

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Caractérisation et classification des nouvelles espèces
Methylophaga nitratireducenticrescens et *Methylophaga frappieri***

Par
Céline Villeneuve

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Jonathan Perreault
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Karine Lemarchand
Institut des sciences de la mer de
Rimouski
Université du Québec à Rimouski

Directeur de recherche

Richard Villemur
INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Dans le cadre de l'étude du biofilm présent dans le bioréacteur dénitrifiant du Biodôme de Montréal par le laboratoire du professeur Richard Villemur de l'Institut Armand-Frappier, deux souches bactériennes ont été isolées. Une caractérisation préliminaire des souches JAM1 et JAM7 a montré qu'elles appartiennent au genre *Methylophaga* et que la souche JAM1 avait la capacité de réduire le nitrate. Le présent mémoire regroupe les travaux de caractérisation de ces deux souches bactériennes.

L'hypothèse de départ était que les souches JAM1 et JAM7 sont deux nouvelles espèces du genre *Methylophaga*. L'objectif de la présente étude était de caractériser microbiologiquement, biochimiquement et génétiquement les souches JAM1 et JAM7 pour ensuite les classer. Pour l'aspect microbiologique, la morphologie des cellules et des colonies a été observée, la coloration Gram a été effectuée et la taille des cellules a été déterminée. Pour l'aspect biochimique, trois galeries API ont été utilisées (API 20NE, API ZYM et API 50CH), différentes sources de carbones ont été testées, et les paramètres optimaux de croissance et les paramètres tolérés ont été évalués. La résistance à des antibiotiques a été déterminée. Pour l'aspect génétique, un arbre phylogénique des gènes de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S avec les espèces validées a été réalisé et le génome des 2 souches a été séquencé ainsi qu'assemblé et annoté. Une attention particulière a été portée aux gènes impliqués dans la dénitrification pour la souche JAM1 alors que de tels gènes n'ont pas été détectés pour la souche JAM7.

L'appartenance des souches JAM1 et JAM7 au genre *Methylophaga* a été démontré par l'analyse du gène de l'ARNr 16S et la concordance de marqueurs chemotaxonomiques tels que les acides gras de la membrane cellulaire, le contenu mol% G+C de l'ADN, la présence de catalase et d'oxydase, et la voie métabolique utilisée pour métaboliser les composés à un carbone. Pour ce qui est des acides gras de la membrane cellulaire, les 3 acides gras majoritaires identifiés pour les 2 souches sont les mêmes, soit C_{16:1}ω7c, C_{16:0} et C_{18:1}ω6c. Ces 3 acides gras ont également été identifiés comme majoritaires chez *M. alcalica*, *M. aminisulfidivorans*, *M. murata* et *M. lonarensis*. Les contenus en G+C des souches JAM1 et JAM7 sont respectivement 44.7 mol% et 47.9 mol% ce qui correspond à l'intervalle du genre *Methylophaga* qui est de 42,4 mol% à 50 mol%. Les 2 souches sont catalase et oxydase positives ce qui aussi le cas de toutes les espèces validées. Il a été déterminé que les 2 souches ont tous les gènes nécessaires à la voie du Ribulose-Monophosphate variant Entner-Doudoroff qui est utilisée par les espèces validées du genre *Methylophaga* pour assimiler les

composés à un carbone. Les souches JAM1 et JAM7 ont été identifiées comme étant de nouvelle espèce par l'analyse de l'homologie du gène de l'ARNr 16S qui est inférieur à 97% en comparaison avec les espèces connues du genre *Methylophaga*. Les deux souches entre elles présentaient 97% d'homologie et ont été distinguées par l'analyse de leur génome entier. Les noms proposés pour les souches JAM1 et JAM7 sont *Methylophaga nitratireducenticrescens* et *Methylophaga frappieri* respectivement.

Les paramètres de croissance optimaux des deux souches ont été déterminés via la croissance sur géloses, le dosage protéique de culture en milieu liquide et le suivi spectrophotométrique de cultures liquides. Les souches JAM1 et JAM7 présentent un pH optimal de 8 avec un écart toléré de pH 7 à 11. Elles ont un besoin pour l'ion Na⁺ avec une concentration optimale de 3% NaCl ainsi qu'un écart toléré de 0,5% à 10%.

L'étude du profil de réduction du nitrate de la souche JAM1 a permis de déterminer que la réduction du nitrate débutait en moins de 8 heures et était optimale à des concentrations de nitrate entre 16 et 81 mM et de méthanol est entre 31 et 312 mM.

L'étude du génome de la souche JAM1 a permis de constater la présence de tous les gènes nécessaires à une dénitrification complète du nitrate en azote gazeux, sauf le gène *nirK* qui a été trouvé tronqué. La complémentation de la souche JAM1 avec un gène *nirK* fonctionnel pourrait permettre d'obtenir une souche prometteuse pour un processus de dénitrification en eaux salées étant donné qu'elle est adaptée pour croître dans cet environnement. Le rôle de la souche JAM7 au sein du biofilm reste à déterminer. Elle pourrait contribuer à la formation du biofilm en produisant des exopolysaccharides et se maintenir à l'aide des traces d'oxygène.

Remerciements

Je veux d'abord remercier mon directeur de recherche, Richard Villemur (Ph. D.) de m'avoir offert la possibilité de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire. Sa disponibilité, son partage de connaissance et sa flexibilité ont été des éléments clés du succès de ma maîtrise. Sa confiance en mon travail m'a permis d'exercer mon indépendance et d'apprendre encore plus. Sa compréhension et sa générosité ont grandement contribué à la réussite de ma maîtrise.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de Richard. Merci à Julie, Karla, Silvia et Christine toujours prêtes à m'aider techniquement ou moralement. Merci à Marc pour ses conseils et le partage de son expérience et merci également à Thuy et Florian.

Je veux également remercier les membres du groupe de microbiologie de l'environnement pour leurs critiques positives et leurs suggestions qui ont facilité mon cheminement ou amélioré la qualité de la science réalisée durant ma maîtrise. Un grand merci à Sylvain Milot pour son aide avec le GC-FID.

Un merci tout particulier aux autres étudiants qui ont suivi les cours à l'automne 2010 pour leur soutien et leur camaraderie.

Je ne peux pas taire le soutien moral et financier de ma famille, particulièrement de mes parents sans qui je n'aurais pas pu m'installer aussi facilement à Laval pour réaliser ma maîtrise. Merci également à Eric pour sa présence, son écoute et ses encouragements qui m'ont permis de terminer ma maîtrise.

Finalement, je remercie la Fondation Armand-Frappier pour le support financier qui m'a été offert durant toute ma maîtrise.

Table des matières

1. Introduction	1
2. Revue de littérature	5
2.1. Dénitrification	5
2.2. Le genre Methylophaga	8
2.3. Description d'une nouvelle espèce bactérienne	10
2.4. Le séquençage des génomes bactériens et leur annotation	11
3. Matériel et Méthode	13
3.1. Souches utilisées	13
3.2. Milieux de culture	13
3.2.1. Milieu methylophaga 1403	13
3.3. Détermination des paramètres optimaux de croissance	14
3.3.1. Tests préliminaires sur gélose	14
3.3.2. Essais par dosage protéique pour les paramètres optimaux de croissance ...	15
3.3.3. Essais par Bioscreen pour les paramètres optimaux de croissance	15
3.4. Suivi de la réduction du nitrate	16
3.5. Caractérisation microbiologique générale	18
3.5.1. Résistance aux antibiotiques	18
3.5.2. Détermination des acides gras cellulaire	19
3.6. Caractérisation biochimique	19
3.6.1. Galeries API	19
3.6.2. Source de carbones	20
3.7. Caractérisation génétique	20
3.7.1. Arbre des séquences de l'ARNr 16S	20
3.7.2. Génome	21
4. Résultats	23

4.1. Détermination des paramètres optimaux de croissance	23
4.1.1. Tests préliminaires sur gélose	23
4.1.2. Essais par dosage protéique pour les paramètres optimaux de croissance ...	25
4.1.3. Essais en Bioscreen pour les paramètres optimaux de croissance	28
4.1.4. Courbe de croissance en conditions optimales aérobies.....	37
4.2. Suivi de la réduction du nitrate	38
4.3. Caractérisation microbiologique générale.....	44
4.3.1. Résistance aux antibiotiques.....	45
4.3.2. Détermination des acides gras	47
4.4. Caractérisation biochimique	48
4.4.1. Galeries API	48
4.4.2. Source de carbones.....	52
4.5. Caractérisation génétique	52
4.5.1. Arbre phylogénétique du gène de l'ARN ribosomal 16S.....	52
4.5.2. Génome.....	55
5. Discussion	58
5.1. Les souches JAM1 et JAM7 sont de nouvelles espèces.....	58
5.2. Génomes	59
5.3. Gènes de dénitrification chez la souche JAM1	60
5.4. Paramètres optimaux de croissance pour les souches JAM1 et JAM7	62
5.5. Suivi de la réduction du nitrate chez la souche JAM1	63
6. Conclusion	65

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Principales caractéristiques connues pour les espèces du genre <i>Methylophaga</i> validées	9
Tableau 3.1 : Antibiotiques et concentrations testées.....	19
Tableau 4.1 : Croissance à différents pH et différentes concentrations de NaCl.....	24
Tableau 4.2: Antibiotiques pour les souches JAM1 et JAM7.....	45
Tableau 4.3 : Détermination des acides gras cellulaire pour les souches JAM1 et JAM7	48
Tableau 4.5 : Résultats API ZYM pour les souches JAM1 et JAM7	50
Tableau 4.6 : Résultats API 50CH pour les souches JAM1 et JAM7	51
Tableau 4.7 : Homologie du gène de l'ARNr 16S des souches étudiées avec les espèces du genre <i>Methylophaga</i>	54
Tableau 4.8 : Informations générales sur le génome des souches JAM1 et JAM7	55

Liste des figures

Figure 2.1 Réactions du cycle microbien de l'azote	5
Figure 2.2 Chaîne de transport des électrons lors de la dénitrification chez <i>Paracoccus denitrificans</i>	7
Figure 2.3 Procédure standard d'annotation des gènes par DOE-JGI MAP	12
Figure 4.1 Croissance à différents pH de la souche JAM1	25
Figure 4.2 Croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM1.....	26
Figure 4.3 Croissance à différentes températures de la souche JAM1	26
Figure 4.4 Croissance à différents pH de la souche JAM7	27
Figure 4.5 Croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM7.....	27
Figure 4.6 Croissance à différentes températures de la souche JAM7	28
Figure 4.7 Détermination de la concentration optimale d'inoculum de la souche JAM1	29
Figure 4.8 Courbes de croissance à différentes températures des souches JAM1 et JAM7.....	30
Figure 4.9 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM1: Essai #1	31
Figure 4.10 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM1: Essai #2.....	31
Figure 4.11 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM1: Essai #3.....	32
Figure 4.12 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM7: Essai #1.....	32
Figure 4.13 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM7: Essai #2.....	33
Figure 4.14 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM7: Essai #3.....	33
Figure 4.15 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM1: Essai #1	34
Figure 4.16 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM1: Essai #2.....	34
Figure 4.17 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM1: Essai #3.....	35
Figure 4.18 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM7: Essai #1	35
Figure 4.19 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM7: Essai #2.....	36
Figure 4.20 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM7: Essai #3.....	36
Figure 4.21 Courbes de croissance en conditions optimales pour les souches JAM1 et JAM7 ..	37
Figure 4.22 Concentration de nitrate et de nitrite en fonction du temps dans des cultures de la souche JAM1 en conditions dénitrifiantes.	39
Figure 4.23 Effet de la concentration initiale de nitrate sur la croissance de la souche JAM1	40

Figure 4.24 Concentration de nitrate et de nitrite selon la concentration initiale de nitrate.....	41
Figure 4.25 Effet de la concentration initiale de méthanol sur la croissance.....	42
Figure 4.26 Concentration de nitrate et de nitrite selon la concentration initiale de méthanol.....	43
Figure 4.27 Observation du flagelle en microscopie électronique.....	44
Figure 4.28 Analyse phylogénétique de la séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S des membres du genre <i>Methylophaga</i>	53
Figure 4.29 Arrangement chromosomique des gènes de dénitrification chez la souche <i>Methylophaga</i> sp. JAM1.....	57
Figure 4.30 Séquence du gène <i>nirK</i> tronqué de la souche JAM1 aligné avec la séquence la plus proche.....	57

Liste des sigles et des abréviations

°C : Degrés Celsius

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

ATCC : american type culture collection

BSA: albumine de sérum bovin

CRISPRs: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

DOE-JGI MAP : DOE-JGI Microbial Annotation Pipeline

FISH: fluorescent *in situ* hybridization, hybridation fluorescente *in situ*

IMG/ER: Integrated Microbial Genomes Expert Review (serveur pour annoter un génome)

KDPG: 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate

MAR-FISH : microautoradiography- fluorescent *in situ* hybridization

MMA : monométhylamine

NaCl : chlorure de sodium

RAST: Rapid Annotation using Subsystem Technology (serveur pour annoter un génome)

SLM : mésocosme du Saint-Laurent marin

1. Introduction

Une des problématiques environnementales actuelle est le traitement des eaux usées. L'utilisation domestique et industrielle produit des eaux usées qui doivent être traitées pour éviter l'ajout ou l'accumulation de contaminants dans l'environnement. Différents types de traitements peuvent être utilisés. Par exemple, les déchets solides sont retirés par une méthode physique. Certains polluants sont facilement retirés par des résines qui constituent une méthode chimique. Finalement, plusieurs polluants sont retirés par des méthodes dites biologiques, impliquant l'action de microorganismes. Les méthodes biologiques sont souvent moins coûteuses, mais nécessitent plus de temps. Certains polluants très solubles, comme le nitrate, sont plus efficacement retirés par une méthode biologique

Un des contextes où l'enlèvement du nitrate est une problématique importante est la gestion d'aquarium ou de bassin d'élevage. Une concentration de nitrate supérieure à 20 mg N-NO₃⁻/L, est toxique pour la flore et faune aquatique. Dans les conditions de haute salinité, comme dans les aquariums d'eau de mer, la dénitrification a tendance à se faire à un taux moindre voir ne pas se faire.

Les souches JAM1 et JAM7 ont été isolées du biofilm du bioréacteur dénitrifiant à lit fluidisé alimenté au méthanol du système de traitement de l'eau du bassin du St-Laurent marin (SLM) du Biodôme de Montréal. Le St-Laurent marin qui comprend deux bassins d'exposition, un bassin d'isolement et un bassin médical totalise 3.25 millions de litres d'eau de mer artificielle (30 g/L de sel) maintenu à un pH de 8.0 et une température de 10°C. Le SLM abrite approximativement 600 poissons, une centaine d'oiseaux marins et 2000 invertébrés.

Le SLM est entré en fonction en 1992 et le nitrate s'y est accumulé rapidement atteignant jusqu'à 200 mg/L (Labbe et al., 2003a). Le nitrate est produit par nitrification des déchets ammoniacaux de la faune du SLM. Sachant que la limite de toxicité pour la faune aquatique est de 20 mg N-NO₃⁻/L (Camargo et al., 2005), le Biodôme a pris des mesures correctives soit l'ajout d'un système biologique d'enlèvement du nitrate au traitement de l'eau ainsi que le retrait de la colonie de Fous de Bassan qui produisait plus de 33% des déchets ammoniacaux (Parent et al., 2000). Le système de dénitrification a été installé en parallèle au système de traitement de l'eau et était composé d'un désoxygénateur à lit fixe et d'un bioréacteur à lit fluidisé. La colonisation du système s'est faite par les microorganismes du milieu par circulation de l'eau des bassins et sans aucune intervention. Les deux composantes

ont été alimentées en méthanol. La température de l'eau dans le système variait entre 16 et 18°C (Labbe et al., 2007).

Le laboratoire du Dr. Villemur étudie le biofilm dénitrifiant depuis 2000 dans l'optique de comprendre la microbiologie du système et d'améliorer les performances de dénitrification, puisque le système n'a pas atteint l'objectif de diminuer la concentration de nitrate sous la barre des 20 mg N-NO₃⁻/L, mais suite à l'ajout de métaux traces et à un renouvellement important de l'eau des bassins, une concentration autour de 50 mg N-NO₃⁻/L a pu être maintenue. Les premiers travaux de mise au point ont permis de montrer l'importance des métaux traces pour l'activité des métalloenzymes impliquées dans les différentes étapes de la dénitrification. L'ajout de ces métaux a amélioré l'efficacité du bioréacteur de 250% en faisant passer le taux quotidien de dénitrification de 200 à 700 g NO_x-N/jour (Labbe et al., 2003b).

L'étape suivante a été de déterminer quelle était la diversité microbienne du biofilm et d'identifier quels genres bactériens y étaient présents. Des méthodes de culture et de biologie moléculaire ont été employées. La biomasse récupérée du bioréacteur a étéensemencée sur différents milieux de culture et des souches ont été identifiées par séquençage de leur gène de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S. Parmi celles-ci, la souche NL23 a été apparentée au genre *Hyphomicrobium*. Une génothèque de clones du gène de l'ARNr 16S a aussi été réalisée. Environ 15 à 20 espèces bactériennes auraient colonisé le bioréacteur (Labbe et al., 2003a). Par contre, plus de 70% des clones étaient apparentés au genre *Methylophaga*.

Ensuite, le processus de colonisation et la structure du biofilm a été étudiés par hybridation fluorescente *in situ* (FISH). Les résultats ont confirmé que les bactéries composant le biofilm appartiennent en majorité aux gamma-protéobactéries et étaient apparentées au genre *Methylophaga*. Les alpha-protéobactéries, incluant les *Hyphomicrobium*, représentaient aussi une portion importante de la population bactérienne. On a aussi voulu identifier les populations méthylophages par microautoradiographie-hybridation fluorescente *in situ* (MAR-FISH). Les alpha-protéobactéries ont consommé le méthanol dans les conditions utilisées, mais pas les bactéries affiliées au genre *Methylophaga* malgré leur abondance. L'hypothèse pour expliquer ce résultat serait la présence de trappe à CO₂ (Labbe et al., 2007) qui aurait empêché la pleine croissance de ces *Methylophaga*.

Suite à ces résultats, la technique de *stable-isotope probing* (SIP) a été utilisée afin d'identifier les bactéries méthylophages dénitrifiantes dans le biofilm. Avec cette technique, il a été démontré que les bactéries appartenant au genre *Methylophaga* assimilent le méthanol en absence d'oxygène et en présence de nitrate. Par la suite, deux souches (JAM1 et JAM7)

apparentées au genre *Methylophaga* ont été isolées. La capacité de la souche JAM1 à croître en absence d'oxygène en réduisant le nitrate en nitrite a été démontrée. Ceci était la première démonstration de l'adaptation de bactéries du genre *Methylophaga* à un environnement anaérobie. Deux gènes codant pour le nitrate réductase membranaire (*narG*) ont été identifiés chez la souche JAM1. L'analyse des séquences des gènes *narG* a suggéré qu'un de ces deux gènes a été acquis par transfert horizontal de gènes étant donné son affiliation aux beta-protéobactéries (Auclair et al., 2010).

En parallèle, les populations dénitrifiantes du biofilm ont été identifiées. Pour ce faire, une partie des gènes *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *qnorB* et *nosZ*, codant pour les sous-unités catalytiques des réductases impliquées dans la dénitrification a été amplifiée par PCR avec des amorces dégénérées. Vingt-cinq séquences en rapport avec ces gènes ont été obtenues et parmi celles-ci se retrouvaient les séquences *narG* de la souche JAM1 précédemment identifiées. Les séquences de *napA1*, *nirK1*, *cnorB9* et *nosZ3* correspondaient à celles trouvées chez *Hyphomicrobium* sp. NL23, isolé du biofilm (Auclair et al., 2010).

Par la suite, des expériences en PCR quantitatif ont été effectuées pour évaluer l'abondance des bactéries dénitrifiantes versus les bactéries qui respirent le nitrate. Le nombre de copie des gènes *narG*, *napA*, *nirS* et *nirK* a été déterminé et les gènes les plus abondants étaient *napA1*, *nirK1*, *narG1* et *narG2* associées à *Methylophaga* sp. JAM1 ou à *Hyphomicrobium* sp. NL23. Ces résultats ont indiqué la prédominance de *Methylophaga* sp. JAM1 et de *Hyphomicrobium* sp. NL23 parmi la population dénitrifiante du biofilm (Auclair et al., 2011A).

Sa capacité de dénitrification et son adaptation aux conditions du bioréacteur, font de la souche JAM1 une souche d'intérêt dans l'élaboration d'un procédé de dénitrification plus efficace et motive son étude. La souche JAM7 qui n'utilise pas le nitrate présente quant à elle un intérêt de par le fait qu'elle est été isolée d'un environnement pauvre en oxygène et qu'elle appartienne à un genre dont toutes les espèces validées sont aérobies.

L'hypothèse de départ de mon travail était que les souches JAM1 et JAM7 sont deux nouvelles espèces du genre *Methylophaga* ayant évoluées pour s'adapter aux conditions du bioréacteur dénitrifiant. L'objectif principal est la caractérisation et la classification des deux souches JAM1 et la souche JAM7 qui sont toutes deux affiliées au genre *Methylophaga*. Les objectifs spécifiques sont la caractérisation physiologique et morphologique, la caractérisation biochimique et le séquençage des génomes pour les souches JAM1 et JAM7. La caractérisation des souches JAM1 et JAM7 permettra de démontrer leur adaptation aux conditions d'un

bioréacteur dénitrifiant en eaux salées. Il sera alors possible de concevoir des co-cultures avec d'autres microorganismes isolés du biofilm pour comprendre les interactions interspécifiques et la dynamique fonctionnelle du biofilm afin de développer un procédé de dénitrification efficace en eaux salées.

2. Revue de littérature

2.1. Dénitrification

L'azote est l'un des éléments essentiels du vivant en faisant partie entre autres des protéines et des acides nucléiques. Il circule de ses formes inorganiques à organiques et vice versa via le cycle de l'azote. La figure 2.1 présente le cycle de l'azote microbien. Les différentes formes de l'azote sont l'azote gazeux (N_2), l'ammonium (NH_4^+), l'hydrazine (N_2H_4), l'hydroxylamine (NH_2OH), le nitrite (NO_2^-), le nitrate (NO_3^-), l'oxyde nitrique (NO) et l'oxyde nitreux (N_2O).

