

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre INRS - Institut Armand-Frappier

**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.**

Par
JULIE AUCLAIR

Thèse présentée pour l'obtention du grade
Philosophiae Doctor (Ph. D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne : Michel Sylvestre (Ph. D.)
Centre INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe : Patrick Hallenbeck (Ph. D.)
Université de Montréal

Examineur externe : David Juck (Ph. D.)
Institut de Recherche en Biotechnologie du
CNRC

Directeur de recherche : Richard Villemur (Ph. D.)
Centre INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

La dénitrification biologique est de plus en plus employée pour éliminer le nitrate des eaux usées constituant une alternative économique aux méthodes physiques. Cependant, cette activité repose sur le développement de microorganismes capables de respirer les oxydes d'azote et des les transformer en N_2 . Le développement de cette flore dénitrifiante est influencé par divers facteurs rendant ainsi souvent les performances de dénitrification variables. Une meilleure connaissance des microorganismes présents dans ces systèmes est, de ce fait, nécessaire à l'élaboration de systèmes de dénitrification performants et stables.

Le Biodôme de Montréal opère un réacteur à lit mobile, alimenté au méthanol, pour éliminer le nitrate d'un aquarium de 3 millions de litres d'eau de mer artificielle nommé le Saint-Laurent Marin. Les microorganismes naturellement présents dans l'affluent du système de dénitrification colonisent les supports mobiles du réacteur formant un biofilm. Cependant, depuis son installation le réacteur n'a jamais atteint les performances de dénitrification attendues. L'objectif de mon projet de doctorat était donc de déterminer la fonctionnalité des populations bactériennes présentes dans le biofilm dénitrifiant.

L'un des objectifs spécifiques de ce projet était d'identifier les bactéries méthylophages dénitrifiantes dans le biofilm. Le méthanol constitue une source de carbone pour les populations microbiennes du biofilm à l'étude. Afin d'identifier les populations bactériennes dénitrifiantes responsables de la consommation du méthanol dans le biofilm des essais de *stable isotope probing* (SIP) ont été entrepris. Les résultats obtenus ont démontré que les bactéries affiliées au genre *Methylophaga*, retrouvées abondamment dans le biofilm, assimilent le méthanol sous conditions anoxiques (absence d'oxygène et présence de nitrate). Les espèces bactériennes affiliées à *Methylophaga* étaient jusqu'à présent caractérisées comme étant aérobies strictes. Des essais en culture pure, suite à l'isolement à partir du biofilm de deux espèces bactériennes affiliées au genre *Methylophaga*, ont démontré la capacité de *Methylophaga* sp. JAM1 à croître en absence d'oxygène en réduisant le nitrate en nitrite. Ceci est la première démonstration directe que des bactéries du genre *Methylophaga* peuvent être adaptées à des environnements anaérobies. L'analyse des gènes de dénitrification sur l'ADN extrait de *Methylophaga* sp. JAM1 nous a permis de détecter la présence de deux gènes (*narG1* et *narG2*) codant pour la nitrate réductase membranaire (*narG*). L'analyse des séquences des gènes *narG* suggère qu'un de ces deux gènes a

été acquis par transfert horizontal de gènes. Lors de ce volet du projet, des travaux ont également été menés afin de mettre au point une méthode originale de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse permettant de confirmer le marquage de l'ADN lors des essais SIP.

