.
- Metcalf and Eddy inc (1991). Waste water engineering treatment, disposal and reuse. New York, McGraw-Hill.
- Millero FJ and Sohn ML (1992). *Chemical oceanography*. London, CRC Press: 531.
- Ministère du développement durable de l'environnement et des parcs (MDDEP) (2001). *Critères de qualité de l'eau de surface au Québec*.
- Ministère du développement durable de l'environnement et des parcs (MDDEP) (2005). *Règlement modifiant le Règlement sur la qualité de l'eau potable*.
- Morel FMM and Hering JG (1993). Principles and Applications of Aquatic Chemistry. New York, Wiley-Interscience.
- Muyzer G, Dewaal EC and Uitterlinden AG (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16S Ribosomal-Rna. *Appl Environ Microbiol* 59(3): 695-700.

- Mycielski R, Blaszczyk M, Jackowska A and Olkowska H (1983). Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. II. Ethanol. *Acta Microbiol Pol* 32(4): 381-388.
- Nakamura LK and Jackson MA (1995). Clarification of the Taxonomy of *Bacillus mycoides*. *Int J Syst Bacteriol* 45(1): 46-49.
- Neef A, Zaglauer A, Meier H, Amann R, Lemmer H and Schleifer KH (1996). Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol* 62(12): 4329-4339.
- Nielsen JL, Juretschko S, Wagner M and Nielsen PH (2002). Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence in situ hybridization and microautoradiography. *Appl Environ Microbiol* 68(9): 4629-4636.
- Niven DF, Ekins A and Al-Samaurai AAW (1999). Effects of iron and manganese availability on growth and production of superoxide dismutase by *Streptococcus suis*. *Can J Microbiol* 45(12): 1027-1032.
- Nogales B, Timmis KN, Nedwell DB and Osborn AM (2002). Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Appl Environ Microbiol* 68(10): 5017-5025.
- Oh SE, Yoo YB, Young JC and Kim IS (2001). Effect of organics on sulfur-utilizing autotrophic denitrification under mixotrophic conditions. *J Biotechnol* 92(1): 1-8.
- Okabe S, Kindaichi T and Ito T (2005). Fate of ¹⁴C-labeled microbial products derived from nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms. *Appl Environ Microbiol* 71(7): 3987-3994.
- OMS (1998). Directives OMS de la qualité pour l'eau de boisson. Genève.
- Ouverney CC and Fuhrman JA (1999). Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. *Appl Environ Microbiol* 65(4): 1746-1752.
- Parent S and Morin A (2000). N budget as water quality management tool in closed aquatic mesocosms. *Water Res* 34(6): 1846-1856.

- Philippot L (2002). Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta* 1577(3): 355-376.
- Pukall R, Buntfuss D, Fruhling A, Rohde M, Kroppenstedt RM, Burghardt J, Lebaron P, Bernard L and Stackebrandt E (1999). *Sulfitobacter mediterraneus* sp. nov., a new sulfite-oxidizing member of the *alpha-Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol* 49(2): 513-519.
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NR and Murrell JC (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403(6770): 646-649.
- Radajewski S, Webster G, Reay DS, Morris SA, Ineson P, Nedwell DB, Prosser JI and Murrell JC (2002). Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology* 148(8): 2331-2342.
- Rajapakse JP and Scutt JE (1999). Denitrification with natural gas and various new growth media. *Water Res* 33(18): 3723-3734.
- Rappe MS, Connon SA, Vergin KL and Giovannoni SJ (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418(6898): 630-633.
- Reckhon DA, Knoche WR, Kearney MJ and Parks CA (1991). Oxidation of iron and manganese by ozone. *Ozone Sci Eng* 13: 675-695.
- Rossello-Mora R and Amann R (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25(1): 39-67.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauvé I (2000). Caractérisation de la filière de dénitrification des eaux de mer du Biodôme de Montréal. Génie civil, géologie et mines. Montréal, Université de Montréal: 210.
- Scala DJ and Kerkhof LJ (1999). Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Appl Environ Microbiol* 65(4): 1681-1687.
- Schaetzl P, Amang DN and Nguyen QT (2004). Batch ion-exchange dialysis to extract nitrate from drinking water: a simplified ion transport model for the best membrane selection. *Desalination* 164(3): 261-268.
- Schmid M, Twachtmann U, Klein M, Strous M, Juretschko S, Jetten M, Metzger JW, Schleifer KH and Wagner M (2000). Molecular evidence for genus level diversity