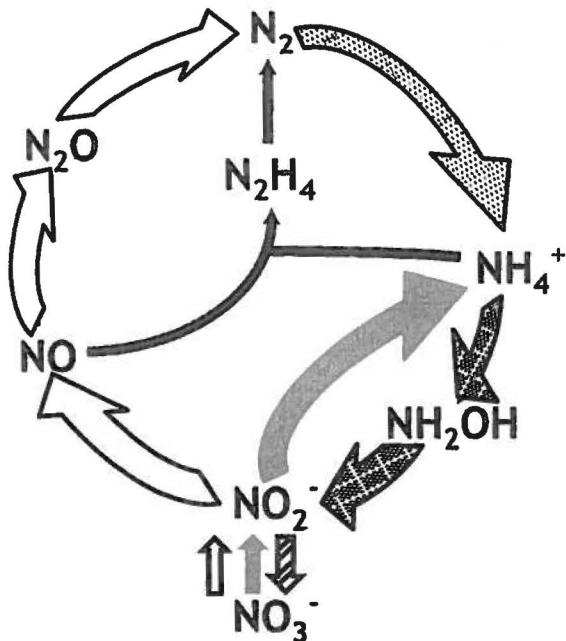


Figure 2.1 Réactions du cycle microbien de l'azote

Les flèches vides montrent la dénitrification soit le passage du nitrate à l'azote gazeux. La fixation de l'azote est indiquée par une flèche avec des points. Les flèches à damier montrent l'oxydation anaérobie de l'ammonium. La flèche hachurée indique l'oxydation aérobie du nitrite. Les flèches grises montrent la réduction dissimilatrice du nitrate et du nitrite en ammonium. La flèche noire pleine montre l'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox). Modifiée de Jetten (2008)

La dénitrification occupe une place importante dans le cycle de l'azote et dans la production d'énergie chez les bactéries. Le phénomène de dénitrification est défini comme étant la transformation dissimilatrice du nitrate ou nitrite à une forme gazeuse produisant de l'énergie (Zumft, 1997). La dénitrification est illustrée à la figure 2.2. La capacité de dénitrifier est facultative chez la plupart des bactéries et déclenchée par des facteurs comme l'absence d'oxygène ou la présence d'oxydes d'azote. La dénitrification permet l'utilisation du nitrate, du nitrite, de l'oxyde nitrique ou de l'oxyde nitreux comme accepteur d'électron en remplacement de l'oxygène. Pour ce faire, la bactérie doit disposer de différentes métalloenzymes. La capacité d'effectuer la dénitrification partiellement ou en entier est largement répandue parmi les différents embranchements bactériens et est présente chez les Archaea (Herbert, 1999, Jetten, 2008).

La première enzyme nécessaire est la nitrate réductase qui réduit le nitrate en nitrite. Certaines bactéries font seulement cette étape de la dénitrification; on dit alors qu'elles effectuent la respiration du nitrate. Deux types d'enzymes peuvent réaliser cette étape soit la nitrate réductase membranaire, codée par les gènes *nar* et la nitrate réductase périplasmique, codée par les gènes *nap* (Zumft, 1997).

L'étape suivante est catalysée par la nitrite réductase qui est l'enzyme clé de la dénitrification menant au premier intermédiaire gazeux. Deux types d'enzymes différentes effectuent cette étape soit un type d'enzyme codé par le gène *nirK*, utilisant un cofacteur cuivre et l'autre, codé par le gène *nirS*, utilisant un cytochrome de type cd_1 . Les 2 types d'enzymes seraient mutuellement exclusifs pour une souche bactérienne donnée, mais dans un même genre bactérien ou une même espèce bactérienne les 2 types peuvent être présents (Zumft, 1997).

Par la suite, la réduction de l'oxyde nitrique en oxyde nitreux est effectuée par une oxyde nitrique réductase. Cet intermédiaire de la dénitrification doit être maintenu à une faible concentration, car c'est un radical libre toxique pour les microorganismes, dénitrificateurs compris (Goretski et al., 1990, Ye et al., 1994). Deux formes périplasmiques de l'enzyme existent soit cNorB et qNorB chez les bactéries Gram négatif. Des sous-unités cytochromes b et c sont impliquées.

La dernière étape de la dénitrification est la réduction de l'oxyde nitreux en azote moléculaire gazeux par l'oxyde nitreux réductase. Durant cette étape, le transfert d'électron

s'effectue via le cytochrome bc1 et s'accompagne du transfert d'un proton à travers la membrane ce qui produit de l'énergie. L'oxyde nitreux réductase est une enzyme périplasmique codée par les gènes *nos*. (Zumft, 1997)

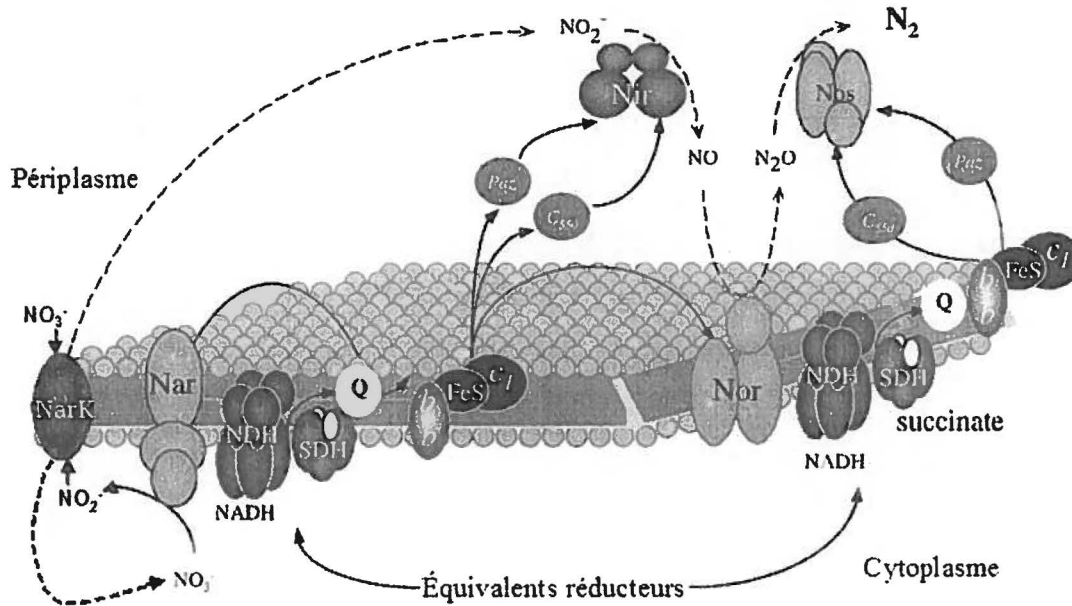


Figure 2.2 Chaîne de transport des électrons lors de la dénitrification chez *Paracoccus denitrificans*.

Dans cet exemple le succinate sert de source de carbone et d'énergie. Nar, nitrate réductase membranaire; Nir : nitrite réductase (cdNir); Nor : oxyde nitrique réductase (cNorB); Nos : oxyde nitreux réductase (N₂Or); NDH : NADH-ubiquinone oxidoréductase; SDH, succinate déhydrogenase; Q : réservoir d'ubiquinone; NarK : transporteur nitrate/nitrite; P_{BZ} : pseudoazurine; C₅₅₀ : cytochrome c₅₅₀; Complexe bb/FeS/C1 : complexe cytochrome bc1.

Tiré de la thèse de Auclair 2011B

Il a été documenté que ce soit dans le cas d'eau de rejet industriel ou d'eau de mer, que la présence de sel influence négativement la dénitrification (Osaka et al., 2008, Xiao et al., 2010). Cependant, plusieurs études rapportent la présence de bactéries adaptées effectuant efficacement la dénitrification dans ces conditions (Osaka et al., 2008, Xiao et al., 2010, Yoshie et al., 2004, Yoshie et al., 2006).

2.2. Le genre *Methylophaga*

Le genre *Methylophaga*, appartenant aux gamma-protéobactéries, a été décrit pour la première fois en 1985 par Janvier et al (1985) et sa description a été amendée par Boden et al (2011). Le genre *Methylophaga* est composé de 8 espèces validées soit *M. alcalica* (Doronina et al., 2003b), *M. aminisulfivorans* (Kim et al., 2007), *M. Marina* (Janvier et al., 1995), *M. muralis* (Doronina et al., 2005) précédemment nommées "*M. murata*", *M. sulfidovorans* (deZwart et al., 1996), *M. thalassica* (Janvier et al., 1995), *M. thiooxydans* (Boden et al., 2010) et *M. lonarensis* (Antony et al., 2011). Deux autres espèces sont mentionnées dans la littérature soit "*M. limanica*" (Doronina et al., 1997) et "*M. natronica*" (Doronina et al., 2003a), mais elles ne sont pas validées. Le tableau 2.1 présente les principales caractéristiques connues pour les espèces validées compilées à partir des articles mentionnées précédemment.

Les espèces appartenant à ce genre sont des bacilles Gram négatif, aérobies et halophiles modérés. Certaines espèces sont alcaliphiles, réduisent le nitrate en nitrite et sont auxotrophiques pour la vitamine B₁₂. Ces bactéries ne croissent pas sur des milieux complexes ou en absence de NaCl. Elles sont catalase et oxydase positives. Ce sont des méthylotrophes qui n'utilisent pas le méthane. Les composés à un carbone sont assimilés via la voie métabolique du Ribulose-MonoPhosphate (RuMP) variant 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aussi appelé variant Entner-Doudoroff. Certaines espèces peuvent croître sur des composés à plusieurs carbones comme le fructose. Le contenu en G+C varie de 42 à 50 mol%. Les espèces de ce genre sont typiquement isolées d'environnement où l'activité de l'eau est faible comme le milieu marin. Certaines espèces sont chemolithohétérotrophes, mais aucune croissance autotrophe n'a été observée chez ce genre. En se basant sur l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S, le genre se divise en deux clades soit un clade comprenant l'espèce type, *M. marina* et un second clade regroupant des espèces alcaliphiles (*M. alcalica*, *M. lonarensis* et *M. muralis*) (Boden, 2011, Janvier et al., 1985, Janvier et al., 1995).

Tableau 2.1 : Principales caractéristiques connues pour les espèces du genre *Methylophaga* validées

	<i>Methylophaga alcalica</i>	<i>Methylophaga aminisulfivorans</i>	<i>Methylophaga marina</i>	<i>Methylophaga muralis</i>	<i>Methylophaga sulfidorans</i>	<i>Methylophaga thalassica</i>	<i>Methylophaga thiooxydans</i>	<i>Methylophaga ionarensis</i>
Contenu G-C de l'ADN (mol%G-C)	48,3	44,9	43	44,6	42,4	44	45,9	50
Morphologie cellulaire	bacilles 0.6– 0.8 x 1.4– 2.8 µm	bacilles 0.2– 0.4 x 1.0– 1.2 µm	bacilles 0.2 x 1.0 µm	bacilles 0.7 x 1.7– 2.0 µm	bacilles 0.2 x 0.9 µm	bacilles 0.2 x 1.0 µm	bacilles 0.6 x 1.8 µm	bacilles 1.2-2.0 x 0.2 µm
Mobilité	+	-	+	+	+	+	+	+
Auxotrophie vitamine B12	+	-	+	+	+	+	-	-
Principaux acides gras cellulaires	C16:0 C16:1 C18:1	C16:0 C16:1	ND	C16:0 C16:1 C18:1	ND	ND	ND	C16:0 C16:1 C18:1
Intervalle de pH qui permet la croissance	8-11	6-8	ND	6-11	ND	ND	ND	7-10
Intervalle de température (°C) qui permet la croissance	4-35	ND	10-40	0-42	ND	10-40	ND	20-37
Croissance avec méthanol	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance avec fructose	-	+	+	+	-	+	+	-
Croissance avec MMA*	+	+	+	+	+	+	+	-

ND : information non disponible, *MMA : monométhylamine, Références : (Doronina et al., 2003b), (Kim et al., 2007), (Janvier et al., 1995), (Doronina et al., 2005) (deZwart et al., 1996), (Janvier et al., 1995), (Boden et al., 2010) (Antony et al., 2011).

2.3. Description d'une nouvelle espèce bactérienne

Lorsqu'une souche bactérienne est isolée, on veut savoir si elle appartient à un genre connu et s'il s'agit d'une nouvelle espèce. La première technique couramment utilisée pour rattacher une souche à un genre bactérien est le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. À partir de la séquence obtenue, on peut rechercher le genre le plus proche dans des banques de données. Si la similitude est élevée, on peut conclure que la souche appartient à ce genre bactérien. Dans le cas où la séquence n'est proche d'aucun genre, on peut supposer qu'il s'agit d'un nouveau genre bactérien.

Le pourcentage d'homologie du gène codant pour l'ARNr 16S permettant de conclure qu'une souche appartient à un genre est assez variable. Chez certain genre, le pourcentage d'homologie entre les espèces est proche du 97% comme par exemple chez les *Enterobacteriaceae* et quelques membres des Actinomycètes alors que pour d'autres genres il est plus bas comme par exemple chez les genres *Deinococcus* et *Hymenobacter*. Il a été établi qu'un pourcentage d'homologie du gène codant pour l'ARNr 16S entre 95 et 97% à l'intérieur d'un même genre indique une nouvelle espèce (Tindall et al., 2010). Lorsque le pourcentage d'homologie dépasse 97%, une autre méthode doit être utilisée, par exemple la réassociation ADN-ADN des génomes, pour confirmer si une souche appartient à une espèce existante ou est une nouvelle espèce. Un pourcentage de réassociation inférieur à 70% indique une nouvelle espèce (Wayne, 1988).

D'autres gènes peuvent être utilisés particulièrement pour les genres pour lesquels le gène de l'ARNr 16S est trop conservé pour servir d'indicateur taxonomique. Par exemple, le genre *Hyphomicrobium* présente des pourcentages d'homologie très élevés entre les espèces et on utilise plutôt le gène *mxoF* codant pour la méthanol déhydrogénase afin de distinguer les espèces (Fesefeldt et al., 1997). Il est également possible si les génomes sont disponibles de faire une comparaison à cette échelle.

On ne peut cependant affirmer quoique ce soit sans avoir plus d'informations. Il est important que la caractérisation génétique soit accompagnée d'une caractérisation morphologique, physiologique et biochimique. Les caractéristiques de base comme la morphologie, le Gram et la mobilité permettent de relier la souche à son genre. Si l'information obtenue ne correspond pas à l'espèce, il faut considérer toute l'information obtenue pour déterminer si la réponse donnée par les méthodes génétiques est valable.

Certaines caractéristiques cellulaires sont des marqueurs taxonomiques puisqu'ils sont conservés à l'intérieur d'un même genre. Ces caractéristiques sont, mais ne se limitent pas à ceux-ci, les acides gras de la membrane cellulaire, le % G+C de l'ADN, les quinones respiratoires, les lipides polaires, les pigments, le type de peptidoglycanes et les acides mycoliques (Tindall et al., 2010). Ces éléments ne sont pas présents chez tous les genres bactériens, alors il faut considérer ceux qui sont pertinents pour un genre donné. On peut également établir un profil biochimique en déterminant les substrats utilisés et les enzymes présentes chez une souche. Toutes les informations précédentes mises en commun permettent d'établir le statut taxonomique d'une souche bactérienne ainsi que de déterminer son genre et son espèce.

2.4. Le séquençage des génomes bactériens et leur annotation

De nombreux génomes bactériens sont maintenant disponibles et plus encore sont en cours de séquençage grâce à l'arrivée de méthodes de séquençage plus efficaces, rapides et moins coûteuses. Pour tirer de l'information de la séquence, il faut localiser et identifier les cadres de lecture présents et les comparer avec des gènes connus. Ce processus peut être partiellement ou complètement automatisé.

Le principe est d'utiliser des programmes de prédiction des gènes qui vont identifier les cadres de lecture possibles pour les protéines et certains types d'ARN. Ensuite, les séquences de ces gènes sont comparées à des banques de données pour trouver des gènes connus semblables et prédire leur fonction (Stothard et al., 2006). Il existe de nombreux serveurs plus ou moins automatisés. Ici deux serveurs seront présentés soit Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) <http://rast.nmpdr.org/> (Aziz et al., 2008) et Integrated Microbial Genomes Expert Review (IMG/ER) (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/er/main.cgi>).

RAST permet d'identifier les gènes codant pour des protéines, des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert en utilisant la collection de sous-systèmes produite par "The Project to Annotate 1000 Genomes" et une collection de familles de protéines nommée *FIGfams*. Un sous-système est un regroupement de fonctions qui sont nécessaires à un processus biologique ou à un complexe structural. On peut utiliser le terme "voie" d'un point de vue plus générale comme par exemple la voie de la glycolyse. RAST détermine la fonction prédite des gènes selon deux processus soit l'annotation des gènes faisant partie d'un sous-système ou non. Les gènes faisant partis d'un sous-système sont annotés en recherchant tous les gènes homologues

nécessaires à l'obtention d'un sous-système fonctionnel. Les autres gènes sont annotés de manière traditionnelle soit par de nombreux outils qui produisent et intègrent les preuves de fonction comme la présence de domaines protéiques. Cette annotation différentielle permet de reconstituer des voies métaboliques et d'obtenir des annotations pertinentes pour la compréhension de l'information génomique. RAST permet d'annoter un génome en 12 à 24 heures sous des conditions d'achalandage normal (50 à 100 génomes par jour). L'information est facilement téléchargeable et peut être visualisée dans un environnement SEED. Ce serveur permet la recherche de gènes particuliers, la comparaison avec les génomes disponibles et la visualisation des voies métabolique présentes.

Pour ce qui est d'IMG/ER, c'est un des 4 systèmes qui constituent IMG. Lorsque l'on soumet la séquence génomique à IMG/ER, on peut soumettre des annotations provenant d'une autre source ou demander que notre séquence soit annotée par DOE-JGI Microbial Annotation Pipeline (DOE-JGI MAP). À l'aide d'outils de prédiction, les *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPRS) et certains gènes codant pour des ARN sont identifiés. Ensuite, les gènes codant pour des protéines sont localisés en utilisant GeneMark ou Metagene. Les résultats sont utilisés pour créer un fichier Genbank qui contient les annotations en termes de cadres de lecture. Ce fichier est téléchargé dans la base de données IMG/ER pour le génome correspondant. À partir des cadres de lecture, les annotations sont effectuées selon le schéma illustré à la figure 2.3.

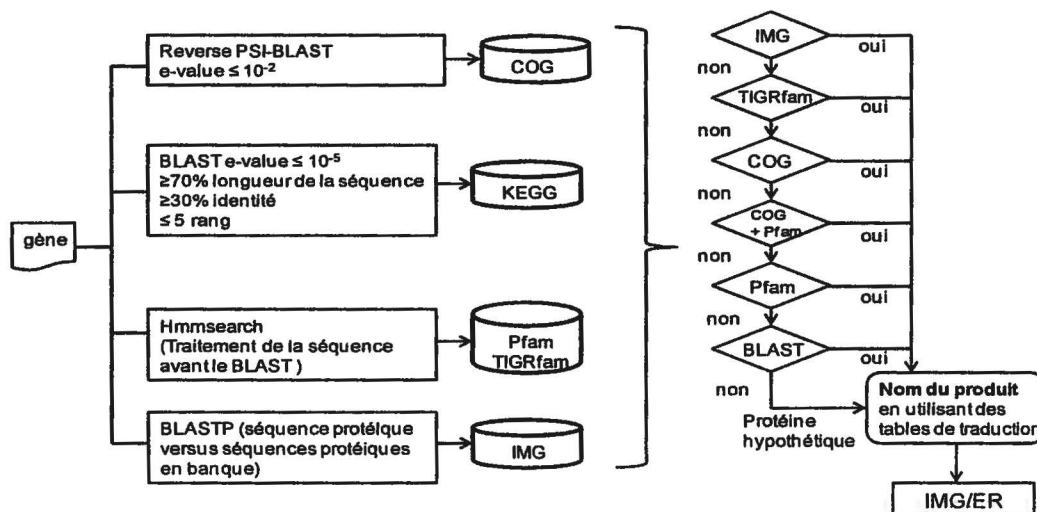


Figure 2.3 Procédure standard d'annotation des gènes par DOE-JGI MAP

Les gènes sont d'abord comparés à des familles de protéines (COGs, Pfam, TIGRfam) et à des banques de protéines (KEGG, IMG). Le produit du gène est nommé suite à un processus de vérification d'identité dans IMG et dans les banques de protéines. (figure modifiée de (Mavromatis et al., 2009)

3. Matériel et Méthode

3.1. Souches utilisées

Les souches JAM1 et JAM7 utilisées pour réalisées ces travaux ont été isolées d'un biofilm dénitrifiant provenant du système de traitement de l'eau du bassin du St-Laurent marin au Biodôme de Montréal par Julie Auclair(2010). Elles ont été conservé à -80°C dans du milieu de culture additionné de 25% de glycérol comme cryoprotecteur.

3.2. Milieux de culture

3.2.1. Milieu methylophaga 1403

Ce milieu a été utilisé pour cultiver les souches JAM1 et JAM7 puis que c'est le milieu utilisé dans la littérature pour cultivé *Methylophaga marina* qui est l'espèce type de ce genre bactérien. Ce milieu était composé d'une base minérale avec pour 990 ml (volume final) 24 g de NaCl; 3 g de MgCl₂ •6 H₂O; 2 g de MgSO₄•7 H₂O; 0,5 g de KCl, 1 g de CaCl₂ et 0,5 g de Bis-Tris, à un pH de 7.3 (NaOH ou HCl). Le tout a été stérilisé par autoclavage. Trois ml de méthanol stérilisé (filtré sur filtre 0.2 µm Sarstedt en Polyethersulfone), 20 ml de solution T et 1 ml de solution de vitamine B₁₂ à 0,1 mg/ml et 10 ml de solution minérale de Wolf (ATCC) ont été ajoutés. Le tout a été entreposé à 4°C à l'abri de la lumière. La solution T était composée, pour 100 ml, de 0,7 g de KH₂PO₄; 10 g de NH₄Cl; 10 g de Bis-Tris et 0,3 g de citrate d'ammonium ferrique, à un pH de 7,3 (NaOH ou HCl), et le tout stérilisé par autoclavage. La solution de Wolf utilisée était celle achetée chez l'ATCC. Pour un volume final de 1L, la solution de Wolf était composée de 1,5 g d'acide nitriloacétique; 3.0 g de MgSO₄•7 H₂O; 0,5 g de MnSO₄•H₂O; 1 g NaCl; 0,1 g de FeSO₄•7 H₂O; 0,1g de CoCl₂•6 H₂O; 0,1 g de CaCl₂; 0,1 g de ZnSO₄•7 H₂O; 0,01 g de CuSO₄•5 H₂O; 0,01g de AlK(SO₄)₂•12H₂O ; 0,01 g de H₃BO₃ et 0,01 g de Na₂MoM₄•2H₂O.