L'autre volet de ce projet était d'identifier les populations bactériennes responsables de l'activité de dénitrification dans le biofilm. Une approche combinant différentes techniques de biologie moléculaire a permis de dresser un portrait plus complet de la dynamique fonctionnelle du biofilm à l'étude. Les gènes *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *qnorB* et *nosZ*, codant pour les sous-unités catalytiques des réductases impliquées dans la dénitrification, ont été utilisés comme marqueurs de la diversité des populations dénitrifiantes. Dans un premier temps, ces gènes ont été amplifiés par PCR avec des amorces dégénérées à partir de l'ADN extrait du biofilm, pour être ensuite clonés et séquencés. Au total, 25 gènes, tous affiliés aux Protéobactéries, ont été trouvés dont certains n'ont jamais été répertoriés auparavant dans la littérature. Parmi ceux-ci ont été retrouvés les gènes *napA*, *nirK*, *cnorB* et *nosZ* d'*Hyphomicrobium* sp. NL23 ainsi que les gènes *narG1* et *narG2* de *Methylophaga* sp. JAM1, deux souches isolées à partir du biofilm. Des essais de PCR quantitative ont ensuite été réalisés afin d'évaluer l'abondance des gènes *narG* et *napA*, pouvant représenter des bactéries réductrices de nitrate ou dénitrifiantes, ainsi que *nirS* et *nirK*, ciblant les populations dénitrifiantes. Les gènes retrouvés chez *Hyphomicrobium* sp. NL23 et *Methylophaga* sp. JAM1 étaient les plus abondants, la quantification des autres gènes étaient de 10 à 10000 fois moindre. Parallèlement, l'activité des populations dénitrifiantes a été évaluée par transcription inverse couplée à la PCR sur l'ARN extrait du biofilm. Seulement l'expression de quelques gènes a été détectée dont, entre autres, *narG1* de *Methylophaga* sp. JAM1 et *nirK*, *cnorB* et *nosZ* d'*Hyphomicrobium* sp. NL23. Ces résultats suggèrent que la souche NL23 utilise directement le nitrite présent dans le biofilm, probablement produit par les bactéries réductrices de nitrate, dont la souche JAM1, pour supporter sa croissance.

Les travaux réalisés au cours de ce projet de recherche nous permettent de mieux comprendre la fonction des populations dénitrifiantes du biofilm. L'ensemble de ces résultats suggère que *Methylophaga* sp. JAM1 et *Hyphomicrobium* sp. NL23 jouent un rôle majeur dans l'activité du biofilm. D'autres études seront, cependant, nécessaires afin d'évaluer l'impact de la présence de ces populations sur les performances de dénitrification du réacteur.

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier mon directeur de recherche, Richard Villemur (Ph. D.), sans qui ce doctorat n'aurait pas été possible. Il m'a donné la chance de faire partie d'une équipe de travail stimulante et m'a fourni tous les outils nécessaires à la réussite de ce projet de recherche. Il a été un guide durant toutes ces années en partageant avec moi ces connaissances et en favorisant mon intégration dans le domaine scientifique. Richard, merci d'avoir cru en moi, merci pour tes conseils, ton soutien et ta patience.

Je veux également remercier tous les membres du Groupe de Recherche en Microbiologie de l'Environnement présents et passés que j'ai côtoyés ou avec qui j'ai collaborés durant toutes ces années. Je pense plus particulièrement aux étudiants et au personnel de recherche du Laboratoire de Richard Villemur avec qui j'ai partagé mes joies et mes angoisses, et qui ont toujours été présents lorsque j'en avais besoin. Merci Normand, Philippe, Sébastien, Randa, Julie, Julianne, Marianne, Karla, Silvia, Marc et Céline. J'aimerais aussi témoigner ma reconnaissance à François Lépine (Ph. D.) qui m'a grandement aidé pour le développement de la technique de LC-MS, l'expérience a été très enrichissante. Merci aussi à Sylvain Milot pour son aide précieuse en spectrométrie de masse et pour son ingéniosité qui m'a souvent permis de régler divers problèmes techniques de façon simple et rapide. Je me dois de remercier également Rolf Morosoli (Ph.D.) et Johanne Lemay pour leur aide lors de la mise au point de la technique de SIP ainsi que Roger Dubuc pour son assistance lors du suivi du nitrate et du nitrite par HPLC.

Je ne peux passer sous silence l'aide précieuse de Serge Parent (Ph.D.) qui était responsable du réacteur de dénitrification et de tous les membres du personnel de soutien du Biodôme de Montréal qui m'ont assistée lors des échantillonnages.