- of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol* 23(1): 93-106.
- Schmid M, Walsh K, Webb R, Rijpstra WI, van de Pas-Schoonen K, Verbruggen MJ, Hill T, Moffett B, Fuerst J, Schouten S, Damste JS, Harris J, Shaw P, Jetten M and Strous M (2003). Candidatus "*Scalindua brodae*", sp. nov., Candidatus "*Scalindua wagneri*", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 26(4): 529-538.
- Seki T, Chung CK, Mikami H and Oshima Y (1978). Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus. *Int J Syst Bact* 38: 182-189.
- Semwogerere D and Weeks ER (2005) Confocal microscopy. Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. Taylor and Francis.
- Serghini MA, Ritzenthaler C and Pinck L (1989). A Rapid and Efficient Miniprep for Isolation of Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 17(9): 3604-3604.
- Seviour RJ, Mino T and Onuki M (2003). The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol Rev* 27(1): 99-127.
- Shapleigh JP (2000). The denitrifying prokaryotes. The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. M Dworkin. New York, Springer-Verlag.
- Sharma S, Aneja MK, Mayer J, Munch JC and Schloter M (2005). Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes. *Appl Environ Microbiol* 71(4): 2001-2007.
- Shrimali M and Singh KP (2001). New methods of nitrate removal from water. *Environ Pollut* 112(3): 351-359.
- Skerman VBD, McGowan V and Sneath PHA (1980). Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bact* 30: 225-420.
- Sperl GT and Hoare DS (1971). Denitrification with methanol: a selective enrichment for *Hyphomicrobium* species. *J Bacteriol* 108(2): 733-736.
- Spotte S (1991). Captive seawater fishes: science and technology. New York, John Wiley and Sons.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC and

- Whitman WB (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 3): 1043-1047.
- Stackebrandt E and Goebel BM (1994). A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S Ribosomal-Rna Sequence-Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44(4): 846-849.
- Stoeck T and Epstein S (2003). Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments. *Appl Environ Microbiol* 69(5): 2657-2663.
- Stres B, Mahne I, Avgustin G and Tiedje JM (2004). Nitrous oxide reductase (nosZ) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Appl Environ Microbiol* 70(1): 301-309.
- Strottman UJ and Windecker G (1997). Kinetics of ammonium removal with suspended and immobilized nitrifying bacteria in different reactor system. *Chemosphere*(35): 2939-2952.
- Strous M, Fuerst JA, Kramer EH, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG and Jetten MS (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400(6743): 446-449.
- Tal Y, Watts JE and Schreier HJ (2006). Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. *Appl Environ Microbiol* 72(4): 2896-2904.
- Tal Y, Watts JEM, Schreier SB, Sowers KR and Schreier HJ (2003). Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. *Aquaculture* 215(1-4): 187-202.
- Taroncher-Oldenburg G, Griner EM, Francis CA and Ward BB (2003). Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl Environ Microbiol* 69(2): 1159-1171.
- Taylor SR and McLennan SM (1985). *The continental crust: its composition and evolution*. Oxford.