Les géloses ont été préparées à partir d'une base minérale 2X et d'une solution d'agar 3%. Les deux solutions ont été autoclavées, puis refroidies à 60°C. Trois ml de méthanol (filtré sur filtre 0.2 µm Sarstedt), 20 ml de solution T, 1 ml de solution de vitamine B12 (0,1 mg/ml) et 10 ml de solution minérale de Wolf (ATCC) ont été ajoutés stérilement à la base minérale 2X. La base minérale et la solution d'agar ont été mélangées, puis verser dans des plats de Pétri à raison d'environ 20 ml. Tous les milieux ont été entreposés à 4°C à l'abri de la lumière.

3.3. Détermination des paramètres optimaux de croissance

L'objectif de l'ensemble de ces expériences étaient de déterminer les conditions optimales de croissance des souches JAM1 et JAM7 en terme de température, de pH et de % de NaCl. D'abord des tests préliminaires ont été effectués sur gélose methylophaga pour déterminer les plages de pH et de % de NaCl pertinentes à tester.

Ensuite, des dosages protéiques sur des cultures de 2 ml en tubes ont été utilisés pour obtenir des résultats quantitatifs puisque le suivi de la croissance par densité optique était impossible en présence de floccs et de biofilm. La présence de biofilm adhérant à la paroi du tube affectait la précision et la reproductibilité des dosages protéiques.

Une autre méthode de suivi de la croissance a été utilisée. L'appareil utilisé était le Bioscreen qui combine la fonction d'incubateur-agitateur et de spectrophotomètre. Il a été possible de suivre la densité optique de 200 cultures individuelles d'un volume de 200 µl. Cet outil a permis de tester diverses conditions de culture avec 10 répétitions et ce pendant 40 heures avec une lecture à toutes les 30 minutes. L'agitation étant par vibration, il n'y a pas eu de formation de floccs chez la souche JAM1 et des cultures uniformes ont été obtenues ce qui a permis de suivre la croissance par densité optique.

3.3.1. Tests préliminaires sur gélose

Une pré-culture des souches JAM1 et JAM7 a été obtenue par croissance sur le milieu methylophaga 1403 pendant 2 jours à partir de stock congelé. La pré-culture a été striée sur des géloses methylophaga 1403 à une température d'incubation de 30°C pour JAM1 et de 34°C pour JAM7. Les températures d'incubation différentes pour chacune des souches sont selon des observations rapportées par Julie Auclair (laboratoire R. Villemur, données non-publiées). Des géloses à différents pH ont été préparées en ajustant le pH de la solution T et de la base minérale. Les pH 5, 6, 9, 10 et 11 ont été testés. Les concentrations de NaCl testées étaient 0%, 1%, 3%, 5%, 8% et 10%. Chaque condition a été testée en triplicata. Les essais ont été réalisés avec le milieu methylophaga recommandé par l'ATCC soit à 2,4% de NaCl pour les essais de pH, et à pH 7.3 pour les essais de NaCl. Le milieu contenait 0,3% de méthanol. La croissance obtenue a été comparée à des géloses témoin à pH 7,3 et à 2,4% de NaCl.

3.3.2. Essais par dosage protéique pour les paramètres optimaux de croissance

Des géloses methylophaga 1403 ont été striées à partir de stocks congelés des souches JAM1 et JAM7. Elles ont été incubées à 30°C pendant environ une semaine. Une seule colonie a été repiquée dans 15 ml de milieu methylophaga 1403 liquide. Les cultures ont été incubées à 30°C avec agitation à 200 rpm pendant environ 48 heures. Cent µl de culture ont été transférés dans du milieu frais et incubés pour 12-24 heures dans les mêmes conditions. Un dosage protéique a été effectué pour déterminer la concentration en protéines dans le but d'inoculer les tubes de culture de manière reproductible.

Les températures 37, 34, 30, 15°C et température pièce ont été testées. Les pH 7, 8, 9 et 10 ainsi que les % de NaCl 0,5 ; 1,0; 3,0 et 5,0 ont été testés. Des tubes en verre de 15 ml contenant 2 ml de milieu methylophaga 1403 ont été inoculés avec les souches à raison de 10 µg/ml de protéines. Les tubes ont été incubés à 30°C pour JAM1 et à 34°C pour JAM7 ou selon la valeur testée avec une agitation de 200 rpm. Après incubation de 24 et 48 heures, la biomasse de chaque tube (2 ml) a été récupérée par centrifugation (1 min à 13 000 rpm).

Les dosages protéiques ont été effectués selon l'essai de dosage protéique de Bio-Rad fourni avec le kit Bio-rad protein assay (cat : 500-0006). Les culots de biomasse ont été dispersés dans 1 ml de NaOH 0,1N et incubés à 70°C pendant une heure en vortexant à la mi-temps. Une courbe standard a été préparée avec de l'albumine de sérum bovin (0, 8, 15, 30, 40 et 50 µg/ml) dans du NaOH 0,1N. Les échantillons ont été dilués si nécessaire. Les échantillons et les standards ont été déposés dans une plaque 96 puits à fond plat à raison de 160 µl par puits. Le réactif de Bio-Rad a été ajouté à chaque puits à raison de 40 µl par puits et bien mélangé. La plaque a été incubée cinq minutes à température de la pièce. La plaque a été lue au lecteur de plaque µQuant de Biotek instruments à une longueur d'onde de 595 nm. Les concentrations de protéines ont été calculées à l'aide de la courbe standard en tenant compte du facteur de dilution si nécessaire. Chaque échantillon et standard ont été dosés en triplicata.

3.3.3. Essais par Bioscreen pour les paramètres optimaux de croissance

Des géloses methylophaga 1403 ont été striées à partir de stocks congelés des souches JAM1 et JAM7. Elles ont été incubées à 30°C pendant environ une semaine. Une seule colonie a été repiquée dans 15 ml de milieu methylophaga 1403 liquide. Les cultures ont été incubées à 30°C avec agitation à 200 rpm pendant environ 48 heures. Cent µl de culture ont été transférés dans du milieu frais et incubées pour 12-24 heures dans les même conditions. Un dosage

protéique a été effectué pour déterminer la concentration en protéines dans le but d'inoculer les plaques Bioscreen de manière reproductible. Le dosage protéique a été effectué comme mentionné dans la section précédente.

L'appareil qui a été utilisé pour suivre la croissance était un spectrophotomètre-incubateur Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki, Finlande). La lecture d'absorbance a été faite avec le filtre *wide band* (420-580 nm) et l'agitation sélectionnée était *medium*. Les plaques ont été incubées à 30°C sauf lors des essais de détermination de la température optimale.

D'abord, la concentration protéique d'inoculum optimale a été déterminée. Des courbes de croissance ont été réalisées avec la souche JAM1 avec des concentrations d'inoculum de 1; 2,5; 5; 10 et 15 µg/ml. La même concentration protéique a été utilisée pour inoculer avec la souche JAM7.

Ensuite, de nouvelles plaques ont été réalisées en variant la température, le pH ou le % de NaCl. Ces plaques ont été inoculées à 10 µg/ml de protéine. Les expériences ont été répétées 3 fois et chaque absorbance à un temps donné correspondait à la moyenne d'absorbance de 10 puits.

Finalement, une courbe de croissance dans les conditions optimales pour chaque souche a été réalisée. Des plaques Bioscreen ont été préparées selon les paramètres optimaux déterminés précédemment et incubées à la température optimale pour les souches JAM1 et JAM7. Ces plaques ont été inoculées à 10 µg/ml de protéine. Les expériences ont été répétées 3 fois et chaque absorbance à un temps donné correspondait à la moyenne de 10 puits.

3.4. Suivi de la réduction du nitrate

Cette section concerne des essais réalisés seulement avec la souche JAM1, puisque la souche JAM7 ne présentait aucune capacité de réduire le nitrate. Deux méthodes de culture différentes ont été utilisées pour suivre la dénitrification. D'abord, des plaques Bioscreen ont été réalisées en milieu anaérobie (chambre anaérobie BAC II alimenté à l'azote gazeux, Shel Lab, États-Unis). Les plaques étaient scellées avec de la silicone avant d'être sorties de la chambre anaérobie pour être incubées dans le Bioscreen. Le milieu *methylophaga* 1403 était préparé comme mentionné précédemment, mais la base minérale était supplémentée en nitrate

(14,1 mM (200 ppm NO₃-N)) à moins d'indication contraire). Le milieu était entreposé dans la chambre anaérobique au moins 24 heures avant d'être utilisé. Les ajouts étaient faits dans la chambre anaérobique juste avant utilisation. L'inoculation se faisait comme mentionnées précédemment à 10 µg/ml de protéines dans la chambre anaérobique.

L'autre technique utilisée était la croissance en vial anaérobique. Du milieu methylophaga 1403 supplémenté en nitrate (14,1 mM à moins d'indication contraire) a été distribué dans des vials qui étaient ensuite scellés. Les vials ont été barbotés à l'azote gazeux pendant 10 min. Les vials ont été autoclavés et les ajouts pour le milieu methylophaga 1403 ont été faits à la seringue dans la chambre anaérobique ainsi que l'inoculation à 10 µg/ml de protéines.

Le dosage du nitrate et du nitrite a été fait avec le chromatographe ionique 850 professional IC Metrohm. La colonne utilisée était la Metrosepp A supp 5 de dimension 250 X 4,0 mm. La colonne était maintenue à 35°C. L'éluant utilisé était une solution de 3,2 mmol/l Na₂CO₃ et 1 mmol/l NaHCO₃. Le débit était de 0,7 ml/min. Le nitrate et le nitrite ont été détectés en conductivité et en UV. La courbe standard comptait 7 standards contenant. 0,002/0,002; 0,008/0,011; 0,016/0,022; 0,081/0,109; 0,129/0,174; 0,161/0,217 et 0,323/0,435 mM de nitrate/nitrite (0,1; 0,5; 1; 5; 8; 10 et 20 ppm d'ion nitrate et d'ion nitrite). Les échantillons ont été centrifugés à 13 000 rpm durant 10 min, puis le surnageant a été mis dans les tubes pour analyse par chromatographie ionique. Les dilutions ont été effectuées par l'appareil. Une dilution un dans cent a été utilisée pour les échantillons à partir de 200 µl (80 µl prélevé) pour un volume final de 8 ml qui était nécessaire au bon fonctionnement de l'appareil.

Le dosage du méthanol a été fait par chromatographie en phase gazeuse (GC) avec un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'appareil utilisé était le GC-FID Hewlett Packard 5890 équipé d'une colonne ZB-WAX_{PLUS} de dimension 30m x 0,32 mm x 0,25 µm et possédant une phase polyéthylène glycol (PEG). La phase mobile était de l'hélium à un débit de 3 ml par minute. L'injection était automatisée avec un split 10 :1 et une température de 150°C. Le cycle de température utilisé pour la colonne était 5 min à 40°C, suivi de 5 min à 150°C avec une élévation de 5°C par minute et finalement 2 min à 220°C avec une élévation de 20°C par minute. L'isopropanol a été utilisé comme standard interne à une concentration de 100 ppm. La courbe standard de méthanol comptait les concentrations de 20, 50, 100, 200 et 500 ppm. Les standards ont été préparés avec une solution mère de 1000 ppm dans de l'eau milli-Q. Chaque standard et échantillon était supplémenté en standard interne pour obtenir une concentration finale de 100 ppm. Les échantillons ont été centrifugés à 13 000 rpm durant 10 min, puis le

surageant a été mis dans des vials pour GC. Des dilutions ont été effectuées si nécessaire et le standard interne a toujours été ajouté. Les échantillons pouvaient être congelés ou analysés immédiatement. Chaque échantillon était dilué 1/10, 1/50 et 1/100 pour un volume final minimum de 400 µl dans des vials à fond conique.

3.5. Caractérisation microbiologique générale

La coloration Gram a été effectuée selon Gerhardt (Gerhardt, 1994) sur des culture de 48 heures à 30°C et l'observation s'est fait au microscope optique Nikon à 1000X. Les colonies ont été observées sur gélose methylophaga 1403 après 72 heures d'incubation à 30°C. La taille des cellules a été déterminée en microscopie électronique (service de microscopie électronique de l'institut Armand-Frappier) à partir de culture de 24 heures incubées à 30°C.

3.5.1. Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques ont été testés à l'aide du Bioscreen. À partir de solutions mères de 50 mg/ml, des solutions concentrées d'antibiotiques ont été préparées dans le milieu methylophaga 1403 complet afin de ne pas diluer le milieu de culture. Puis, les dilutions nécessaires ont été effectuées directement dans la plaque Bioscreen selon l'antibiotique à tester (voir tableau 3.1). Les concentrations testées ont été déterminées selon les concentrations usuelles de chaque antibiotique pour les techniques de clonage en génie génétique. Les plaques ont été inoculées tel que mentionné dans la section 3.2.3 à 10 µg/ml de protéine. Elles ont été incubées à 30°C pour la souche JAM1 et à 34°C pour la souche JAM7. L'absorbance a été mesurée avec le filtre *wide band* (420-580 nm). L'absorbance après 40 heures d'incubation et la totalité de la courbe de croissance ont été considérées pour déterminer s'il y a croissance ou non.

Tableau 3.1 : Antibiotiques et concentrations testées

Antibiotiques	Concentrations testées (µg/ml)
Chloramphénicol	5, 50, 100, 300 et 500
Trimetoprim	5, 15, 50, 100 et 250
Ampicilline	50, 100, 300 et 500
Tétracycline	5, 25, 50, 100 et 500
Streptomycine	5, 50, 100 et 500
Gentamycine	5, 50, 100 et 500
Kanamycine	5, 50, 100, 300 et 500

3.5.2. Détermination des acides gras cellulaire

Une culture liquide de 15 ml dans le milieu methylophaga 1403 des souches JAM1 et JAM7 incubées respectivement à 30 et 34°C a été centrifugée et envoyé à 4°C à Keystonelabs (Edmonton, Alberta, Canada). Les acides gras ont été déterminés par analyse MIDI-FAME. Ce système sert à l'identification des espèces bactériennes via une base de données contenant des profils d'acides gras cellulaires. Ce système est associé à une méthode d'extraction des acides gras composée de 3 étapes à partir d'une culture pure. D'abord, les acides ont été méthylés, puis extraits pour obtenir deux phases dont l'une contient les acides gras. La dernière étape est la séparation de ces 2 phases. La phase contenant les acides gras a été analysée en chromatographie gazeuse.

3.6. Caractérisation biochimique

3.6.1. Galeries API

Les galeries API ont été inoculées et lues selon le protocole fourni par Biomérieux. Certaines modifications ont été apportées à la procédure suggérée étant donnée certaines exigences particulières des souches JAM1 et JAM7. Les galeries utilisées étaient les API 20NE, API ZYM et API 50CH.

Pour l'API 20NE, les modifications qui ont été apportées au protocole fourni par Biomérieux avec les galeries ont été le remplacement de la saline fournie par de la saline 3% supplémentée en solution de Wolf et en vitamine B12 à des concentrations correspondantes au milieu methylophaga 1403 ainsi que la substitution du milieu de culture fourni par du milieu methylophaga 1403 à pH 8, sans méthanol et supplémenté de 1,5 g/L d'agar. Comme contrôle

positif, la cupule glucose a été supplémentée en méthanol pour vérifier que la croissance était visible.

Pour l'API ZYM, la suspension a été préparée dans de la saline 3% supplémentée en solution de Wolf et en vitamine B12 à des concentrations correspondantes au milieu methylophaga 1403. Cette modification a été la seule apportée au protocole fourni par Biomérieux (France). Une galerie a étéensemencée avec *Pseudomonas aeruginosa* dans de la saline 0,85% supplémentée en solution de Wolf et en vitamine B12 à des concentrations correspondantes au milieu methylophaga 1403 comme contrôle.

Pour l'API 50CH, le milieu de culture suggéré a été remplacé par du milieu methylophaga 1403 sans méthanol à pH 8 supplémenté en rouge phénol à la même concentration que le milieu fourni par Biomérieux. Comme contrôle positif, la cupule témoin négatif a été supplémentée en méthanol pour vérifier que la croissance des 2 souches était visible et qu'il y avait une acidification indiquée par le changement de couleur du rouge phénol.

Les trois galeries ont été incubées à 30°C pour JAM1 et à 34°C pour JAM7 en respectant les temps d'incubation indiqués dans le protocole fourni par Biomérieux.

3.6.2. Source de carbones

Des géloses methylophaga 1403 ont été striées à partir de stocks congelés des souches JAM1 et JAM7. Elles ont été incubées à 30°C pendant environ une semaine. Une seule colonie a été repiquée dans 15 ml de milieu methylophaga 1403 liquide. Les cultures ont été incubées à 30°C avec agitation à 200 rpm pendant environ 48 heures. Cent µl de culture ont été transférés dans du milieu frais et incubées pour 12-24 heures dans les mêmes conditions.

Des tubes contenant 2 ml de milieu methylophaga 1403 supplémenté avec du fructose, de l'acétate, du méthylamine, du méthylsulfate ou du glycérol à des concentrations de 0.3; 0.2 et 0.1% (p/V) ont étéensemencés avec une bouclée de la pré-culture. Après incubation durant 24, 48, 72 heures et 2 semaines, la croissance a été observée.

3.7. Caractérisation génétique

3.7.1. Arbre des séquences de l'ARNr 16S

La séquence nucléotidique de l'ARNr 16S a été obtenue par séquençage du génome pour les souches JAM1 et JAM7. Les autres séquences ont été prises dans les banques de

données (Genbank). Les séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S de *Cycloclasticus pugetii* et de *Thiomicrospira arctica* ont été utilisées séquences d'ancrage de l'arbre. Les séquences ont été alignées avec le programme CLUSTALW inclus dans le logiciel BioEdit, version 7.0.9.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>). L'alignement de séquence obtenu comptait 1443 positions. L'analyse phylogénétique a été effectuée avec des applications faisant partie de la trousse de logiciel PHYLIP, version 3.65 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Les valeurs de bootstrap (1000 répétitions) ont été obtenues par le programme SEQBOOT. Le programme DNADIST a été utilisé pour générer une matrice de distance pour chaque répétition de bootstrap. Chaque chiffre dans la matrice représente la distance entre une paire de séquences. Le programme FITCH a été utilisé pour obtenir un arbre phylogénétique selon l'algorithme Fitch–Margoliash. Finalement, l'arbre a pu être visualisé à l'aide de l'application tree view.

3.7.2. Génome

L'ADN des souches JAM1 et JAM7 a été extrait à l'aide de la trousse "Qiagen Dneasy Blood and Tissue". D'abord, les 2 souches ont été striées sur une gélose methylophaga 1403. Une colonie a été repiquée dans 15 ml de milieu methylophaga 1403 liquide. L'extraction à partir d'une culture liquide a été effectuée telle que mentionné par la trousse pour les bactéries à Gram négatif. L'étape facultative d'élimination de l'ARN a été effectuée telle que mentionnée. Une seule élution de l'ADN a été effectuée. L'ADN obtenu a été visualisé après une électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier son intégrité et estimé sa quantité. L'ADN a également été dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

L'ADN total (200 µl à 50 ng/µl) pour chaque souche a été envoyé à la Plate-forme d'Analyses Génomiques / Institut de biologie intégrative et des systèmes / Université Laval (IBIS-Université Laval, Québec, Canada) où le séquençage du génome en entier et son assemblage ont été effectués par Brian Boyle. Les séquences génomiques des souches JAM1 et JAM7 ont été obtenues en utilisant Roche Genome Sequencer FLX system et titanium chemistry (paired ends with an insert size of 2.7 kb). L'assemblage primaire des lectures a été effectué avec Newbler gsAssembler v2.5.3 (Roche). L'assemblage final a été effectué à l'aide de CONSED version 20.0 et par comparaison de l'ordre des gènes chez *M. aminosulfidivorans* (AFIG00000000). Des amplifications PCR ont été nécessaires pour combler des trous dans la séquence et obtenir le génome entier des 2 souches.

L'annotation des génomes a été effectuée à l'aide de 2 serveurs en ligne soit Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) <http://rast.nmpdr.org/> (Aziz et al., 2008) et Integrated Microbial Genomes Expert Review (IMG/ER) (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/er/main.cgi>). Les annotations ont été vérifiées par Microbial Genome Submission Check (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/frameshifts/frameshifts.cgi>) et corrigées manuellement. Les nouvelles annotations ont été ajoutées dans IMG/ER.

La similarité entre les génomes a été analysée en utilisant 3 stratégies différentes. D'abord les génomes des deux souches ont été alignés à l'aide du serveur RAST (<http://rast.nmpdr.org>; Juin 2012; (Aziz et al., 2008)) en utilisant tour à tour chacune des souches comme référence. On obtient alors le nombre d'orthologues entre les deux souches et leur pourcentage d'identité (séquences déduites en acides aminés). Les deux génomes ont également été alignés avec mVISTA en utilisant le programme d'alignement LAGAN (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>; Juin 2012; (Brudno et al., 2003, Frazer et al., 2004)). Une dernière analyse a été effectuée pour déterminer le pourcentage d'ADN conservé selon la méthode de Goris et al. (2007). Cette méthode consiste à fragmenter *in silico* un des génomes à comparé, ici celui de la souche JAM1, en fragment de 1000 nucléotides. Les fragments obtenus ont alors été comparés avec un autre génome entier, ici celui de la souche JAM7 via un programme d'alignement (BlastN, word size 11, E-value ajusté à 10^{-6}). Les fragments présentant plus de 90% d'identité ont été utilisés pour obtenir le pourcentage d'ADN conservé.

4. Résultats

4.1. Détermination des paramètres optimaux de croissance

4.1.1. Tests préliminaires sur gélose

Ces tests préliminaires sur géloses avaient pour but d'établir à quelles concentrations de NaCl et à quels pH les 2 souches présentaient une bonne croissance. La croissance obtenue a été comparée à des géloses témoin à pH 7,3 et à 2,4% de NaCl (Tableau 4.1).

Les souches JAM1 et JAM7 ont présenté une bonne croissance à pH 9-10 et à 1 à 5% de NaCl alors qu'elles n'ont pas crû à pH 5-6 ou en absence de NaCl. La souche JAM1 a présenté une croissance peu abondante à 8 et 10% de NaCl. La souche JAM7 n'a pas crû en présence de 10% de NaCl, mais elle a poussé faiblement en présence de 8% de NaCl. Pour les 2 souches, la croissance à pH 11 a été difficile à observer puisque les sels qui composaient le milieu ont précipité et rendaient la gélose trouble de manière aléatoire.

Ces résultats ont permis de sélectionner l'intervalle de pH de 7 à 10 et l'intervalle de concentration de NaCl de 1 à 5% pour la détermination plus précise des conditions optimales de croissance.