J'aimerais aussi remercier l'ensemble de ma famille et plus particulièrement mes parents, ma sœur et mon frère pour leurs encouragements, leur soutien et leurs conseils durant toutes ces années. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi. Votre amour inconditionnel a été un précieux réconfort. Henrick, je ne pourrai jamais te dire assez merci pour ton amour, ta compréhension et ta présence constante autant lors des moments heureux que lors des moments plus difficiles. Merci d'être dans ma vie.

Finalement, je remercie la Fondation Armand-Frappier et le Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies pour le support financier qu'ils m'ont offert tout au long de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
REMERCIEMENTS.....	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XV
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. MISE EN CONTEXTE	1
1.2. LE SAINT-LAURENT MARIN DU BIODÔME DE MONTRÉAL	2
1.3. SYSTÈME DE DÉNITRIFICATION DU BIODÔME DE MONTRÉAL	3
1.4. PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE ET DES OBJECTIFS DE LA THÈSE	5
1.5. PRÉSENTATION DE LA THÈSE.....	7
2. REVUE DE LITTÉRATURE	9
2.1. LE NITRATE	9
2.1.1. <i>Origine et présence dans l'environnement</i>	9
2.1.2. <i>Toxicité du nitrate</i>	10
2.2. LE CYCLE DE L'AZOTE : LES TRANSFORMATIONS DU NITRATE DANS L'ENVIRONNEMENT	11
2.2.1. <i>La nitrification</i>	12
2.2.2. <i>Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium</i>	14
2.2.3. <i>Oxydation anaérobie de l'ammonium</i>	14
2.2.4. <i>Oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification</i>	16
2.3. LA DÉNITRIFICATION.....	17
2.3.1. <i>Importance environnementale de la dénitrification</i>	19
2.3.2. <i>Les organismes dénitrifiants</i>	20
2.3.3. <i>Les enzymes de la dénitrification</i>	21
2.3.3.1. Nitrate réductase.....	22
2.3.3.2. Nitrite réductase	25
2.3.3.3. Oxyde nitrique réductase.....	26
2.3.3.4. Oxyde nitreux réductase.....	28
2.3.3.5. Chaîne de transport des électrons	30
2.3.4. <i>Organisation et localisation des gènes de dénitrification</i>	31
2.3.5. <i>Expression des gènes de la dénitrification</i>	32
2.3.5.1. Effet de l'oxygène	32
2.3.5.2. Effet des oxydes d'azote.....	33
2.3.6. <i>Utilisation des gènes fonctionnels comme indice de la diversité dénitrifiante</i>	34
2.3.7. <i>Caractère phylogénétique des gènes fonctionnels de la dénitrification et transfert horizontal des gènes</i>	35
2.3.8. <i>La dénitrification et le traitement des eaux usées</i>	36
2.3.8.1. Les procédés de dénitrification.....	37
2.3.8.2. La dénitrification hétérotrophe pour le traitement des eaux usées	38
2.4. LES COMPOSÉS MONOCARBONÉS	40
2.4.1. <i>Métabolisme des composés monocarbonés</i>	40
2.4.2. <i>Organismes méthylophes</i>	41
2.4.3. <i>Microorganismes méthylophes dans les systèmes de dénitrification</i>	42