- Thamdrup B and Dalsgaard T (2002). Production of N₂ through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* 68(3): 1312-1318.
- Thurnheer T, Gmur R and Guggenheim B (2004). Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J Microbiol Methods* 56(1): 37-47.
- Tiedje JM, Sexton AJ, Myrold DD and Robinson JA (1982). Denitrification: ecological niches, competition and survival. *Antonie Van Leeuwenhoek* 48(6): 569-583.
- Tighe SW, de Lajudie P, Dipietro K, Lindstrom K, Nick G and Jarvis BD (2000). Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int J Syst Evol Microbiol* 50(2): 787-801.
- Trépanier C, Parent P, Comeau Y and Bouvrette J (2002). Phosphorus budget as a water quality management tool for closed aquatic mesocosms. *Water Res* 36(4): 1007-1017.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2002). National Secondary Drinking Water Regulations.
- Urakami T, Araki H, Oyanagi H, Suzuki K-I and Komagata K (1992). Transfer of *Pseudomonas aminovorans* (de Dooren de Jong 1926) to *Aminobacter* gen. nov. as *Aminobacter aminovorans* comb. nov. and description of *Aminobacter aganoensis* sp. nov. and *Aminobacter niigataensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42(1): 84-92.
- Usuda K, Toritsuka N, Matsuo Y, Kim DH and Shoun H (1995). Denitrification by the fungus *Cylindrocarpon tonkinense*: anaerobic cell growth and two isozyme forms of cytochrome P-450nor. *Appl Environ Microbiol* 61(3): 883-889.
- van de Graaf AA, Mulder A, de Bruijn P, Jetten MS, Robertson LA and Kuenen JG (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol* 61(4): 1246-1251.
- Van Spanning RJ, Houben E, Reijnders WN, Spiro S, Westerhoff HV and Saunders N (1999). Nitric oxide is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. *J Bacteriol* 181(13): 4129-4132.

- Velazquez E, Igual JM, Willems A, Fernandez MP, Munoz E, Mateos PF, Abril A, Toro N, Normand P, Cervantes E, Gillis M and Martinez-Molina E (2001). *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int J Syst Evol Microbiol* 51(3): 1011-1021.
- Watanabe K, Kodama Y and Harayama S (2001). Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J Microbiol Methods* 44(3): 253-262.
- Wharton DC and Gibson QH (1976). Cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. IV. Reaction with oxygen and carbon monoxide. *Biochim Biophys Acta* 430(3): 445-453.
- Wong MT, Tan FM, Ng WJ and Liu WT (2004). Identification and occurrence of tetrad-forming *Alphaproteobacteria* in anaerobic-aerobic activated sludge processes. *Microbiology* 150(11): 3741-3748.
- Yan T, Fields MW, Wu L, Zu Y, Tiedje JM and Zhou J (2003). Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirK* and *nirS*) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater. *Environ Microbiol* 5(1): 13-24.
- Yang PY, Nitisoravut S and Wu JS (1995). Nitrate Removal Using a Mixed-Culture Entrapped Microbial Cell Immobilization Process under High-Salt Conditions. *Water Research* 29(6): 1525-1532.
- Yeats PA (1990). Reactivity, transport of nutrients and metals in the St. Lawrence Estuary. New York, Springer-Verlag.
- Yilmaz LS and Noguera DR (2004). Mechanistic approach to the problem of hybridization efficiency in fluorescent in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 70(12): 7126-7139.
- Yoshie S, Makino H, Hirose H, Shirotani K, Tsuneda S and Hirata A (2005). Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol*: 1-8.
- Yoshie S, Noda N, Miyano T, Tsuneda S, Hirata A and Inamori Y (2001). Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by

- denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method. *J Bioscience bioeng* 92(4): 346-353.
- Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, Hirata A and Inamori Y (2004). Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and microbial community analysis in the denitrification process of a saline industrial wastewater treatment system. *FEMS Microbiol Lett* 235(1): 183-189.
- Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, Hirata A and Inamori Y (2004). Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems. *Appl Environ Microbiol* 70(5): 3152-3157.
- Zeng RJ, Lemaire R, Yuan Z and Keller J (2003). Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. *Biotechnol Bioeng* 84(2): 170-178.
- Zhang TC and Lampe DG (1999). Sulfur: limestone autotrophic denitrification processes for treatment of nitrate-contaminated water: Batch experiments. *Water Res* 33(3): 599-608.
- Zumft WG (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(4): 533-616.