Tableau 4.1 : Croissance à différents pH et différentes concentrations de NaCl

		JAM1	JAM7
pH 5	72h	-	-
	10 jours	-	-
pH 6	72h	-	-
	10 jours	-	-
pH 9	72h	+	+
	10 jours	+	+
pH 10	72h	+	+
	10 jours	+	+
pH 11	72h	+/-*	+/-*
	10 jours	+/-*	+/-*
Sans NaCl	72h	-	-
	10 jours	-	-
1% NaCl	72h	+	+
	10 jours	+	+
3% NaCl	72h	+	+
	10 jours	+	+
5% NaCl	72h	+	+
	10 jours	+	+
8% NaCl	72h	Faible	Faible
	10 jours	Faible	Faible
10% NaCl	72h	Faible	-
	10 jours	Faible	-

Ces résultats sont des triplicatas obtenus sur des géloses methylophaga 1403 à différents pH et différentes concentrations de NaCl après 72 heures et 10 jours d'incubation à 30°C. (+) indique de la croissance, (-) indique une absence de croissance, (+/-) indique que la croissance est difficile à observer suite à la précipitation des sels du milieu de culture et (faible) indique une croissance peu abondante.

4.1.2. Essais par dosage protéique pour les paramètres optimaux de croissance

Les souches JAM1 et JAM7 ont été cultivées à différentes concentrations de NaCl, température et pH (Fig. 4.1 à 4.6).

Pour la souche JAM1, la meilleure croissance a été obtenue à pH 8 (Fig. 4.1). La croissance a été faible en présence de 0,5% de NaCl alors que les concentrations 1, 3 et 5% ont montré une croissance similaire (Fig. 4.2). Finalement, la croissance a été faible à 15°C et la croissance a été similaire à 30, 34 et 37°C (Fig. 4.3).

Pour la souche JAM7, la meilleure croissance a été obtenue à pH 8, mais ce résultat doit être confirmé étant donnée la grande erreur sur la croissance à pH 10 (Fig. 4.4). La croissance a été faible en présence de 0,5% et 1,0% de NaCl alors que les concentrations 3 et 5% ont montré une croissance similaire (Fig. 4.5). Finalement, la croissance a été faible à température pièce et à 30°C alors quelle était plus élevée et similaire à 34 et 37°C (Fig. 4.6).

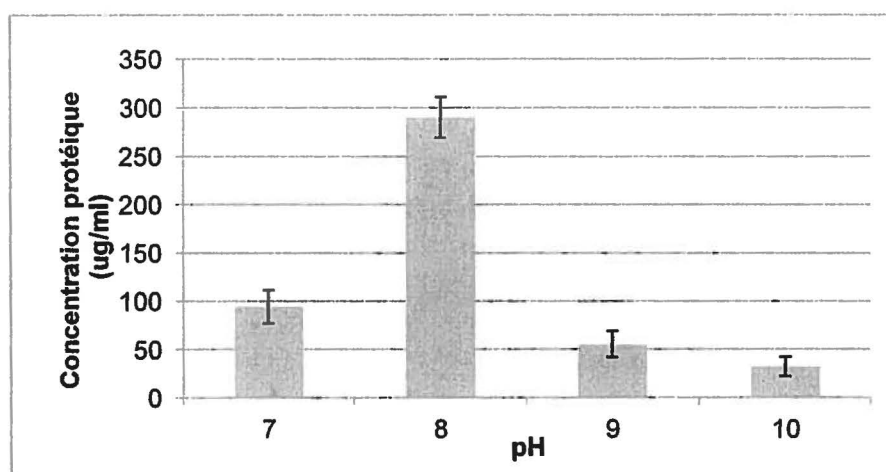


Figure 4.1 Croissance à différents pH de la souche JAM1

La souche *Methylophaga* sp. JAM1 a été cultivée dans du milieu methylophaga à différents pH durant 48 heures à 30°C. La croissance a été mesurée par dosage protéique. Chaque résultat est la moyenne 3 cultures.

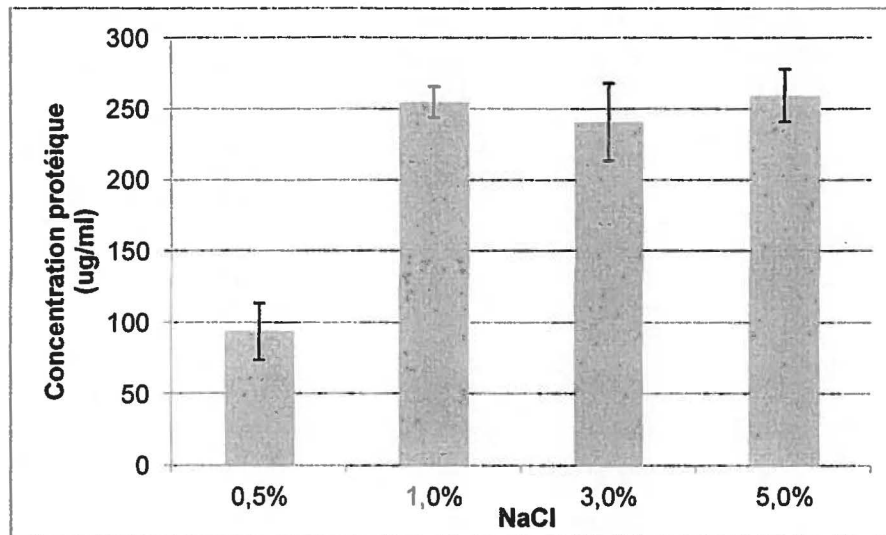


Figure 4.2 Croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM1

La souche *Methylophaga* sp. JAM1 a été cultivée dans du milieu methylophaga à différentes concentrations de NaCl durant 48 heures à 30°C. La croissance a été mesurée par dosage protéique. Chaque résultat est la moyenne 3 cultures.

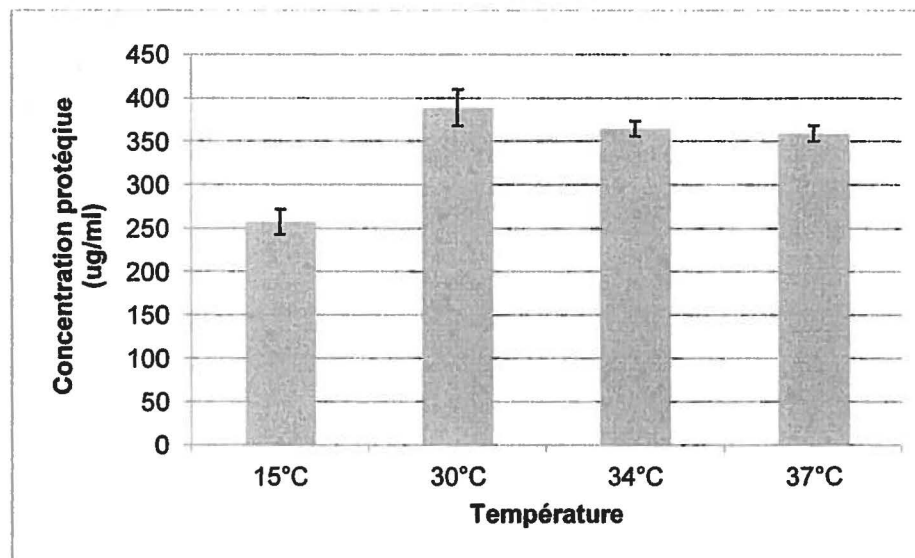


Figure 4.3 Croissance à différentes températures de la souche JAM1

La souche *Methylophaga* sp. JAM1 a été cultivée dans du milieu methylophaga à pH 8 et à 3% de NaCl puis incubée à différentes températures durant 48 heures. La croissance a été mesurée par dosage protéique. Chaque résultat est la moyenne 3 cultures.

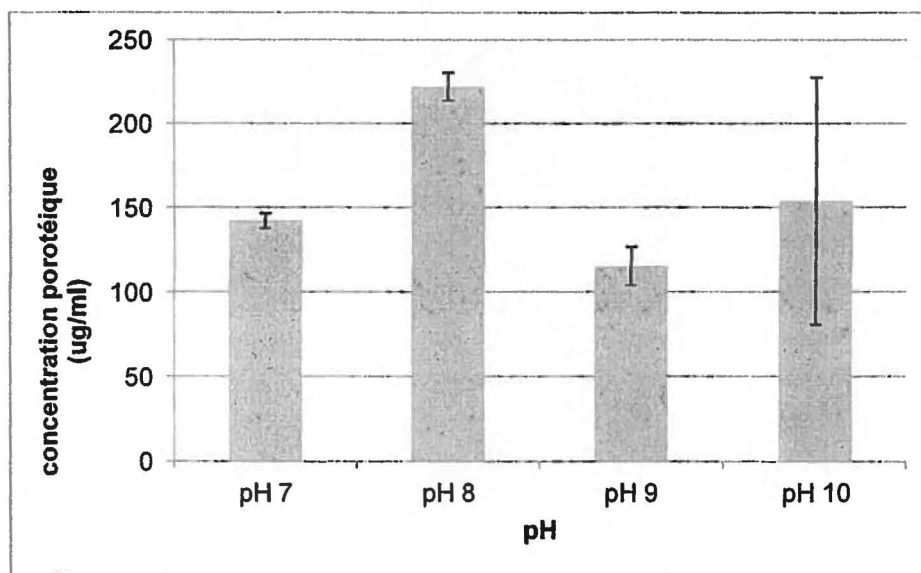


Figure 4.4 Croissance à différents pH de la souche JAM7

La souche *Methylophaga* sp. JAM7 a été cultivée dans du milieu methylophaga à différents pH durant 48 heures à 30°C. La croissance a été mesurée par dosage protéique. Chaque résultat est la moyenne 3 cultures.

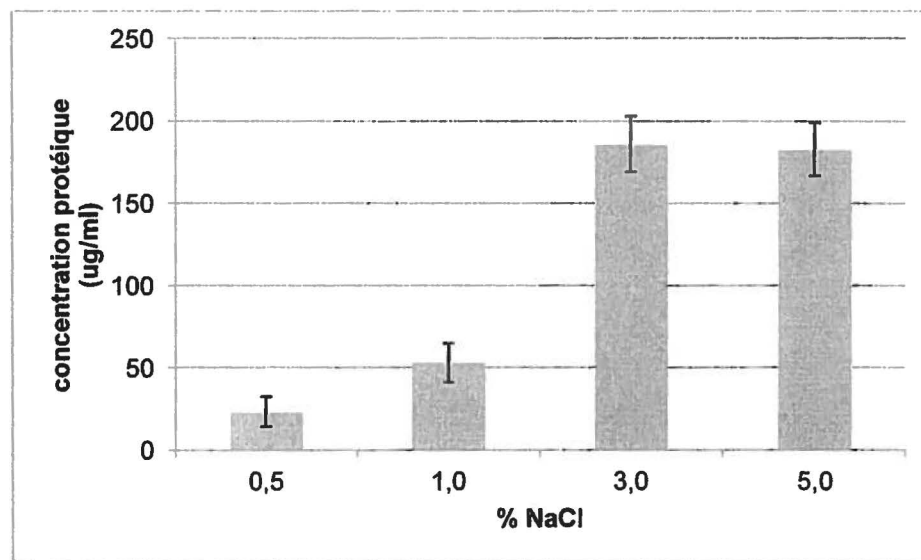


Figure 4.5 Croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM7

La souche *Methylophaga* sp. JAM7 a été cultivée dans du milieu methylophaga à différentes concentrations de NaCl durant 48 heures à 30°C. La croissance a été mesurée par dosage protéique. Chaque résultat est la moyenne 3 cultures.

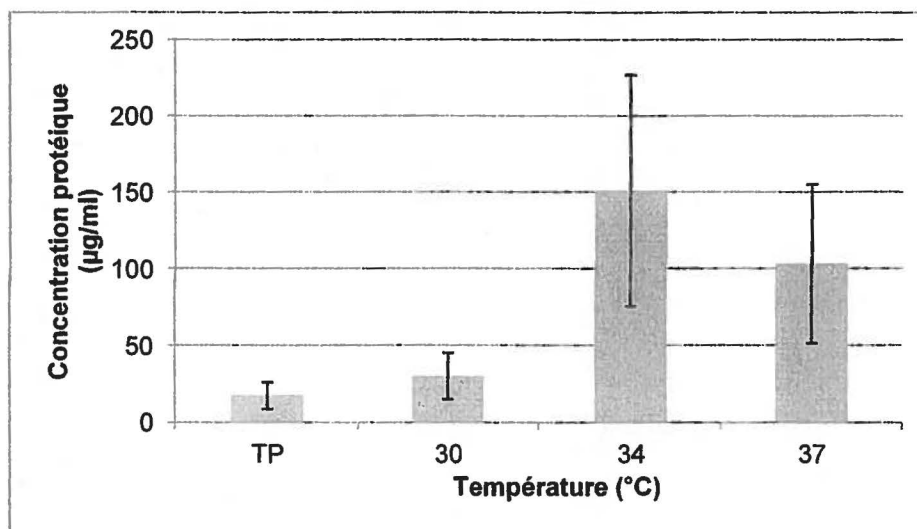


Figure 4.6 Croissance à différentes températures de la souche JAM7

La souche *Methylophaga* sp. JAM7 a été cultivée dans du milieu methylophaga à pH 8 et à 3% de NaCl puis incubée à différentes températures durant 24 heures. La croissance a été mesurée par dosage protéique. Chaque résultat est la moyenne 3 cultures.

4.1.3. Essais en Bioscreen pour les paramètres optimaux de croissance

La concentration optimale d'inoculum a été déterminée pour la souche JAM1. Cette souche ne présentait pas toujours une bonne croissance suite à son inoculation dans du milieu frais. Il a été important de déterminer une concentration d'inoculum qui donnait une bonne croissance et permettait d'uniformiser l'inoculation. Comme on voit à la figure 4.7, la concentration d'inoculum montrant le plus de croissance était de 10 µg/ml de protéine. C'est la concentration d'inoculum qui a été utilisée pour les expériences subséquentes. La même concentration d'inoculum initiale a été utilisée pour la souche JAM7 qui présentait presque toujours une bonne croissance lors de son transfert dans du milieu frais.

Pour la souche JAM1, la température optimale de croissance était de 30°C (Figure 4.8), le pH optimal de 8 (Figures 4.9-4.10-4.11) et la concentration de NaCl optimale était de 3% (Figures 4.15-4.16-4.17).

Pour la souche JAM7, la température optimale de croissance était de 34°C (Figure 4.8), le pH optimal de 8 (Figures 4.12-4.13-4.14) et la concentration de NaCl optimale était située entre 0,5 et 3% (Figures 4.18-4.19-4.20).

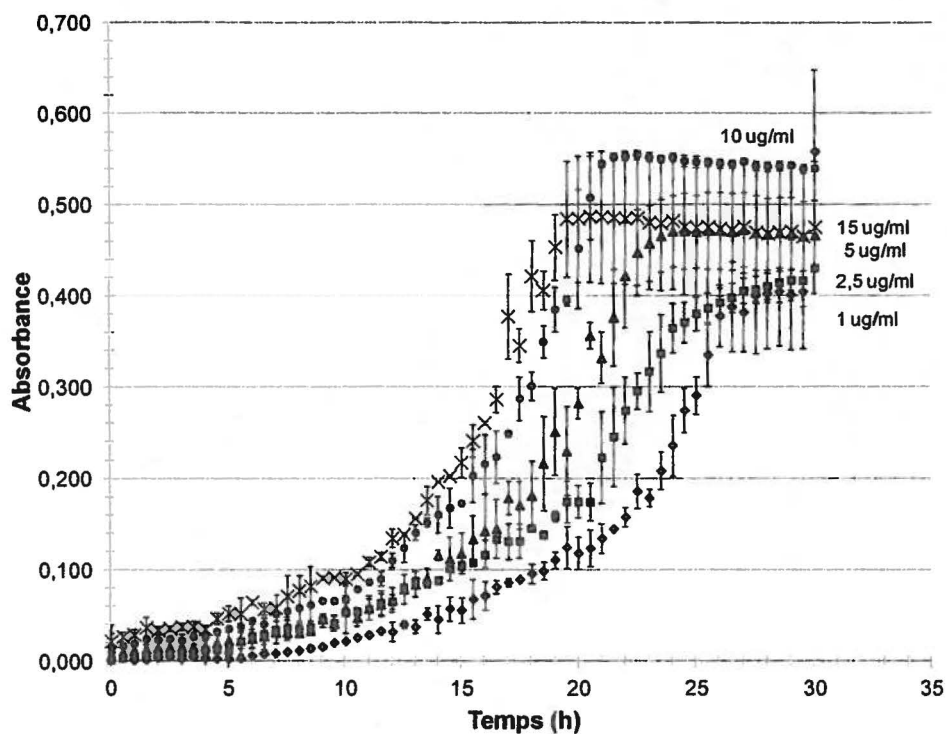


Figure 4.7 Détermination de la concentration optimale d'inoculum de la souche JAM1

Courbes de croissance selon la concentration d'inoculum pour la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 à pH 8, 3% de NaCl et à 30°C. Les concentrations d'inoculum utilisées étaient 1 µg/ml (losange), 2,5 µg/ml (carré), 5 µg/ml (triangle), 10 µg/ml (rond) et 15 µg/ml (X).

Les paramètres ont été testés en triplicata (3 essais avec un inoculum différent). Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

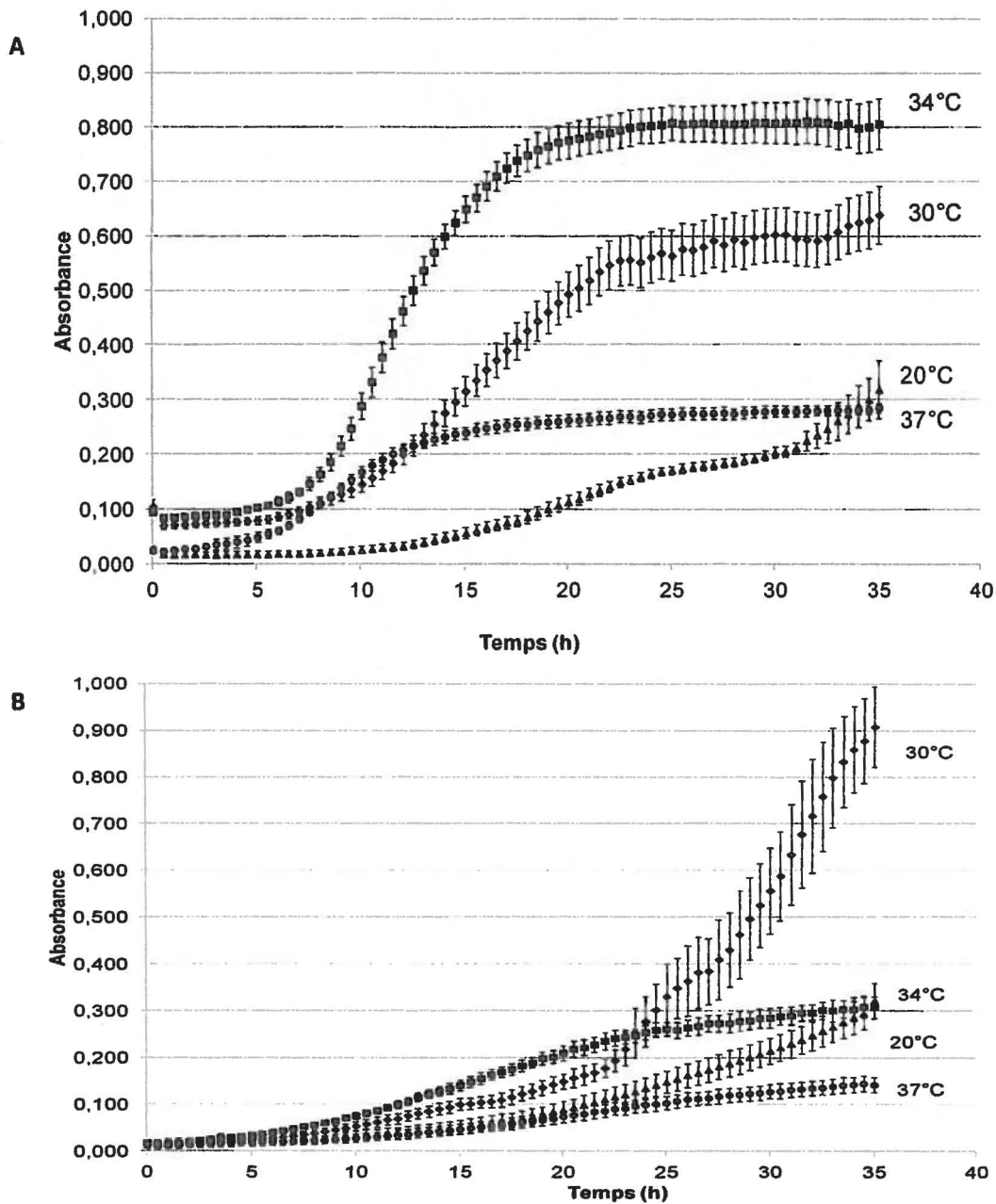


Figure 4.8 Courbes de croissance à différentes températures des souches JAM1 et JAM7

Courbes de croissance à différentes températures pour les souches JAM1 (A) et JAM7 (B) dans le milieu methylophaga 1403 à pH 8 et 3% de NaCl.

Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 μ l. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

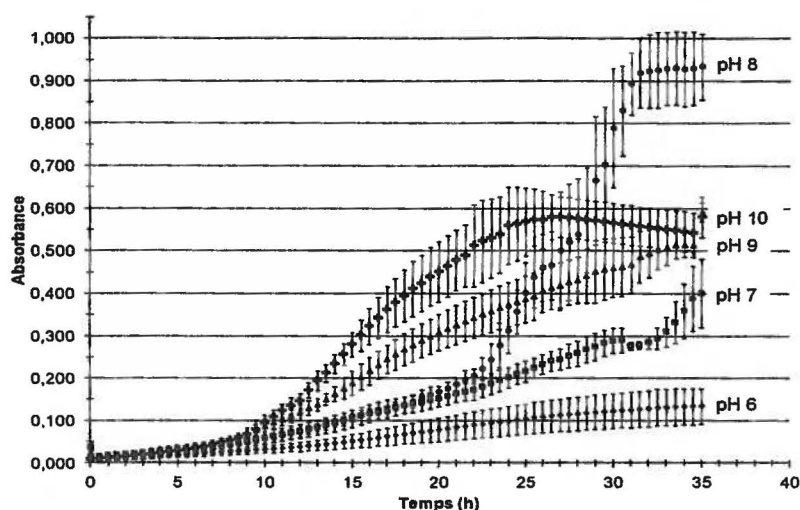


Figure 4.9 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM1: Essai #1

Courbes de croissance à différents pH pour la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 à 3% de NaCl et à 30°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

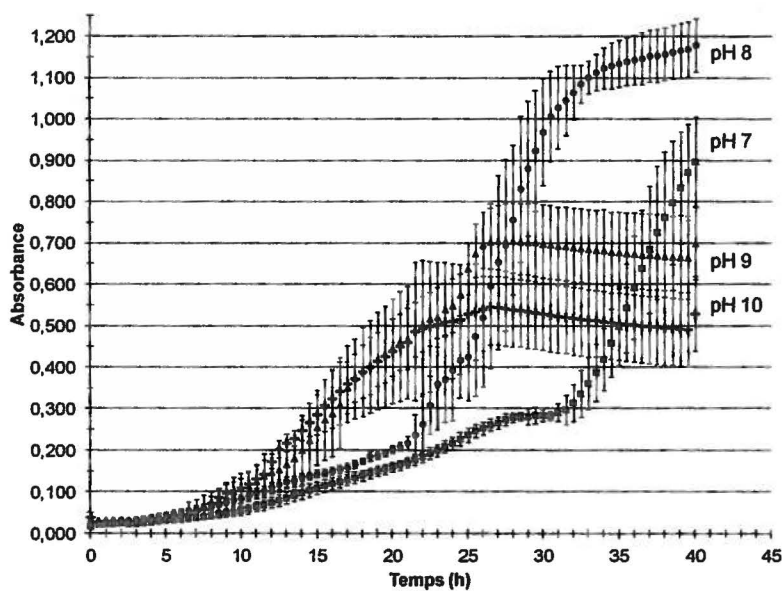


Figure 4.10 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM1: Essai #2

Courbes de croissance à différents pH pour la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 à 3% de NaCl et à 30°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

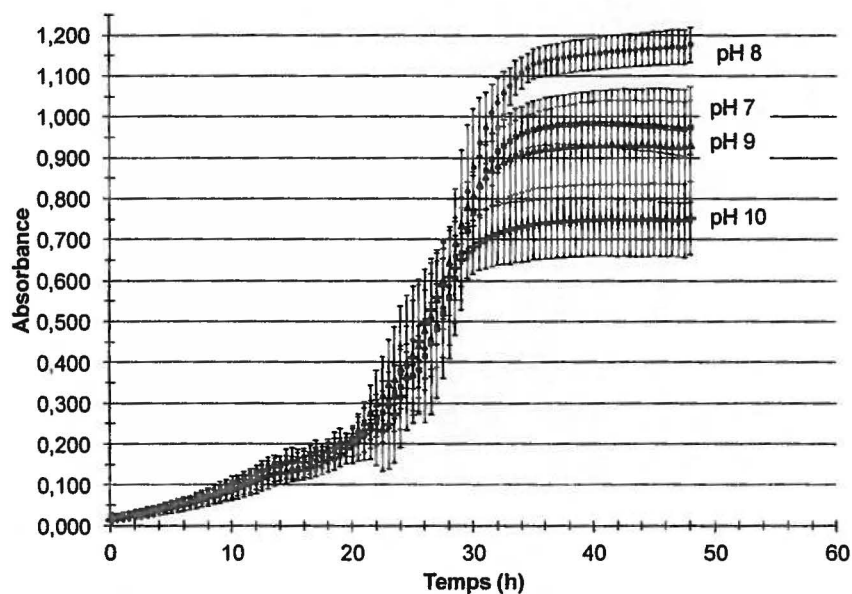


Figure 4.11 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM1: Essai #3

Courbes de croissance à différents pH pour la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 à 3% de NaCl et à 30°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

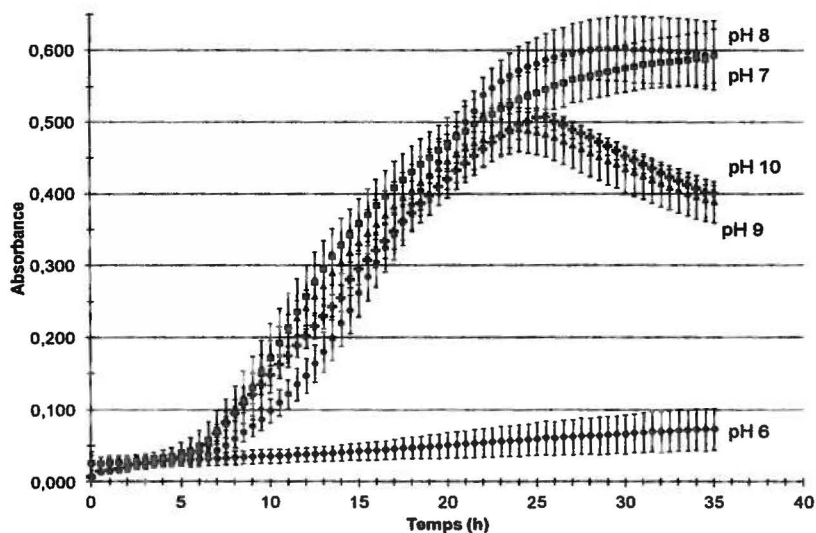


Figure 4.12 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM7: Essai #1

Courbes de croissance à différents pH pour la souche JAM7 dans le milieu methylophaga 1403 à 3% de NaCl et à 34°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

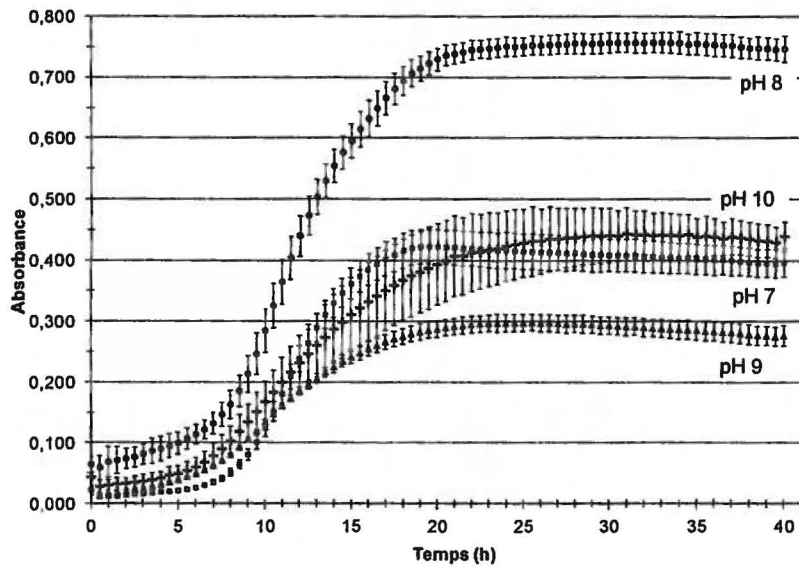


Figure 4.13 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM7: Essai #2

Courbes de croissance à différents pH pour la souche JAM7 dans le milieu methylophaga 1403 à 3% de NaCl et à 34°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

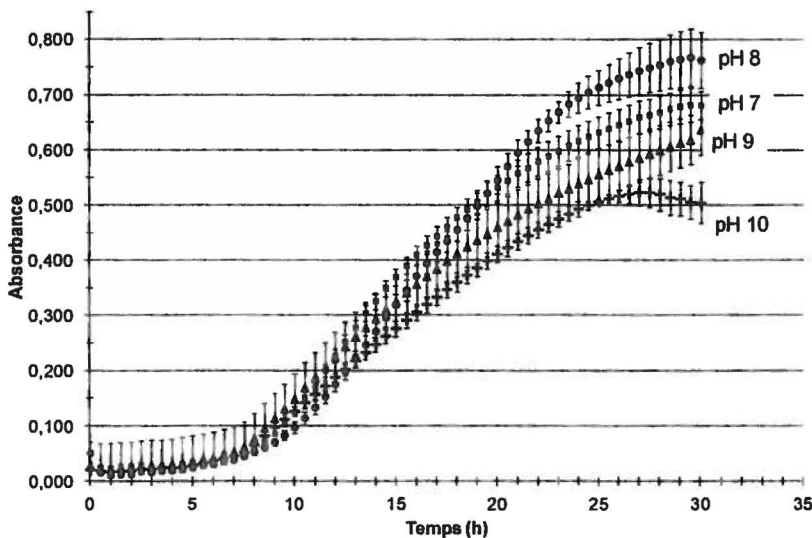


Figure 4.14 Courbes de croissance à différents pH de la souche JAM7: Essai #3

Courbes de croissance à différents pH pour la souche JAM7 dans le milieu methylophaga 1403 à 3% de NaCl et à 34°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

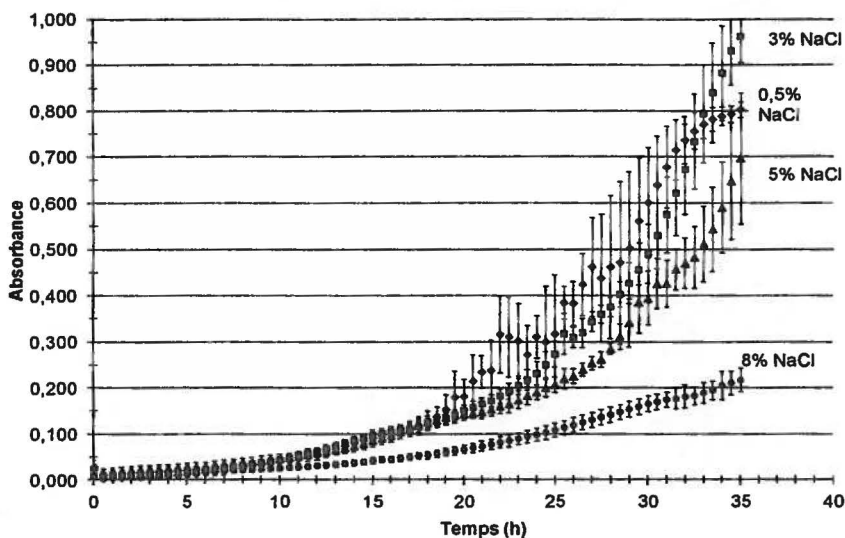


Figure 4.15 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM1: Essai #1

Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl pour la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 à pH 8 et à 30°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

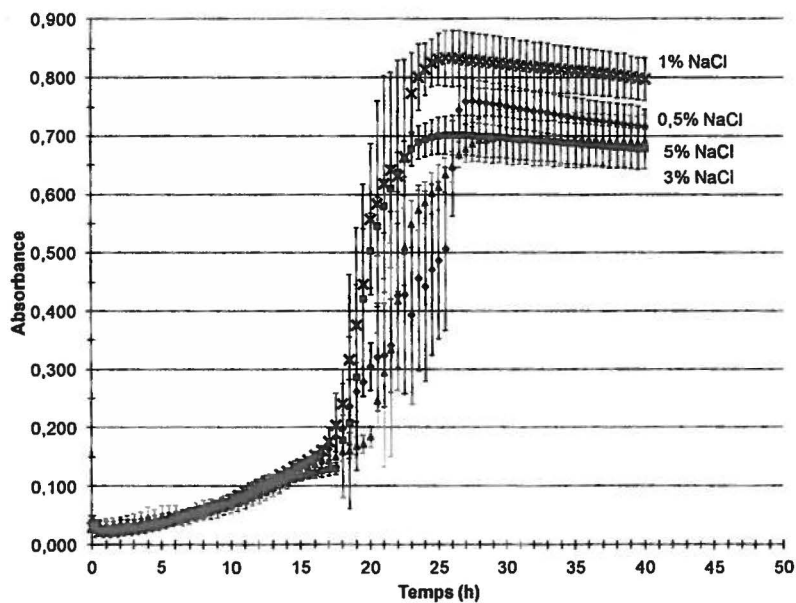


Figure 4.16 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM1: Essai #2

Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl pour la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 à pH 8 et à 30°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

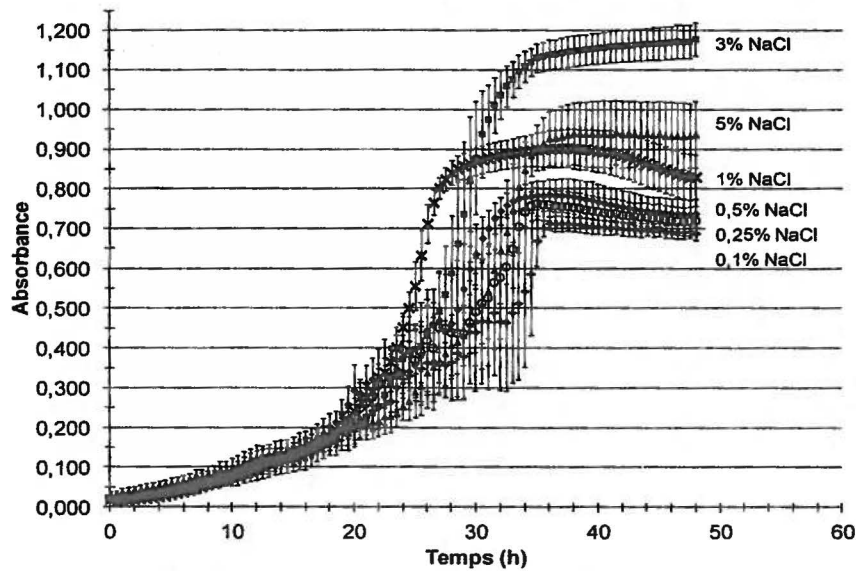


Figure 4.17 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM1: Essai #3

Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl pour la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 à pH 8 et à 30°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

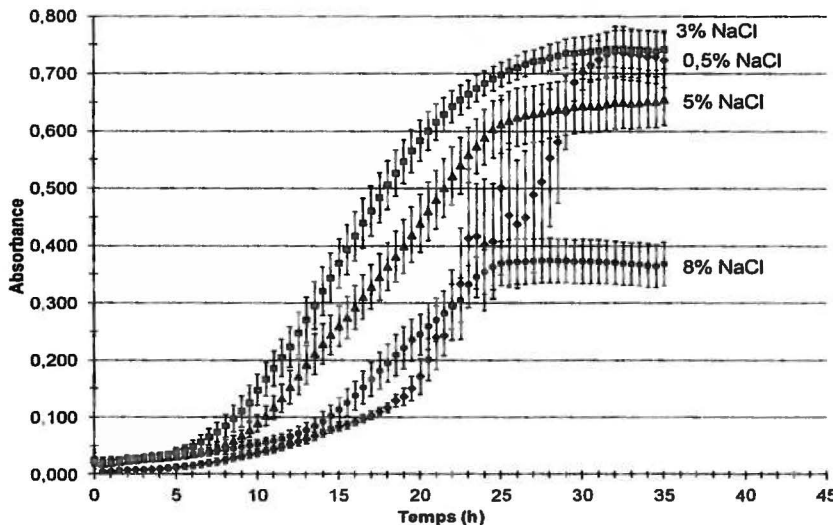


Figure 4.18 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM7: Essai #1

Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl pour la souche JAM7 dans le milieu methylophaga 1403 à pH 8 et à 34°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

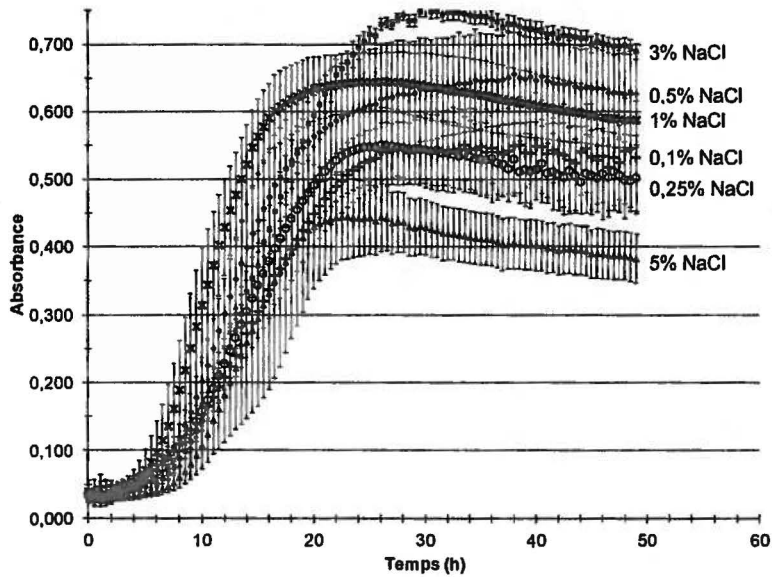


Figure 4.19 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM7: Essai #2

Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl pour la souche JAM7 dans le milieu methylophaga 1403 à pH 8 et à 34°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

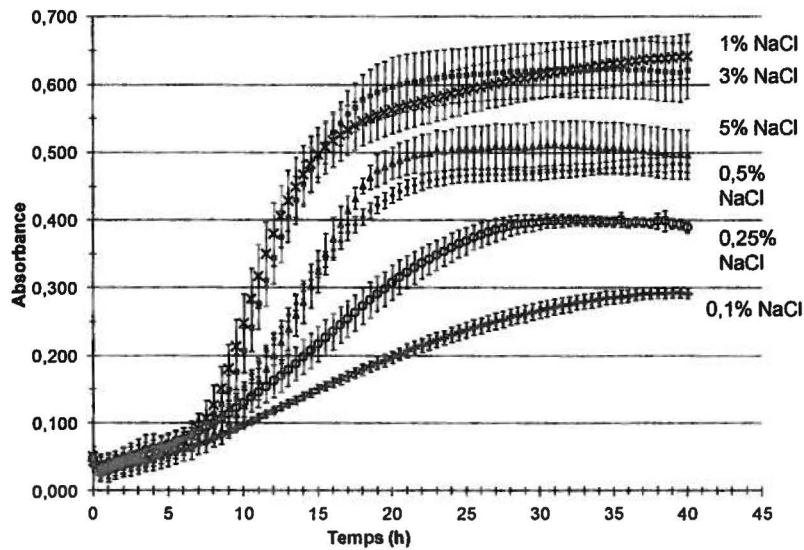


Figure 4.20 Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl de la souche JAM7: Essai #3

Courbes de croissance à différentes concentrations de NaCl pour la souche JAM7 dans le milieu methylophaga 1403 à pH 8 et à 34°C. Chaque point est la moyenne de l'absorbance de 10 cultures de 200 µl. La barre d'erreur représente la valeur plus ou moins un écart type. Les cultures ont toutes été effectuées dans le milieu methylophaga 1403. Le mode d'agitation sélectionné était "medium". L'absorbance a été mesurée entre 420-580 nm pour une mesure de turbidité.

4.1.4. Courbe de croissance en conditions optimales aérobies

Après avoir déterminé les conditions de croissance optimales, une courbe de croissance dans ces conditions a été réalisée pour les deux souches avec 10 µg protéine/ml comme inoculum de départ. La phase exponentielle de la souche JAM1 s'est établie après 24 heures, tandis que celle de la souche JAM7 a démarré après 10 heures (Fig 4.21). Toutefois, la souche JAM1 a produit plus de biomasse que la souche JAM7.

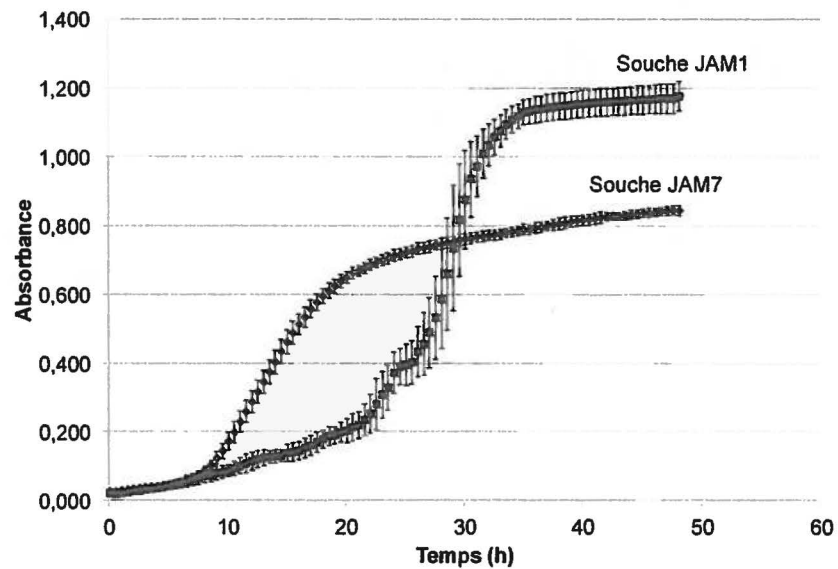


Figure 4.21 Courbes de croissance en conditions optimales pour les souches JAM1 et JAM7

Courbes de croissance en conditions optimales aérobies (JAM1 : pH 8, 3% NaCl et 30°C et JAM7 : pH 8, 3% NaCl et 34°C) dans le milieu methylophaga 1403.

4.2. Suivi de la réduction du nitrate

Dans le but d'établir son profil de réduction du nitrate en nitrite, la souche JAM1 a été cultivée dans des conditions dénitrifiantes (en atmosphère azote et avec le milieu methylophaga 1403 supplémenté en nitrate), et la concentration de nitrate, de nitrite et de méthanol a été suivie. Après un temps de latence de 7 à 8 heures, la concentration du nitrate a rapidement diminué, parallèlement à l'accumulation du nitrite (Fig. 4.22). Le méthanol a peu diminué après 12 heures. Contrairement aux conditions aérobies, le suivi de la croissance par densité optique en Bioscreen a été impossible à cause de la formation abondante de biofilm en conditions dénitrifiantes. Le suivi en dosage protéique a été difficile étant donnée la faible concentration en protéine, la difficulté à récupérer la biomasse et la petite quantité d'échantillon disponible. Les essais devront être répétés en vial anaérobique.

L'effet de la concentration initiale de nitrate sur la réduction de celui-ci a été étudié en conditions aérobies. Les essais ont été effectués en aérobie puisque des essais préliminaires en atmosphère azote présentaient la formation abondante de biofilm. L'explication envisagée était que l'absence d'oxygène promouvait la formation de biofilm. Cependant, le suivi de la croissance en plaque Bioscreen a encore une fois été problématique. La figure 4.23 semble nous montrer que la croissance était maximale en présence de 2 mM de nitrate, et décroissait avec l'augmentation de la concentration initiale de nitrate. Toutefois, ces résultats sont un artefact, car plus la concentration du nitrate augmentait, plus la formation de biofilm et de flocs était importante, résultant en une densité optique moindre. Du point de vue de la dénitrification, la figure 4.24 permet de voir qu'une concentration en nitrate de 16 et 40 mM, a permis de réduire tout le nitrate sans atteindre une concentration de nitrite limitante. Lorsque la concentration de nitrite se situait approximativement à 50 mM, cela semblait nuire à la dénitrification selon les résultats obtenus pour les concentrations initiales de nitrate de 81 à 403 mM.