2.5. ÉCOLOGIE MICROBIENNE : ÉTUDE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES	43
2.5.1. Étude de la diversité microbienne	43
2.5.1.1. Génothèque.....	43
2.5.1.2. Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant.....	45
2.5.2. Étude de la fonction des microorganismes.....	45
2.5.2.1. Stable isotope probing.....	46
3. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1.....	49
3.1. MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE 1	49
3.2. CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE À L'ARTICLE 1	50
3.3. ARTICLE 1: DISSIMILATORY REDUCTION OF NITRATE IN SEAWATER BY A <i>METHYLOPHAGA</i> STRAIN CONTAINING TWO HIGHLY DIVERGENT <i>NAR</i> G SEQUENCES.....	51
3.4. RÉSUMÉ.....	52
3.5. ABSTRACT	53
3.6. INTRODUCTION.....	54
3.7. MATERIALS AND METHODS	55
3.7.1. <i>Determination of the concentration of nitrate, nitrite and ammonium</i>	55
3.7.2. <i>DNA-SIP</i>	56
3.7.3. <i>PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rRNA gene library</i>	57
3.7.4. <i>16S rRNA gene sequence analyses</i>	57
3.7.5. <i>Isolation of Methylophaga strains</i>	58
3.7.6. <i>Detection of denitrification genes in the isolated strains</i>	58
3.7.7. <i>Expression of narG in Methylophaga sp. strain JAMI</i>	59
3.8. RESULTS	61
3.8.1. <i>Enrichment of denitrifying methylotrophic bacteria by DNA-SIP</i>	61
3.8.2. <i>Isolation of Methylophaga strains from the biofilm</i>	67
3.8.3. <i>Detection of denitrification genes in Methylophaga strains and their expression</i>	69
3.9. DISCUSSION.....	71
3.10. ACKNOWLEDGEMENTS.....	75
4. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2.....	77
4.1. MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE 2	77
4.2. CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE À L'ARTICLE 2	77
4.3. ARTICLE 2: FUNCTIONAL DIVERSITY IN THE BIOFILM OF THE METHANOL-FED, MARINE DENITRIFICATION SYSTEM AT THE MONTREAL BIODOME.	78
4.4. RÉSUMÉ.....	79
4.5. ABSTRACT	80
4.6. INTRODUCTION.....	81
4.7. EXPERIMENTAL PROCEDURES	82
4.7.1. <i>SLM denitrification system</i>	82
4.7.2. <i>DNA extraction</i>	83
4.7.3. <i>Gene libraries</i>	83
4.7.4. <i>Quantification of narG, napA, nirS, nirK and nosZ in the biofilm</i>	85
4.7.5. <i>Reverse transcriptase (RT)-PCR assay</i>	85
4.8. RESULTS	89
4.8.1. <i>Diversity of denitrification genes in the biofilm</i>	89
4.8.2. <i>Quantification of the nitrate-reducing bacteria and denitrifiers</i>	90
4.8.3. <i>Transcription of denitrification genes in the bacterial strains and in the biofilm</i>	90
4.9. DISCUSSION.....	94
4.9.1. <i>Transcriptional expression of the denitrification genes</i>	95
4.9.2. <i>Abundance of nitrate reducers and denitrifiers</i>	96

4.10. ACKNOWLEDGMENTS.....	97
5. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 3.....	99
5.1. MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE 3	99
5.2. CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE À L'ARTICLE 3	99
5.3. ARTICLE 3: LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY METHOD TO MEASURE ISOTOPE INCORPORATION FOR DNA-STABLE ISOTOPE PROBING.	100
5.4. RÉSUMÉ.....	101
5.5. ABSTRACT	102
5.6. INTRODUCTION.....	103
5.7. MATERIALS AND METHODS	105
5.7.1. ¹³ C-labeling.....	105
5.7.2. DNA extraction.....	105
5.7.3. DNA mix	106
5.7.4. Density gradient ultracentrifugation	106
5.7.5. PCR-DGGE	106
5.7.6. DNA hydrolysis.....	106
5.7.7. Analysis of ¹³ C incorporation in DNA by HPLC/MS.....	107
5.8. RESULTS AND DISCUSSION	107
5.8.1. Development of LC-MS method.....	107
5.8.2. Estimation of ¹³ C incorporation in DNA- SIP experiment.....	109
5.8.3. ¹³ C incorporation in a biofilm	113
5.9. ACKNOWLEDGMENTS.....	115
6. DISCUSSION	117
6.1. IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES MÉTHYLOTROPHES	117
6.2. ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ DÉNITRIFIANTE	122
6.3. DYNAMIQUE DU BIOFILM DÉNITRIFIANT	125
7. CONCLUSION.....	129
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	131
ANNEXE	163