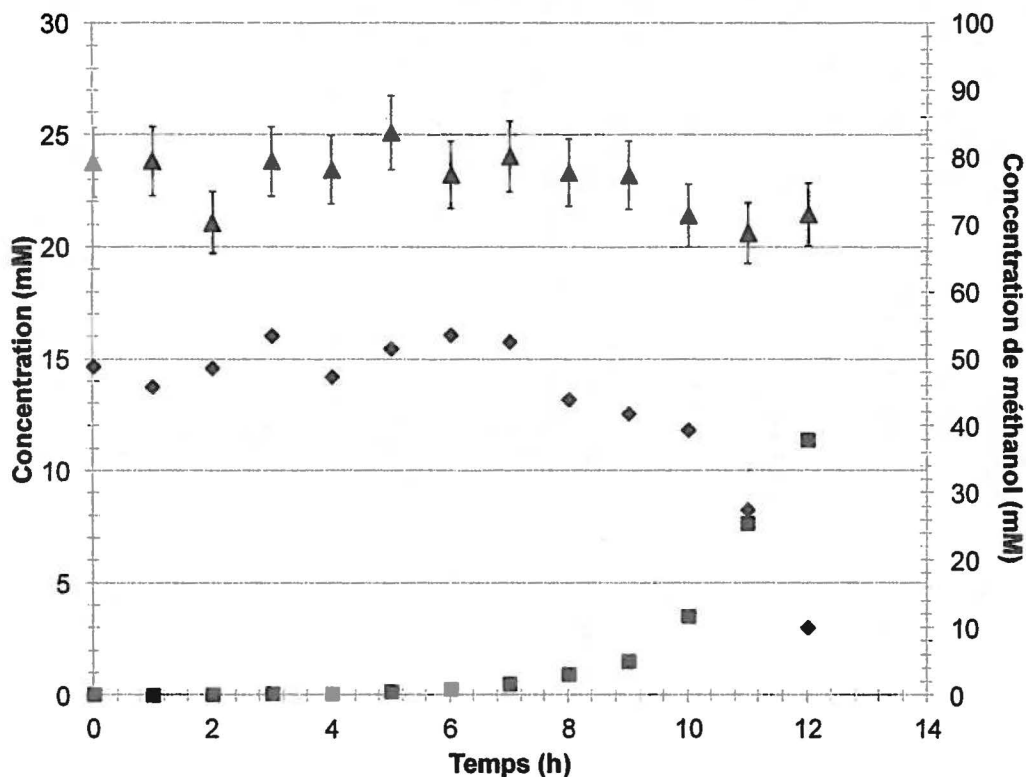


Figure 4.22 Concentration de nitrate et de nitrite en fonction du temps dans des cultures de la souche JAM1 en conditions dénitrifiantes.

Suivi sur 12 heures de la concentration de nitrate et de nitrite lors de l'incubation de la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 pH 8, 3% NaCl, à 30°C et supplémenté de 14,1 mM de nitrate (200 ppm NO₃-N). La plaque Bioscreen a été préparée dans une chambre anaérobique en atmosphère azote et scellée avec de la silicone. Le nitrate et le nitrite ont été dosés par chromatographie ionique. Chaque point résulte de la mise en commun de 5 puits. La concentration de nitrate est indiquée par des losanges et celle de nitrite par des carrés référant à l'axe principale (gauche). Le méthanol a été dosé par chromatographie gazeuse et sa concentration est indiquée par des triangles référant à l'axe secondaire (droite).

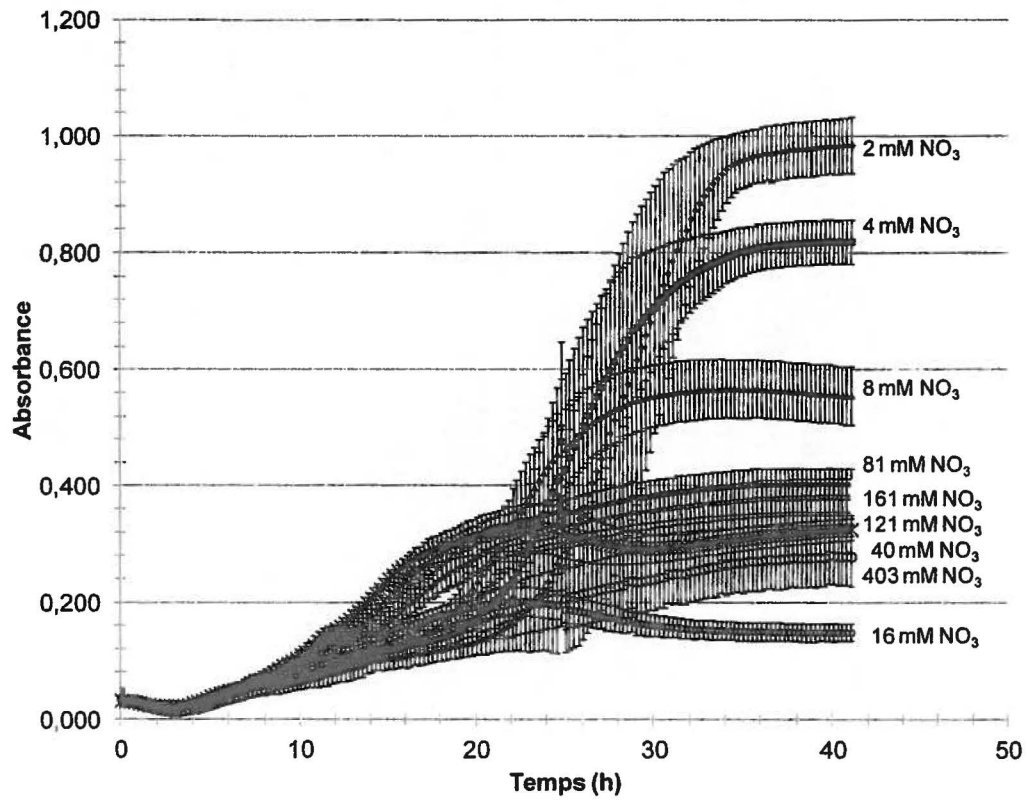


Figure 4.23 Effet de la concentration initiale de nitrate sur la croissance de la souche JAM1

Courbes de croissance de la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 pH 8, 3% NaCl, à 30°C, 0,3% méthanol, supplémenté en nitrate et en conditions aérobies.

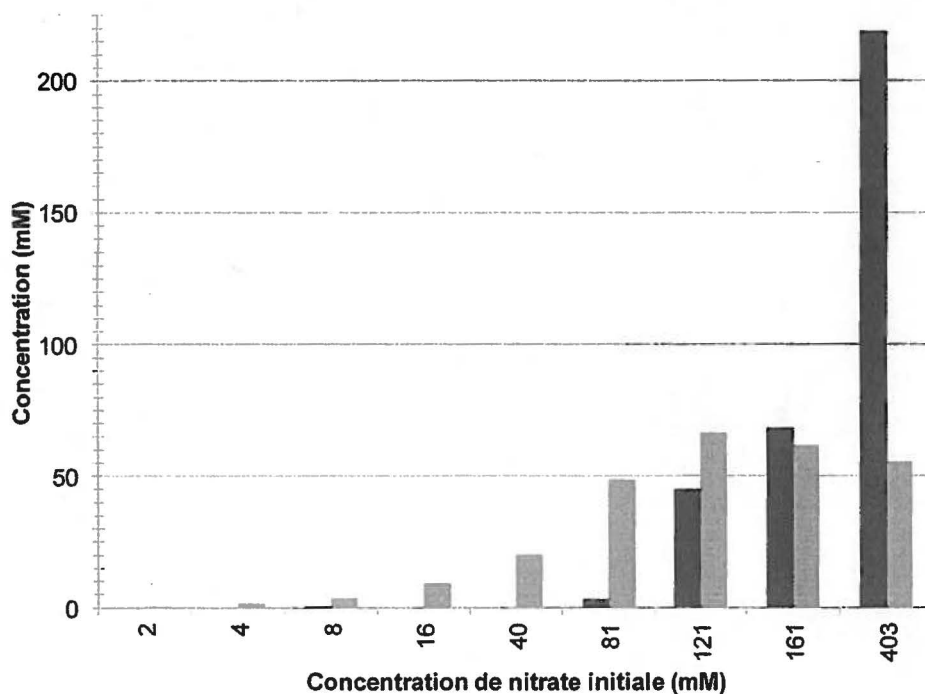


Figure 4.24 Concentration de nitrate et de nitrite selon la concentration initiale de nitrate.

Concentrations finales de nitrate (en noir) et de nitrite (en gris) après incubation en présence de différentes concentrations de nitrate de la souche JAM1 durant 40 heures, dans le milieu methylophaga 1403 pH 8, 3% NaCl, à 30°C, 94 mM de méthanol et en conditions aérobies.

L'effet de la concentration initiale de méthanol sur la dénitrification a aussi été étudié. Le suivi de la croissance par densité optique n'a pas été adéquat. Comme illustré aux figures 4.25 et 4.26, la concentration initiale de méthanol a un effet sur la croissance et sur la dénitrification. La même problématique de formation de biofilm que lors de l'essai de l'effet de la concentration initiale de nitrate s'est posée. À des concentrations faibles de méthanol, soit 1 et 3 mM de méthanol, il n'y avait pas formation de biofilm, mais toutefois une réduction complète du nitrate. À des concentrations de 8 à 312 mM de méthanol, il y avait formation de biofilm, et réduction du nitrate dans presque tous les cas. À une concentration initiale de méthanol de 1561 et 3121 mM, la croissance n'a pas été possible due à la toxicité du méthanol, il n'y avait pas formation de biofilm et la dénitrification avait peu ou pas lieu.

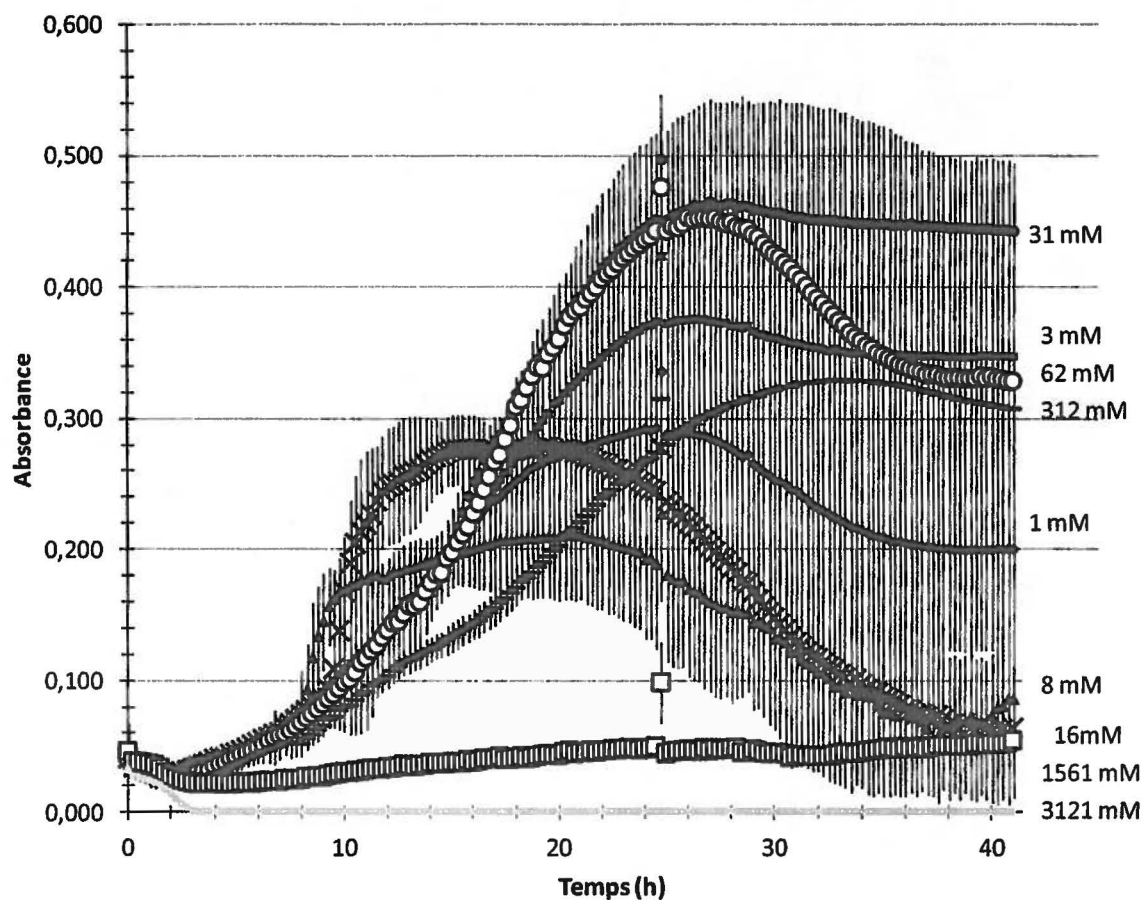


Figure 4.25 Effet de la concentration initiale de méthanol sur la croissance

Courbes de croissance de la souche JAM1 dans le milieu methylophaga 1403 pH 8, 3% NaCl, à 30°C, supplémenté en nitrate (40 mM) et en conditions aérobies. La diminution de l'absorbance pour certaines concentrations de méthanol correspond à la formation de biofilm sur les parois du puits à partir de la biomasse en suspension ce qui entraîne une diminution de la densité optique. L'absorbance plus élevée pour toutes les courbes à environ 24 heures d'incubation est du à l'arrêt de l'agitation, mais ce problème a été réglé dans l'heure et avant la prochaine prise de mesure de l'absorbance.

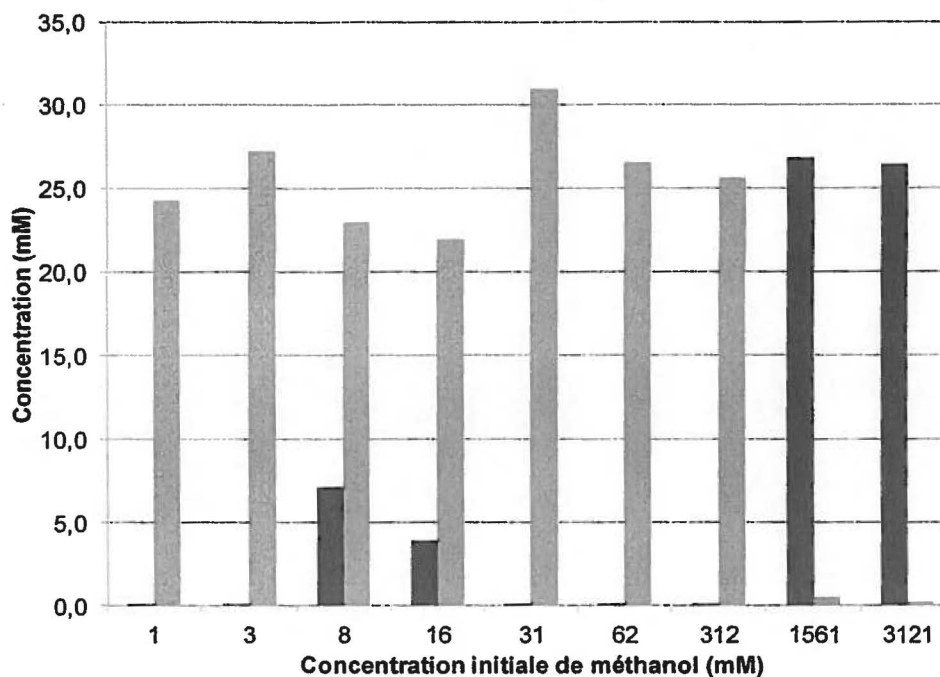


Figure 4.26 Concentration de nitrate et de nitrite selon la concentration initiale de méthanol.

Concentrations finales de nitrate (en noir) et de nitrite (en gris) après incubation en présence de différentes concentrations de méthanol de la souche JAM1 durant 40 heures, dans le milieu methylophaga 1403 pH 8, 3% NaCl, à 30°C, supplémenté en nitrate (24 mM) et en conditions aérobies.

Quelques tests ont été effectués en vials barbotés à l'azote. Les résultats étaient aucun nitrate détectable après 24 heures d'incubation avec une concentration initiale de nitrate de 14,1 mM et de méthanol de 94 mM. Du méthanol était encore présent après 72h d'incubation. Le suivi de la croissance s'est avéré difficile que ce soit par dosage protéique ou par densité optique à 600 nm étant donné qu'elle était très faible.

4.3. Caractérisation microbiologique générale

Les souches JAM1 et JAM7 présentent une coloration rose suite à une coloration Gram. Elles sont donc Gram négatif. Suite à une observation en microscopie électronique, la souche JAM1 mesure en moyenne 1,5 μm en longueur et 0,6 μm en diamètre. La souche JAM7 mesure 1,5 μm en longueur et 0,7 μm en diamètre. Les deux souches sont mobiles et un flagelle a été observé en microscopie électronique (Figure 4.27). La souche JAM1 présente des colonies blanches lisses, au contour rond et régulier de 2-3 μm de diamètre sur le milieu methylophaga 1403. La souche JAM7 présente des colonies blanches lisses, au contour rond et régulier de 2-3 mm de diamètre sur le milieu methylophaga 1403.

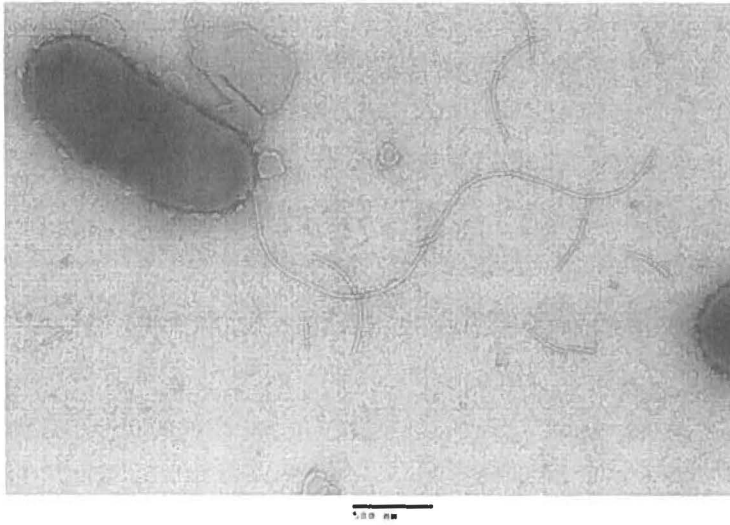


Figure 4.27 Observation du flagelle en microscopie électronique

La souche JAM1 a été observée en microscopie électronique à un grossissement de 9000X et une exposition de 75,0 kV. Un flagelle a été également observé chez la souche JAM7 (donnée non illustrée).

4.3.1. Résistance aux antibiotiques

La résistance à des antibiotiques courants a été déterminée pour les souches JAM1 et JAM7 dans le but d'avoir un outil de sélection lors de manipulations génétiques. Les souches ont été considérées résistantes si après 40 heures d'incubation, l'absorbance a augmenté par rapport à l'absorbance lors de l'inoculation en considérant l'écart type sur la mesure. Le tableau 4.2 présente l'absorbance finale qui a été obtenue pour chaque souche en présence de l'antibiotique testé à une concentration donnée. Les souches JAM1 et JAM7 présentaient une résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol jusqu'à 500 µg/ml, à la tétracycline jusqu'à 50 µg/ml et au trimetoprimé jusqu'à 5 µg/ml. Les souches JAM1 et JAM7 étaient sensibles à la streptomycine (50 µg/ml), kanamycine (50 µg/ml), gentamycine (50 µg/ml) et au trimetoprimé (JAM1: 50 µg/ml, JAM7: 15 µg/ml).

Tableau 4.2: Antibiotiques pour les souches JAM1 et JAM7

Antibiotiques	Concentration (µg/ml)	JAM1 (absorbance finale)	JAM7 (absorbance finale)
Ampicilline	0	+ (0,903±0,055)	+ (0,626±0,026)
	50	+ (0,418±0,031)	+ (0,320±0,017)
	100	+ (0,418±0,030)	+ (0,330±0,034)
	300	+ (0,245±0,036)	+ (0,205±0,010)
	500	+ (0,360±0,077)	+ (0,211±0,016)
Chloramphénicol	0	+ (0,903±0,055)	+ (0,626±0,026)
	5	+ (1,166±0,033)	+ (0,637±0,018)
	50	+ (0,895±0,035)	+ (0,432±0,014)
	100	+ (0,652±0,017)	+ (0,272±0,014)
	300	+ (0,326±0,050)	+ (0,205±0,011)
	500	+ (0,184±0,011)	+ (0,168±0,008)

Gentamycine	0	+ (1,288±0,061)	+ (0,866±0,065)
	5	+ (0,366±0,119)	+ (0,350±0,023)
	50	- (0,112±0,009)	- (0,102±0,005)
	100	- (0,108±0,011)	- (0,093±0,002)
	500	- (0,116±0,007)	- (0,099±0,006)
Kanamycine	0	+ (1,288±0,061)	+ (0,866±0,065)
	5	+ (1,320±0,030)	+ (0,856±0,041)
	50	- (0,129±0,021)	- (0,110±0,004)
	100	- (0,146±0,062)	- (0,102±0,007)
	300	- (0,132±0,011)	- (0,114±0,003)
	500	- (0,134±0,010)	- (0,115±0,003)
Streptomycine	0	+ (0,765±0,042)	+ (0,690±0,027)
	5	+ (1,068±0,102)	+ (0,705±0,027)
	50	- (0,022±0,005)	- (0,079±0,008)
	100	- (0,020±0,015)	- (0,069±0,006)
	500	- (0,022±0,007)	- (0,077±0,006)
Tetracycline	0	+ (0,765±0,042)	+ (0,690±0,027)
	5	+ (1,158±0,034)	+ (0,655±0,029)
	25	+ (0,922±0,059)	+ (0,546±0,057)
	50	+ (0,510±0,133)	+ (0,341±0,036)

	100	- (0,074±0,041)	- (0,155±0,018)
	500	- (0,108±0,017)	- (0,137±0,006)
Trimetoprim	0	+ (1,205±1,088)	+ (0,769±0,007)
	5	+ (0,696±0,068)	+ (0,696±0,068)
	15	- (0,110±0,026)	- (0,110±0,026)
	50	- (0,107±0,012)	- (0,107±0,012)
	100	- (0,115±0,008)	- (0,115±0,008)

(+) signifie une résistance à la concentration d'antibiotique indiquée, (-) signifie une absence de résistance à la concentration d'antibiotique indiquée. Les résultats ont été obtenus en incubant durant 40 heures les souches JAM1 et JAM7 dans leurs conditions optimales dans le milieu methylophaga 1403 supplémenté en antibiotique.

4.3.2. Détermination des acides gras

Le profil d'acide gras de la membrane cellulaire a été déterminé, car c'est un marqueur taxonomique qui permet de signifier l'appartenance d'une bactérie à un genre en particulier. Les acides majoritaires étaient les mêmes pour les 2 souches, soit l'acide palmitoléique ($C_{16:1} \omega 7c$), l'acide palmitique ($C_{16:0}$) et l'acide linoléique ($C_{18:1} \omega 6c$).