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.	Schéma du système de traitement principal de l'eau du Saint-Laurent Marin.....	3
Figure 1.2.	Schéma du système de traitement principal de l'eau du SLM suite à l'intégration du système de dénitrification.....	4
Figure 1.3.	Photos du système de dénitrification du Biodôme de Montréal.....	5
Figure 1.4.	Évolution de la concentration de nitrate dans l'eau du Saint-Laurent Marin.....	6
Figure 2.1.	Cycle de l'azote.....	12
Figure 2.2.	Mécanisme de la réaction d'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification.....	17
Figure 2.3.	Protéines impliquées dans la réduction du nitrate en nitrite et organisation des gènes codant pour la nitrate réductase membranaire (A) et la nitrate réductase périplasmique (B).....	24
Figure 2.4.	Représentations schématiques de l'oxyde nitrique réductase.....	27
Figure 2.5.	Représentation schématique de l'oxyde nitreux réductase.....	28
Figure 2.6.	Chaîne de transport des électrons lors de la dénitrification chez <i>Paracoccus denitrificans</i>	31
Figure 2.7.	Schéma d'un MBBR anoxique avec agitation mécanique.....	38
Figure 2.8.	Schéma du métabolisme des composés monocarbonés.....	41
Figure 3.1.	NO _x removal (a) and ¹³ C incorporation in DNA (b) during SIP cultures.....	63
Figure 3.2.	Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles for the 'light' and 'heavy' DNA from the SIP CsCl gradients.....	64
Figure 3.3.	Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences affiliated with the genus <i>Methylophaga</i>	66
Figure 3.4.	Growth of <i>Methylophaga</i> sp. strain JAM1 under aerobic and denitrifying conditions.....	68
Figure 3.5.	Phylogenetic tree of <i>narG</i> deduced amino-acid sequences of <i>Methylophaga</i> sp. strain JAM1.....	70
Figure 3.6.	Expression of <i>narG1</i> and <i>narG2</i> in <i>Methylophaga</i> sp. strain JAM1.....	70
Figure 4.1.	Phylogenetic analysis of the reductase deduced amino acid sequences retrieved from the denitrifying biofilm and the isolated strains.....	91
Figure 5.1.	Selected ion monitoring chromatograms of thymine from DNA mixes.....	110

Figure 5.2. Separation of heavy and light DNA..... 111

Figure 5.3. DGGE DNA fingerprints of the CsCl gradient fractions..... 112

Figure 5.4. Thymine isotopic ratios in the DNA of CsCl gradient fractions determined by HPLC/MS..... 113

Figure 5.5. DGGE DNA fingerprints of the CsCl gradient fractions of biofilm DNA..... 114

Figure 6.1. Voie du ribulose monophosphate pour l'assimilation du formaldéhyde..... 119

Figure 6.2. Cycle de la sérine pour l'assimilation du formaldéhyde.....120

Figure 6.3. Suivi des concentrations de nitrate et de nitrite dans l'effluent du réacteur de dénitrification sur une période d'environ 1 an..... 128

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Équations et potentiels d'oxydoréduction (E0') des réactions de la dénitrification.....	18
Tableau 2.2. Gènes codant les enzymes de la dénitrification.....	29
Table 3.1. Oligonucleotides used as PCR primers.....	60
Table 3.2. Closest affiliation of the screened clones from the 16S rDNA library derived from the heavy fraction (fraction 4) of (¹³ C)-methanol cultures.....	65
Table 4.1. Degenerate oligonucleotides used as PCR primers.....	84
Table 4.2. Specific primers used for qPCR.....	87
Table 4.3. Specific primers used for RT-PCR.....	88
Table 4.4. Quantification of the denitrification gene sequences in the biofilm by qPCR.....	93
Table 4.5. Detection of denitrification gene transcripts in the bacterial strains and in the biofilm by RT-PCR.....	94
Table 5.1. Isotopic ratio for thymine from hydrolyzed unlabeled <i>E. coli</i> DNA.....	108