Tableau 4.3 : Détermination des acides gras cellulaire pour les souches JAM1 et JAM7

Souche JAM1		Souche JAM7	
Abondance (%)	Type d'acide gras	Abondance (%)	Type d'acide gras
38,60	C _{16:1} ω7c	38,55	C _{16:1} ω7c
32,04	C _{16:0}	29,48	C _{16:0}
9,94	C _{18:1} ω6c	13,97	C _{18:1} ω6c
4,02	C _{10:0} 3OH	4,51	C _{10:0} 3OH
3,94	C _{12:0}	4,37	C _{12:0} aldéhyde
3,81	C _{17:0} cyclo	4,18	C _{12:0}
3,41	C _{12:0} aldéhyde	1,67	C _{18:0}
1,51	C _{18:1} ω9c	1,25	C _{17:0} cyclo
		1,09	C _{18:1} ω9c

4.4. Caractérisation biochimique

4.4.1. Galeries API

Les galeries API sont un ensemble de tests miniaturisés et standardisés qui permettent l'identification de bactéries à l'aide d'une banque de données. Il en existe plusieurs selon le type de bactéries ou les informations qu'on veut obtenir. Dans une optique de caractérisation d'une nouvelle espèce bactérienne, on ne cherche pas à référer à la banque de données, mais plutôt à connaître le résultat à de nombreux tests courants en microbiologie de manière simple et rapide. Certaines modifications ont été apportées à la procédure suggérée étant donnée certaines exigences particulière des souches JAM1 et JAM7. Les galeries utilisées étaient les API 20NE, API ZYM et API 50CH. L'API 20NE a donné un seul résultat positif soit la réduction du nitrate par la souche JAM1. L'API ZYM a permis de détecter une activité estérase, leucine arylamidase et Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase pour les 2 souches. Une activité phosphatase alcaline a également été détectée pour la souche JAM1. L'API 50CH qui visait à déterminer les sources de carbone utilisées par fermentation ou assimilées, n'a montré aucun résultat positif pour les 2 souches.

Tableau 4.4 : Résultats API 20NE pour les souches JAM1 et JAM7

#	Test	JAM1	JAM7
1	Réduction des nitrates en nitrites	+	-
2	Tryptophane (formation d'indole)	-	-
3	Glucose (fermentation)	-	-
4	Arginine	-	-
5	Urée	-	-
6	Esculine (hydrolyse)	-	-
7	Gélatine (hydrolyse)	-	-
8	p-nitro-phényl-βDgalactopyranoside (B-galactosidase)	-	-
9	Glucose (assimilation)	-	-
10	Arabinose	-	-
11	Mannose	-	-
12	Mannitol	-	-
13	N-acétylglucosamine	-	-
14	Maltose	-	-
15	Gluconate	-	-
16	Caprate	-	-
17	Adipate	-	-
18	Malate	-	-
19	Phényl-acétate	-	-
20	Tetraméthyl-pphenylène diamine (Cytochrome oxydase)	-	-

(+) activité enzymatique détectée, substrat utilisé ou croissance, (-) aucune activité, utilisation du substrat ou croissance

Tableau 4.5 : Résultats API ZYM pour les souches JAM1 et JAM7

#	Test	JAM1	JAM7
1	Témoin négatif	-	-
2	Phosphatase alcaline	+	-
3	Estérase (C4)	+	+
4	Estérase lipase (C8)	-	-
5	Lipase (C14)	-	-
6	Leucine arylamidase	+	+
7	Valine arylamidase	-	-
8	Cystine arylamidase	-	-
9	Trypsine	-	-
10	α -chymotrypsine	-	-
11	Phosphatase acide	-	-
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
13	α -galactosidase	-	-
14	β -galactosidase	-	-
15	β -glucuronidase	-	-
16	α -glucosidase	-	-
17	β -glucosidase	-	-
18	N-acétyl- β -glucosamidase	-	-
19	α -mannosidase	-	-
20	α -fucosidase	-	-

(+) activité enzymatique détectée, (-) aucune activité enzymatique détectée

Tableau 4.6 : Résultats API 50CH pour les souches JAM1 et JAM7

#	test	JAM1	JAM7	#	test	JAM1	JAM7
1	Témoin négatif	-	-	26	Esculine citrate de fer	-	-
2	Glycérol	-	-	27	salicine	-	-
3	Erythritol	-	-	28	Cellobiose	-	-
4	Arabinose	-	-	29	Maltose	-	-
5	L-Arabinose	-	-	30	Lactose	-	-
6	Ribose	-	-	31	Melibiose	-	-
7	Xylose	-	-	32	Saccharose	-	-
8	L-Xylose	-	-	33	Trehalose	-	-
9	Adonitol	-	-	34	Inuline	-	-
10	Méthyl-βD-xylopyranoside	-	-	35	Mélezitose	-	-
11	Galactose	-	-	36	Raffinose	-	-
12	Glucose	-	-	37	Amidon	-	-
13	Fructose	-	-	38	Glycogène	-	-
14	Mannose	-	-	39	Xylitol	-	-
15	Sorbose	-	-	40	Gentiobiose	-	-
16	Rhamnose	-	-	41	Turanose	-	-
17	Dulcitol	-	-	42	Lyxose	-	-
18	Inositol	-	-	43	Tagalose	-	-
19	Mannitol	-	-	44	Fucose	-	-
20	Sorbitol	-	-	45	L-fucose	-	-
21	Méthyl-αD-mannopyranoside	-	-	46	Arabitol	-	-
22	Méthyl-αD-glucopyranoside	-	-	47	L-arabitol	-	-
23	N-acétylglucosamine	-	-	48	Potassium gluconate	-	-
24	Amygdaline	-	-	49	Potassium 2-cétogluconate	-	-
25	arbutine	-	-	50	Potassium 5-cétogluconate	-	-

(+) substrat utilisé ou croissance, (-) aucune utilisation du substrat ou croissance

4.4.2. Source de carbones

Suite aux résultats des galeries API et d'une revue de littérature sur les sources de carbone utilisées par d'autres *Methylophaga*, des tests en milieu liquide ont été effectués. Les sources de carbone testées ont été le fructose, l'acétate, le méthylamine, méthylsulfate et le glycérol à des concentrations de 0.3; 0.2 and 0.1% dans le milieu methylophaga 1403. Aucune croissance n'a été observée chez les souches JAM1 et JAM7. Seul le méthanol qui a servi de contrôle positif durant ces essais a permis la croissance de ces souches.

4.5. Caractérisation génétique

4.5.1. Arbre phylogénétique du gène de l'ARN ribosomal 16S

Un arbre phylogénétique du gène de l'ARNr 16S a été réalisé à partir des séquences de ce gène disponibles pour les espèces validées appartenant au genre *Methylophaga* et les 2 souches étudiées. Le résultat est illustré à la figure 4.28. Les espèces validées du genre *Methylophaga* les plus proches de nos souches ont été déterminées comme étant *M. alcalica* et *M. murata*. L'arbre obtenu montre la présence de 2 clades au sein du genre *Methylophaga* qui ont déjà été documentés (Boden, 2011). Les souches étudiées font partie du clade regroupant les espèces du genre *Methylophaga* étant haloalcaliphiles.

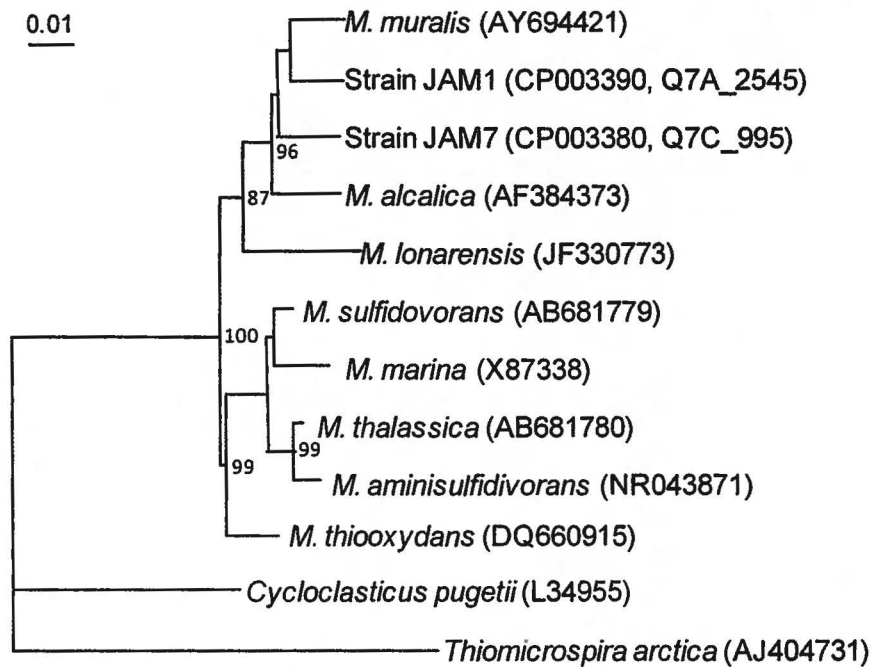


Figure 4.28 Analyse phylogénétique de la séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S des membres du genre *Methylophaga*

La distance évolutive entre les séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S des souches JAM1 et JAM7 ainsi que toutes les espèces validées du genre *Methylophaga* est illustrée par un arbre phylogénétique. L'arbre a été réalisé par une matrice de distance à partir d'alignement de séquences comptant 1443 positions. L'échelle représente le nombre de substitution par position. Les nombres aux branches indiquent en pourcentage le nombre d'arbres sur 1000 ré-échantillonnage dans lesquels on retrouve la branche à cet endroit. Seules les valeurs de plus de 70% sont indiquées. Les nombres à la suite des noms d'espèce réfèrent au nombre d'accession de GenBank et le second nombre présent pour les souches JAM1 et JAM7 indique le locus dans leur génome respectif. Les séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S de *Cycloclasticus pugetii* et de *Thiomicrospira arctica* ont été utilisées séquences d'ancrage de l'arbre.

À partir des même séquences de l'ARNr 16S utilisées pour réaliser l'arbre phylogénétique, des pourcentages d'homologie entre les espèces validées du genre *Methylophaga* et les souches étudiées ont été déterminés. Les pourcentages d'homologie obtenus pour la souche JAM1 sont compris entre 93,7% (avec *M. marina*) et 96,6% (*M. thiooxydans*). Pour la souche JAM7, pourcentages d'homologie obtenus sont compris entre 94,1% (*M. marina*) et 96,1% (*M. alcalica* et *M. thiooxydans*).

Tableau 4.7 : Homologie du gène de l'ARNr 16S des souches étudiées avec les espèces du genre *Methylophaga*

	Souche JAM1	Souche JAM7
<i>M. alcalica</i>	95,5%	96,1%
<i>M. aminisulfidivorans</i>	94,5%	94,8%
<i>M. marina</i>	93,7%	94,1%
<i>M. muralis</i>	94,1%	94,2%
<i>M. sulfidovorans</i>	95,1%	95,6%
<i>M. thalassica</i>	94,6%	94,7%
<i>M. thiooxydans</i>	96,6%	96,1%
<i>M. lonarensis</i>	96,2%	95,7%
Strain JAM1	ID	97%
Strain JAM7	97%	ID

4.5.2. Génome

La séquence du chromosome de la souche *Methylophaga* JAM1 a été déposée dans Genbank sous le numéro d'accèsion CP003390. Le chromosome de la souche *Methylophaga* sp. JAM7 a été déposé dans Genbank sous le numéro d'accèsion CP003380 et son plasmide sous le numéro d'accèsion CP003381. La séquence génomique pour la souche JAM1 (586 834 lectures, couverture 35X) et de la souche JAM7 (546 596 lectures, couverture 35X) sont constituées respectivement d'un chromosome de 3 137 192 pb, (44.7% contenu G+C) et d'un chromosome de 2 697 465 pb, (47.9% contenu G+C). Le plasmide de la souche JAM7 est constitué de 47 825 pb (couverture de 63X, 55 % contenu G+C). Les deux génomes ont été annotés à l'aide de 2 serveurs automatisés en ligne : Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) et Integrated Microbial Genomes Expert Review (IMG/ER). Les résultats généraux sont présentés dans le tableau 4.8

Tableau 4.8 : Informations générales sur le génome des souches JAM1 et JAM7

	Souche JAM1	Souche JAM7
Nombre de paire de base (plasmide)	3 137 192	2 697 465 (47 825)
Contenu en G+C (%mol)	44,75	47,92
Cadres de lecture prédits dans le chromosome (plasmide)	3043	2698 (56)
Cadres de lecture prédits avec une fonction prédite	2476	2194
ARN ribosomiaux	3 opérons (5S, 16S, 23S)	3 opérons (5S, 16S, 23S)
ARN de transfert	41	44

Du point de vue métabolique, l'opéron *mxoDEFJGIRACKL* codant pour la méthanol déhydrogénase et l'opéron *pqqBCDE* pour la biosynthèse du cofacteur pyrroloquinoléine quinone ont été prédits. Tous les gènes essentiels au cycle de Krebs ont été trouvés dans les 2 souches. En plus, la souche JAM1 possède le gène pour la malate déhydrogénase alors que ce gène est absent dans les génomes de la souche JAM7, *Methylophaga thiooxydans* DMS010 and *Methylophaga aminisulfidovorans* MP T. Les génomes des 2 souches présentent les gènes codant pour les enzymes de la voie Emden-Meyerhof-Parnas (glycolyse). Ils présentent également les gènes pour la voie du Ribulose-Monophosphate variant Entner-Doudoroff, particulièrement les gènes codant pour les 2 enzymes clés uniques à cette voie soit l'hexulose-6-phosphate synthase (HPS) et la 6-phospho-3-hexuloisomerase (PHI). Le gène pour l'enzyme correspondant au variant Entner-Doudoroff soit la 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG)

aldolase est prédit pour les 2 souches. La voie du Ribulose-Monophosphate variant Entner-Doudoroff est la voie utilisée par les espèces validées du genre *Methylophaga* pour assimiler les composés à un carbone. Un cadre de lecture codant pour la ribulose-biphosphate carboxylase (RuBisCO) a été trouvé chez la souche JAM1. La souche JAM1 possède 17 gènes codant pour des cytochromes tandis que la souche JAM7 en a 7. Les deux souches possèdent le gène codant pour la cytochrome c oxydase (*cbb3*).

Des gènes impliqués dans la dénitrification ont été recherchés la souche JAM1. Comme illustré à la figure 4.29, de nombreux gènes impliqués dans la dénitrification ont été prédits. Les gènes attendus codant pour des nitrate réductases, *narG1* et *narG2*, ont été trouvés et leur séquence est identique à la séquence partielle obtenue par Auclair et al. en 2010. Ces deux gènes *narG* s'inscrivent chacun dans un operon *nar* (*nar1* et *nar2*) codant pour tous les éléments de deux nitrate réductases. À ces 2 opérons, s'ajoutent deux opérons *nor* (oxide nitrique réductase) et un opéron *nos* (oxide nitreux réductase). Le gène *nirK* codant pour une nitrite réductase a été retrouvé, mais a une séquence tronquée de 82 acides aminés présentée à la figure 4.30. La séquence la plus proche obtenu par BLAST correspond au gène *nirK* de *Ralstonia solanacearum* qui est une beta-protéobactérie. Il est à noter que les opérons *nor2* et *nar1* ont une affiliation plus proche des beta-protéobactéries que des gamma-protéobactéries soutenant l'hypothèse d'un transfert horizontal de gènes.

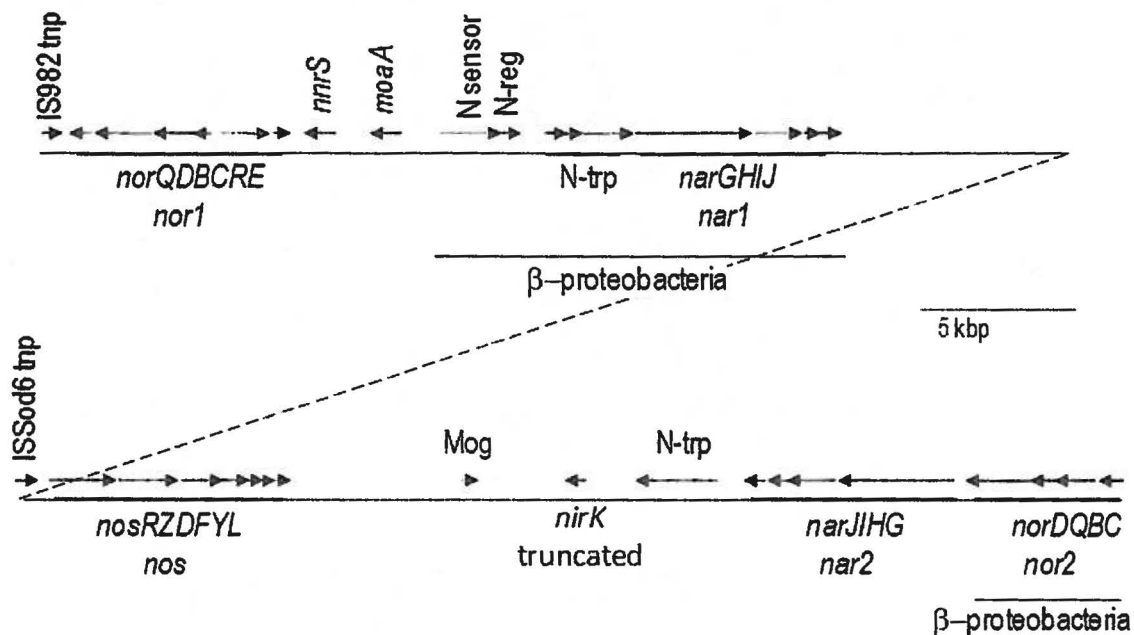


Figure 4.29 Arrangement chromosomique des gènes de dénitrification chez la souche *Methylophaga* sp. JAM1

La région chromosomique de 434 688 à 501 331 pb de la souche JAM1 est illustrée. Seulement les gènes qui montrent une affiliation probable avec la dénitrification sont montrés. On voit également deux régions plus affiliées aux beta-protéobactéries qu'aux gamma-protéobactéries.

nor: oxyde nitrique réductase; *nos*: oxyde nitreux réductase; *nirK*: nitrite réductase contenant du cuivre (tronqué); *nar*: nitrate réductase; *nnrS*: protéine impliqué dans la réponse au NO; N-trp: transporteur pour le nitrate/nitrite; N-sensor: protéine senseur pour le nitrate/nitrite; N-reg: régulateur de la réponse au nitrate/nitrite; Mog: protéine chélatrice du Molybdène; *moaA*: Protéine de biosynthèse du cofacteur Molybdène; IS982 tnp: transposase; ISSod6 tnp: transposase.

JAM1	1	MKGVFPPLAGSDYLMADKQRAIGVILNGLQGEIIVNGEKYNSVMPAFTSLKDNEIAHIMT	60
		+GVFPPLA SDYL AD +RAIGV+L+GL G+I VNG++Y+SVMP T L D+EIA+I+T	
Blast	406	LPGVFPPLAKSDYLAADPKRAIGVLLHGLNGKIKVNGQEYDSVMPMPMTQLNDDEIANILT	465
JAM1	61	YVMNAWGNQGELVTVDEVTQLR	82
		YV+N+W N G ++ DEV Q R	
Blast	466	YVLNSWDNPGGRISADEVKQFR	487

Figure 4.30 Séquence du gène *nirK* tronqué de la souche JAM1 aligné avec la séquence la plus proche

La séquence en acides aminés tronquée du gène *nirK* retrouvée dans le génome de la souche JAM1 a été alignée dans la banque de donnée de Genbank pour déterminer la séquence la plus proche. Cette séquence correspond au gène de la nitrite réductase à cofacteur cuivre de *Ralstonia solanacearum* qui présente 61% d'identité sur 96% de la séquence. Aucun domaine d'activité n'a pu être identifié.

Les génomes des souches JAM1 et JAM7 ont également été comparés entre eux afin de discriminer les deux souches comme étant des espèces distinctes. D'abord les génomes des deux souches ont été alignés à l'aide du serveur RAST (<http://rast.nmpdr.org>; Juin 2012; (Aziz et al., 2008)) en utilisant tour à tour chacune des souches comme référence. En moyenne, 2178 orthologues présentant 64,5 % d'identité en séquence d'acides aminés ont été trouvés entre les 2 souches. Les deux génomes ont également été alignés avec mVISTA en utilisant le programme d'alignement LAGAN (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>; Juin 2012; (Brudno et al., 2003, Frazer et al., 2004)). Les génomes présentaient 49,6% d'identité sur 84,5% de leur séquence. Une dernière analyse a été effectuée pour déterminer le pourcentage d'ADN conservé selon la méthode de Goris et al. (2007). Cette analyse indique que seulement 1,34% du génome de la souche JAM7 est conservé à plus de 90% chez la souche JAM1.

5. Discussion

L'objectif global du projet était de déterminer par caractérisation si les souches *Methylophaga* sp. JAM1 et *Methylophaga* sp. JAM7 sont de nouvelles espèces. Ces souches ont été isolées du biofilm d'un bioréacteur dénitrifiant en eaux salées dont elles représentaient plus de 50% de la population. Les souches JAM1 et JAM7 ont été caractérisés et identifiées comme étant de nouvelles espèces. La capacité de dénitrification de la souche JAM1 a été évaluée.

5.1. Les souches JAM1 et JAM7 sont de nouvelles espèces

L'élément de base utilisé pour déterminer une nouvelle espèce bactérienne est la séquence du gène de l'ARNr 16S. La relation entre la séquence de ce gène chez différentes espèces est généralement illustrée par un arbre phylogénétique. Celui réalisé pour les souches JAM1 et JAM7 en relation avec les autres espèces validées du genre *Methylophaga* a montré la séparation du genre en 2 clades ce qui a déjà été rapporté (Boden, 2011). Les souches JAM1 et JAM7 se retrouvent dans le clade regroupant les espèces haloalcaliphiles plutôt que dans le clade incluant l'espèce type de ce genre, *M. marina*. Selon l'arbre, les espèces les plus proches phylogénétiquement des 2 souches étudiées sont *M. murata* (*M. muralis*) et *M. alcalica*.

Lorsqu'on détermine l'homologie de la séquence du gène de l'ARNr 16S des 2 souches avec chaque espèce et entre elles, on obtient les résultats illustrés dans le Tableau 4.7. La limite théorique pour définir une nouvelle espèce est un pourcentage d'homologie inférieur à

97%. Cette limite est respectée pour les 2 souches avec les 8 espèces validées. Les espèces les plus proches en considérant l'homologie du gène de l'ARNr 16S étaient *M. thiooxydans*, *M. alcalica* et *M. lonarensis*. L'homologie entre les 2 souches étudiées est de 97%, ce qui est consistant avec le fait qu'elles appartiennent au même genre et ont évolué dans le même environnement. La solution courante pour discriminer 2 souches ayant un pourcentage d'homologie de 97% ou plus est la réassociation ADN-ADN. Cependant, dans le présent cas, les génomes entiers des 2 souches étaient disponibles et pouvaient donc servir à déterminer si les 2 souches sont la même espèce ou non.