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMO : Ammonium monooxygénase
Anammox : Oxydation anaérobie de l'ammonium (Anaerobic ammonia oxidation)
AOA : *Archaea* oxydant l'ammonium (Ammonia-oxidizing *Archaea*)
AOB : Bactérie nitreuse (Ammonia-oxidizing bacteria)
ARNm : ARN messenger
ARNr 16S : ARN ribosomal 16S
ATP : Adénosine triphosphate
cdNir : Nitrite réductase contenant un cytochrome de type *cdI*
CH₃OH : Méthanol
C/N : ratio carbone/azote
CO₂ : Dioxyde de carbone
COD : Carbone organique dissous
CsCl : Chlorure de césium
cNorB : Oxyde nitrique réductase cNorB
CuNir : Nitrite réductase contenant un cofacteur cuivre
DGGE : Gel électrophorèse à gradient dénaturant
DNRA : Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium
e⁻ : Électron
E₀' : Potentiel d'oxydoréduction
FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence
FNR : Régulateur de la réduction du fumarate et du nitrate
GC : Guanine-cytosine
H⁺ : Proton
HAO: Hydroxylamine oxydoréductase
H₂O : Eau
HGT : Transfert horizontal de gènes
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
IRMS : Spectromètre de masse à ratio isotopique
KOH : Hydroxyde de potassium
MAR : Microautoradiographie

MBBR : Réacteur à lit mobile (Moving bed biofilm reactor)
MS : Spectromètre de masse
N₂ : Azote moléculaire
N₂H₄ : Hydrazine
NaCl : Chlorure de sodium
NaNO₃ : Nitrate de sodium
Nap : Nitrate réductase périplasmique
Nar : Nitrate réductase membranaire
NH₄⁺ : Ammonium
NH₂OH : Hydroxylamine
Nir : Nitrite réductase
NO : Oxyde nitrique
NO₂⁻ : Nitrite
NO₃⁻ : Nitrate
N₂O : Oxyde nitreux
NOB : Bactérie nitratante (Nitrite-oxidizing bacteria)
Nor : Oxyde nitrique réductase
N₂Or : Oxyde nitreux réductase
NrfA : Cytochrome *c* nitrite réductase
O₂ : Dioxygène
OMZ : Zone de minimum d'oxygène (Oxygen minimum zone)
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PLFA : Acides gras phospholipidiques
p.p.m. : Partie par million
qCu(A)NOR : Oxyde nitrique réductase qCu(A)NOR
QMS : Spectromètre de masse quadripolaire
qNorB : Oxyde nitrique réductase qNorB
RT : Transcription inverse
SIP : Stable isotope probing
SLM: Saint-Laurent Marin

1. INTRODUCTION

1.1. Mise en contexte

Au cours du dernier siècle, les activités humaines liées à l'agriculture et au secteur industriel ont grandement contribué à l'augmentation de la disponibilité de l'azote dans les différents écosystèmes, ayant ainsi de graves conséquences pour l'environnement. Cette problématique a provoqué l'émergence des recherches visant à développer des traitements permettant l'élimination de l'azote des effluents agricoles et industriels. Divers traitements physico-chimiques ont été mis au point dont l'échange ionique et l'osmose inverse. Cependant, les coûts élevés d'exploitation de ces procédés ont mené vers le développement de traitements biologiques. Les procédés biologiques exploitent la capacité des microorganismes à métaboliser les composés azotés. L'un de ces procédés est la dénitrification dans laquelle les microorganismes convertissent le nitrate (NO_3^-) en azote moléculaire (N_2).

Depuis sa découverte à la fin des années 1800, la dénitrification a été largement explorée. En effet, plusieurs travaux ont été menés afin de mettre en évidence les populations bactériennes impliquées dans la dénitrification et les mécanismes à la base de ce processus respiratoire. Cependant, la majorité de ces travaux ont été réalisés sur la dénitrification en eau douce, dans les sols et chez des espèces bactériennes isolées. Peu de données ont été rapportées jusqu'à maintenant sur la dénitrification en eau salée et encore moins sur les systèmes de dénitrification permettant de traiter l'eau salée.

Les industries agro-alimentaires, pétrolières, textiles et piscicoles sont connues pour leur production de rejets riches en sels contaminés par des nitrates. Le rejet de ces effluents dans l'environnement contribue à la détérioration des cours d'eau. Il y a donc un besoin de développer des systèmes de dénitrification efficaces en eau salée. La problématique des nitrates en milieu salé est rencontrée également dans les aquariums marins publics. Ces aquariums opérés en système clos font généralement face à une augmentation rapide des taux de nitrate dans le milieu. À forte concentration les nitrates sont toxiques pour la faune. Le rétablissement de la concentration de nitrate à un niveau acceptable demande alors des changements d'eau fréquents et dispendieux. Le Biodôme de Montréal fait d'ailleurs face à cette problématique en raison de la présence d'une forte concentration de nitrate dans son bassin du Saint-Laurent Marin.

1.2. Le Saint-Laurent Marin du Biodôme de Montréal

Le Biodôme de Montréal possède un écosystème représentatif de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent, nommé le Saint-Laurent Marin (SLM). Il consiste en un aquarium de 3.25 millions de litres d'eau de mer artificielle (30 g/L de sel). Cette eau est obtenue à partir d'un mélange de sels Instant Ocean (Aquarium Systems Inc, Mentor, OH) lequel contient divers sels et éléments traces et ne contient ni nitrate ni phosphate. L'eau de l'aquarium est maintenue à une température de 10°C et un pH de 8.0. L'aquarium est divisé en deux bassins d'exposition, un bassin d'isolement et un bassin médical. Le SLM est le refuge d'environ 600 poissons, d'une centaine d'oiseaux marins et de 2000 invertébrés.

Au départ, l'eau du SLM, à l'exception de celle du bassin d'isolement, était traitée grâce au système de traitement principal seulement (Figure 1.1). Dans ce système, l'eau est tout d'abord filtrée dans des filtres à sable, 6 au total, qui ont pour fonction l'élimination des matières en suspension. L'eau à la sortie des filtres à sable est acheminée vers le percolateur aérobique dans lequel s'effectue la conversion de l'azote ammoniacal en nitrite (NO_2^-) et ensuite en nitrate par nitrification. Finalement, l'eau subit un traitement à l'ozone avant son retour dans le SLM.

Suite à la mise en fonction du SLM en 1992, le niveau de nitrate a augmenté rapidement pour atteindre une concentration maximale de 200 mg N-NO_3^- /L (Labbé et al., 2003a). Le nitrate provient de la transformation, par nitrification, des déchets ammoniacaux (urée) générés par la faune présente dans le SLM. Ce niveau élevé de nitrate aurait été responsable de la mort d'invertébrés et de poissons (Parent and Morin, 2000). Afin de diminuer la quantité de nitrate dans le milieu, le Biodôme de Montréal a intégré, en 1998, une filière de dénitrification biologique au système de traitement principal de l'eau du SLM. Le Biodôme de Montréal a également retiré la population de Fous de Bassan qui était responsable de 33% de la production des déchets ammoniacaux (Parent and Morin, 2000).