Nos résultats ont également démontré l'appartenance des souches JAM1 et JAM7 au genre *Methylophaga* grâce aux marqueurs chemotaxonomiques. Ceux utilisés dans cette étude étaient les acides gras de la membrane cellulaire, le contenu G+C %mol de l'ADN, la présence de catalase et d'oxydase, et la voie métabolique utilisée pour métaboliser les composés à un carbone. Pour ce qui est des acides gras de la membrane cellulaire, les 3 acides gras majoritaires identifiés pour les 2 souches sont les mêmes, soit C_{16:1}ω7c, C_{16:0} et C_{18:1}ω6c. Ces 3 acides gras ont également été identifiés comme majoritaires chez *M. alcalica* (Doronina et al., 2003b), *M. aminisulfidivorans* (Kim et al., 2007), *M. muralis* (Doronina et al., 2005) *M. lonarensis* (Antony et al., 2011). L'information n'est pas disponible pour les autres espèces validées. Les contenus en G+C des souches JAM1 et JAM7 sont respectivement 44.7 mol% et 47.9 mol% ce qui correspond à l'intervalle du genre *Methylophaga* qui est de 42,4 mol% à 50 mol%. Les 2 souches sont catalase positives et oxydase positives ce qui aussi le cas de toutes les espèces validées. À l'aide de l'information contenu dans leur génome, il a été déterminé que les 2 souches ont tous les gènes nécessaires à la voie du Ribulose-Monophosphate variant Entner–Doudoroff. Cette voie métabolique est utilisée par les espèces validées du genre *Methylophaga* pour assimiler les composés à un carbone (Boden, 2011). L'appartenance des 2 souches étudiées au genre *Methylophaga* ne fait plus de doute suite à l'analyse du gène de l'ARNr 16S et à la concordance des marqueurs chemotaxonomiques. De plus, les 2 souches ont été isolées d'un milieu marin, donc salin avec un pH basique, comme de nombreuses espèces du genre *Methylophaga*.

5.2. Génomes

La séquence complète des génomes des deux souches étudiées a permis de discriminer les souches comme étant 2 espèces distinctes et de confirmer le potentiel de la souche JAM1 dans un procédé de dénitrification en eaux salées. D'abord par l'analyse des génomes à l'aide

de RAST, de VISTA et de la méthode de Goris et al. (2007), il a été déterminé que la similarité entre les deux génomes est faible. RAST a permis d'identifier les orthologues présents entre les deux souches et de calculer leur pourcentage d'identité au niveau de la séquence en acides aminés. La présence de 2178 orthologues présentant 64,5 % d'identité en séquence d'acides aminés indique que les souches sont relativement éloignées, sachant que la séquence en nucléotide présenterait sûrement un pourcentage d'identité encore plus faible. De plus, ce pourcentage est biaisé à la hausse par la conservation élevée des gènes essentiels entre les différentes espèces de bactéries. L'utilisation du programme d'alignement LAGAN dans VISTA a permis de déterminer que les génomes présentaient 49,6% d'identité sur 84,5% de leur séquence en nucléotide. Donc à l'aide de ce programme, seulement environ 50% des deux génomes est comparable et cette proportion présente une identité élevée qu'on peut encore une fois attribuée à la conservation de gènes essentiels. La méthode d'analyse proposée par Goris et al. (2007) est la seule qui a été comparée au standard présentement accepté pour discriminer deux espèces distincte soit la réassociation ADN-ADN. Cette analyse indique que seulement 1,34% du génome de la souche JAM7 est conservé à 90% chez la souche JAM1. Goris et al. (2007) ont démontré que des souches présentant plus de 70% en réassociation ADN-ADN donne un pourcentage d'ADN conservé de plus de 69% lorsque analysées par leur méthode. Sachant que la limite théorique établie pour la distinct de deux espèces avec la méthode de réassociation ADN-ADN est un pourcentage de réassociation inférieur à 70% qui est comparable à un pourcentage d'ADN conservé selon la méthode de Goris et al. (2007) de moins de 69%, les souches JAM1 et JAM7 sont deux espèces distinctes malgré leur pourcentage d'homologie du gène de l'ARNr 16S de 97%.

5.3. Gènes de dénitrification chez la souche JAM1

En analysant la séquence du génome de la souche JAM1, des gènes impliqués dans la dénitrification qui n'avaient pas été détectés précédemment ont été trouvés. En plus des 2 opérons *nar* attendus, deux opérons *nor* (oxyde nitrique réductase), un opéron *nos* (oxyde nitreux réductase) et un gène tronqué *nirK* codant pour une nitrite réductase ont été prédits. La séquence de *nirK* identifiée est de seulement 82 acides aminés et ne comprend aucun domaine d'activité. Chez les bactéries, deux types de nitrite réductase sont retrouvées soit, celle nécessitant un co-facteur cuivre codé par un gène *nirK* et celles nécessitant un cytochrome comme cofacteur codé par *nirS*. Il a été démontré que la complémentation par le gène *nirK* d'une bactérie contenant le gène *nirS* inactivé était possible alors que l'inverse ne fonctionnait

pas (Glockner *et al.*, 1993). Ceci indique probablement l'implication de gènes accessoires et régulateurs plus généraux pour le gène *nirK* que pour le gène *nirS*. Chez d'autres bactéries, le gène *nirK* est rarement regroupé avec les autres gènes de dénitrification ou avec les autres gènes *nir* dont la fonction est méconnue (Zumft, 1997). Le produit du gène *nirK* présente une séquence d'environ 400 acides aminés selon les séquences disponibles dans disponibles dans des banques de séquences. Le fragment retrouvé chez la souche JAM1 est très petit en comparaison ce qui explique, avec l'absence de domaine d'activité reconnu, l'absence de fonction du produit du gène. Pour ce qui est de la régulation, les gènes de dénitrification sont généralement régulés par la faible concentration d'oxygène qui est détectée par des régulateurs de transcription de la famille des CRP/FNR (Gómez-Hernández *et al.*, 2010, Zumft, 1997). Ces régulateurs régulent l'expression de nombreux gènes et peuvent réguler des gènes transférés si une région de reconnaissance est présente.

À partir de ces observations et sachant que la souche JAM1 est très efficace pour réduire le nitrate en conditions dénitrifiantes, il serait envisageable de restaurer le gène *nirK* par recombinaison homologue pour donner à cette souche la possibilité de faire la dénitrification en entier. Considérant qu'elle est adaptée à un milieu en eaux salées, cette pourrait être la clé d'un procédé de dénitrification en eaux salées performant. Il est possible que des gènes accessoires soient manquants pour permettre que la nitrite réductase soit fonctionnelle. Si la recombinaison homologue avec un gène *nirK* complet ne permet pas de restaurer l'activité nitrite réductase, il est également possible de transformer la souche JAM1 avec d'autres gènes comme le gène *nirV* qui est transcrit avec *nirK* chez *Rhodobacter sphaeroïdes* 2.4.3 et essentiel à sa fonction chez *Rhizobium etli* CFN42 et *Sinorhizobium meliloti* JJ1c10 (Chan *et al.*, 2004, Gómez-Hernández *et al.*, 2010, Jain *et al.*, 2001).

5.4. Paramètres optimaux de croissance pour les souches JAM1 et JAM7

Étant donné la tendance de la souche JAM1 à former des floccs et du biofilm, différentes méthodes pour suivre sa croissance ont été utilisées. La souche JAM7 avait tendance à adhérer seulement dans les tubes en verre utilisé pour le dosage protéique.

La première stratégie utilisée était le dosage protéique. Cette stratégie se base sur le fait que si la quantité et la taille des cellules bactériennes augmentent, la quantité de protéines aussi. De grandes variations entre les dosages protéiques des cultures liquides ont été observées à cause de la biomasse qui adhérait aux tubes de culture. L'erreur sur les dosages était souvent plus élevée que la concentration protéique mesurée. La croissance n'a pas été mesurée par spectrophotométrie parce que la souche JAM1 dans les conditions de cultures utilisées formait des floccs. Les floccs empêchent la culture d'être uniforme et fausse la lecture d'absorbance. Les résultats obtenus par dosage protéique ont donné une meilleure mesure de croissance.

Pour les essais de croissance en Bioscreen, les résultats ont permis de déterminer les conditions optimales de croissance en aérobie. Le suivi en Bioscreen a empêché la formation de floccs normalement présents dans les cultures liquide de la souche JAM1. Le mode d'agitation par vibration du Bioscreen serait la cause. Grâce à cet appareil, les conditions optimales ont pu être déterminées rapidement et avec précision. Ainsi, les conditions optimales de croissance pour la souche JAM1 est pH 8, 3% NaCl et 30°C et seule la température optimale varie pour la souche JAM7 soit 34°C. Ces paramètres de croissance optimaux font également du sens avec le milieu dont ont été isolées les 2 souches qui est un milieu salin (2,4% NaCl) et à pH (8) légèrement basique.

Selon leur phylogénie, les 2 souches appartiennent au clade du genre *Methylophaga* regroupant les espèces haloalcaliphiles. En pratique, les deux souches étudiées présentent un pH optimal de 8 avec un écart toléré de pH 7 à 11 et un besoin pour l'ion Na⁺ avec une concentration optimale de 3% NaCl ainsi qu'un écart toléré de 0,5% à 10% ce qui concorde avec les caractéristiques du clade.

5.5. Suivi de la réduction du nitrate chez la souche JAM1

Le suivi de la réduction du nitrate avait pour but de déterminer l'efficacité et la compétitivité de la souche JAM1 en conditions dénitrifiantes. Une courbe de croissance a été réalisée dans une étude précédente incluant le suivi de la croissance par dosage protéique et le suivi de la concentration de nitrate et de nitrite dans le temps (Auclair et al., 2010). Cette courbe avait été réalisée avec la souche JAM1 dans le milieu artificiel sea water (ASW) supplémenté avec 200 mg NO_3^- -N/L (14,1 mM) et 0,3% (94 mM) de méthanol. Les courbes discutées ici ont été réalisées dans le milieu methylophaga 1403 qui donne une meilleure croissance.

La réalisation d'une courbe de croissance en parallèle avec le suivi de la croissance du nitrate, du nitrite et du méthanol a été difficile. D'abord, la méthode par Bioscreen a été utilisée comme précédemment avec comme modification la préparation des plaques en atmosphère azote et la plaque a été scellée avec de la silicone pour empêcher l'entrée d'oxygène durant l'incubation. La courbe de croissance a été arrêtée après 12 heures à cause des mesures aberrantes d'absorbance obtenue au Bioscreen. Après analyse du nitrate, du nitrite et du méthanol, il a été constaté que la réduction du nitrate avait lieu. Ce n'est que suite aux essais comportant différentes concentrations de nitrate que la présence de biofilm a été observée et a permis d'expliquer les aberrations dans les mesures d'absorbance. Certaines observations ont pu être faites durant le suivi de la croissance. La souche JAM1 commence à réduire le nitrate après 6 heures d'incubation et le méthanol tend à diminuer environ 2 heures après. Du point de vue de la compétition, la rapidité avec laquelle la souche JAM1 réduit le nitrate est certainement un avantage et est due à l'expression constitutive de ces 2 gènes *narG* qui a été déterminée précédemment (Auclair et al., 2010).

Étant donné que la souche JAM1 réduit le nitrate même en présence d'oxygène, les essais de croissance en présence de différentes concentrations de nitrate et de méthanol ont été entrepris en conditions aérobies alors qu'en parallèle des essais en vial anaérobie avec dosage protéique ont été effectués. Les résultats en vial anaérobie ont permis de savoir que le méthanol n'était pas limitant puisqu'il en restait après 72 heures alors que le nitrate était complètement réduit et ce à des concentrations initiale de nitrate de 14,1 mM et de méthanol de 94 mM. Cependant, les dosages protéiques n'ont pas permis de suivre la croissance, car la concentration protéique présente était trop faible et la biomasse difficile à récupérer. Une lecture d'absorbance à 600 nm a également échoué comme suivi de croissance dans les vials anaérobiques.

Les courbes de croissance au Bioscreen avec différentes concentrations initiales de nitrate et de méthanol ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la formation de biofilm par la souche JAM1 est régulée par la concentration de nitrate. Comme il a été mentionné dans la section résultats, les courbes de croissance obtenues en Bioscreen avec différentes concentrations initiales de nitrate ne sont pas de bonnes mesures de croissance puisque la présence de biofilm dans les puits contenant entre 16 et 121 mM diminue l'absorbance observée tandis que dans les puits contenant entre 2 et 8 mM l'absence de biofilm permettant à toute la biomasse d'être en suspension donne des lectures d'absorbance élevées. Dans le cas des puits contenant entre 161 et 403 mM, aucun biofilm n'a été observée, mais le nitrite accumulé semble arrêter la croissance et la réduction du nitrate. Pour les différentes concentrations de méthanol, la concentration initiale de nitrate était de 40 mM dans tous les puits et la formation de biofilm a été observée dans tous les puits. Cette observation concorde avec l'hypothèse qu'une concentration de nitrate entre 16 et 121 mM provoque la formation de biofilm. Dans le cas des différentes concentrations initiales de méthanol, le suivi de la croissance indique, malgré la formation de biofilm, que des concentrations inférieures à 8 mM sont limitantes pour la croissance alors que des concentrations de plus de 312 mM semblent avoir un effet négatif sur la croissance probablement dû à la toxicité du méthanol. Du point de vue de la réduction du nitrate, celui-ci est complètement réduit à des concentrations initiales de méthanol entre 31 et 312 mM. À partir des résultats à différentes concentrations initiales de nitrate et de méthanol, on peut conclure que la concentration optimale de nitrate pour la réduction de celui-ci est entre 16 et 81 mM et que la concentration optimale de méthanol est entre 31 et 312 mM.

Le rôle de la souche JAM7 au sein du biofilm reste à déterminer. Elle pourrait contribuer à la formation du biofilm en produisant des exopolysaccharides et se maintenir à l'aide des traces d'oxygène ainsi que des résidus métaboliques de d'autres espèces présentes sachant que cette souche avait été détectée en faible proportion durant des études précédentes (Labbe et al., 2003a, Labbe et al., 2007).

6. Conclusion

L'étude des souches JAM1 et JAM7 a permis de déterminer qu'elles sont deux nouvelles espèces du genre *Methylophaga*. Les noms proposés pour respectivement les souches JAM1 et JAM7 sont *Methylophaga nitratreducenticrescens* et *Methylophaga frappieri*. Leur appartenance au genre *Methylophaga* a été appuyée par la concordance des marqueurs chemotaxonomiques suivants : les acides gras de la membrane cellulaire, le contenu G+C %mol de l'ADN, la présence de catalase, la présence d'oxydase et de l'utilisation de la voie du Ribulose-MonoPhosphate variant KDPG pour métaboliser les composés à un carbone. Leur distinction par rapport aux espèces validées du genre *Methylophaga* a été faite par l'étude phylogénétique du gène de l'ARNr 16S et son homologie de séquence. Les espèces les plus proches sont *M. thiooxydans*, *M. alcalica* et *M. lonarensis*. L'homologie entre les 2 souches étudiées est de 97%, mais elles peuvent être discriminées par l'étude de leur génome complet qui a été séquencé lors de la présente étude. La présence de 2178 orthologues présentant 64,5 % d'identité en acides aminés, 49,6% d'identité sur 84,5% de leur séquence en nucléotide calculé à l'aide du programme LAGAN de VISTA et 1,34% d'ADN conservé à 90% du génome de la souche JAM7 chez la souche JAM1 indiquent que les souches sont deux espèces distinctes.

L'étude du profil de réduction du nitrate de la souche JAM1 a permis de déterminer que la réduction du nitrate débutait rapidement et était optimale à des concentrations de nitrate entre 16 et 81 mM et de méthanol entre 31 et 312 mM.

L'étude du génome de la souche JAM1 a permis de constater la présence de tous les gènes nécessaires à une dénitrification entière. Le fait que le gène *nirK* soit tronqué est probablement ce qui bloque ce processus. La complémentation de la souche JAM1 avec un gène *nirK* fonctionnel pourrait permettre d'obtenir une souche prometteuse pour un processus de dénitrification en eaux salées étant donné que ses paramètres de croissance optimaux de pH et de salinité correspondent aux conditions d'un tel environnement. Le rôle de la souche JAM7 au sein du biofilm reste à déterminer. Il pourrait contribuer à la formation du biofilm en produisant des exopolysaccharides et se maintenir à l'aide des traces d'oxygène ainsi que des résidus métaboliques de d'autres espèces présentes.

Listes des références

- Antony CP, Doronina NV, Boden R, Trotsenko YA, Shouche YS & Murrell JC (2011) *Methylophaga lonarensis* sp. nov., a novel moderately haloalkaliphilic methylotroph isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Auclair J, Lepine F, Parent S & Villemur R (2010) Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a *Methylophaga* strain containing two highly divergent *narG* sequences. *ISME J.*
- Auclair J, Parent S & Villemur R (2011a) Functional diversity in the denitrifying biofilm of the methanol-fed marine denitrification system at the Montreal Biodome. *Microb. Ecol.*
- Auclair J (2011b) Analyse de la diversité fonctionnelle d'un biofilm impliqué dans l'élimination des nitrates en eau salée : étude du biofilm dénitrifiant du biodôme de montréal. Thèse INRS-IAF
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A & Zagnitko O (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75.
- Boden R (2011) Emended description of the genus *Methylophaga* Janvier et al. 1985. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Boden R, Kelly DP, Murrell JC & Schafer H (2010) Oxidation of dimethylsulfide to tetrathionate by *Methylophaga thiooxidans* sp. nov.: a new link in the sulfur cycle. *Environ Microbiol* 12(10):2688-2699.
- Brudno M, Do CB, Cooper GM, Kim MF, Davydov E, Green ED, Sidow A & Batzoglou S (2003) LAGAN and Multi-LAGAN: efficient tools for large-scale multiple alignment of genomic DNA. *Genome Res.* 13(4):721-731.
- Camargo JA, Alonso A & Salamanca A (2005) Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58(9):1255-1267.
- Chan YK & McCormick WA (2004) Experimental evidence for plasmid-borne *nor-nir* genes in *Sinorhizobium meliloti* JJ1c10. *Canadian Journal of Microbiology* 50(9):657-667.
- deZwart JMM, Nelisse PN & Kuenen JG (1996) Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp nov: An obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20(4):261-270.
- Doronina N, Darmaeva T & Trotsenko Y (2003a) *Methylophaga natronica* sp nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylotrophic bacterium from soda lake of the Southern Transbaikal Region. *Syst. Appl. Microbiol.* 26(3):382-389.
- Doronina NV, Darmaeva TD & Trotsenko YA (2003b) *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.* 53:223-229.
- Doronina NV, Krauzova VI & Trotsenko YA (1997) *Methylophaga limanica* sp. nov.: A new species of moderately halophilic, aerobic, methylotrophic bacteria. *Microbiology* 66(4):434-439.

- Doronina NV, Li Ts D, Ivanova EG & Trotsenko lu A (2005) *Methylophaga murata* sp. nov.: a haloalkaliphilic aerobic methylotroph from deteriorating marble. *Mikrobiologija* 74(4):511-519.
- Fesefeldt A & Glesche CG (1997) Identification of hyphomicrobium spp. using PCR-amplified fragments of the *mxoF* gene as a molecular marker. *Syst. Appl. Microbiol.* 20(3):387-396.
- Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM & Dubchak I (2004) VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W273-279.
- Gerhardt P (1994) Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Glockner AB, Jungst A & Zumft WG (1993) Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* 160(1):18-26.
- Gómez-Hernández N, Reyes-González A, Sánchez C, Mora Y, Delgado MJ & Girard L (2010) Regulation and Symbiotic Role of nirK and norC Expression in *Rhizobium etli*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24(2):233-245.
- Goretski J, Zafiriou OC & Hollocher TC (1990) Steady-state nitric oxide concentrations during denitrification. *J. Biol. Chem.* 265(20):11535-11538.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P & Tiedje JM (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(Pt 1):81-91.
- Herbert RA (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 23(5):563-590.
- Jain R & Shapleigh JP (2001) Characterization of nirV and a gene encoding a novel pseudoazurin in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Microbiology* 147(Pt 9):2505-2515.
- Janvier M, Fréhel C, Grimont F & Gasser F (1985) *Methylophaga marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., marine methylotrophs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35(2):131-139.
- Janvier M & Grimont PAD (1995) The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch-gamma of proteobacteria. *Res. Microbiol.* 146(7):543-550.
- Jetten MS (2008) The microbial nitrogen cycle. *Environ Microbiol* 10(11):2903-2909.
- Kim HG, Doronina NV, Trotsenko YA & Kim SW (2007) *Methylophaga aminisulfivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2096-2101.
- Labbe N, Juteau P, Parent S & Villemur R (2003a) Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal biodome, Canada. *Microb. Ecol.* 46(1):12-21.
- Labbe N, Laurin V, Juteau P, Parent S & Villemur R (2007) Microbiological community structure of the biofilm of a methanol-fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms. *Microb. Ecol.* 53(4):621-630.
- Labbe N, Parent S & Villemur R (2003b) Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. *Water Res.* 37(4):914-920.
- Mavromatis K, Ivanova NN, Chen IM, Szeto E, Markowitz VM & Kyrpides NC (2009) The DOE-JGI Standard Operating Procedure for the Annotations of Microbial Genomes. *Stand Genomic Sci* 1(1):63-67.

- Osaka T, Shirotani K, Yoshie S & Tsuneda S (2008) Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process. *Water Res.* 42(14):3709-3718.
- Parent S & Morin A (2000) N budget as water quality management tool in closed aquatic mesocosms. *Water Research* 34(6):1846-1856.
- Stothard P & Wishart DS (2006) Automated bacterial genome analysis and annotation. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(5):505-510.
- Tindall BJ, Rossello-Mora R, Busse HJ, Ludwig W & Kampfer P (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:249-266.
- Wayne LG (1988) International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene A* 268(4):433-434.
- Xiao YY & Roberts DJ (2010) A review of anaerobic treatment of saline wastewater. *Environ. Technol.* 31(8-9):1025-1043.
- Ye RW, Averill BA & Tiedje JM (1994) Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(4):1053-1058.
- Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, Hirata A & Inamori Y (2004) Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5):3152-3157.
- Yoshie S, Ogawa T, Makino H, Hirose H, Tsuneda S & Hirata A (2006) Characteristics of bacteria showing high denitrification activity in saline wastewater. *Lett. Appl. Microbiol.* 42(3):277-283.
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(4):533-616.