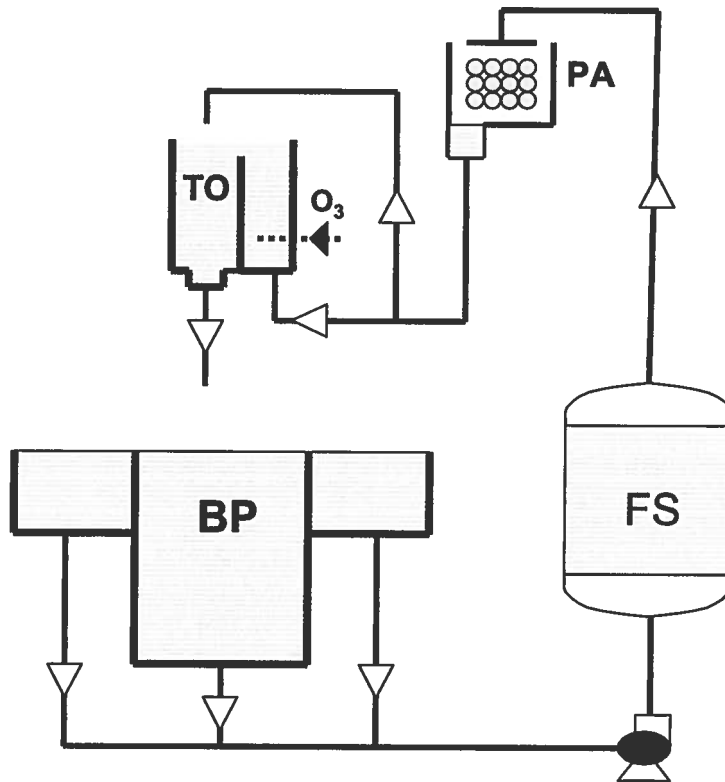


Figure 1.1. Schéma du système de traitement principal de l'eau du Saint-Laurent Marin. (BP) Bassin principal : Baie, Bassin médical et littoral rocheux, (FS) Filtres à sable, (PA) Percolateur aérobie (nitrificateur) et (TO) Système d'ozonation. Les flèches indiquent le sens de la circulation de l'eau. Modifiée de Parent et Morin (2000). Le schéma n'est pas à l'échelle.

1.3. Système de dénitrification du Biodôme de Montréal

Le système de dénitrification est constitué de deux réacteurs biologiques, soit un désoxygénateur et un dénitrificateur, et d'un décanteur (Figure 1.2 et 1.3A). Le désoxygénateur et le dénitrificateur sont colonisés par des microorganismes spécifiques adaptés aux conditions du milieu. Ces microorganismes sont issus de la flore microbienne endogène au SLM, présente dans l'affluent du système de dénitrification. Une portion de l'eau provenant des filtres à sable est acheminée vers le réacteur de désoxygénation qui est un réacteur à lit fixe alimenté au méthanol. Celui-ci est rempli de biobilles NuPAC® 9 cm sur lesquelles se développe un biofilm. Les microorganismes, par consommation du méthanol et de l'oxygène, éliminent l'oxygène dissous fournissant ainsi une eau à faible teneur en oxygène pour l'étape de dénitrification. Le dénitrificateur est un réacteur à lit mobile (MBBR : moving bed biofilm reactor) alimenté au méthanol contenant des biobilles de type Bioflow 9® sur lesquelles se développe un biofilm

(Figure 1.3B). La source de carbone est ajoutée au dénitrificateur sous forme de méthanol 50% (v/v) à raison de 4.5 ml/min. La faible concentration d'oxygène dissous (0.3 à 0.8 mg/L résiduel) et le taux élevé de nitrate favorisent le développement d'une flore dénitrifiante.

Depuis sa mise en fonction en 1998, le dénitrificateur du Biodôme de Montréal n'a jamais atteint les performances attendues (Figure 1.4). En effet, celui-ci n'a jamais permis d'atteindre les objectifs que le Biodôme s'était fixés soit une concentration de nitrate inférieure à 20 mg N-NO₃⁻/L dans le SLM. Cette concentration est d'ailleurs en accord avec l'étude de Camargo et al. (2005) qui indique que le niveau de nitrate doit être inférieur à 20 mg N-NO₃⁻/L en milieu marin afin de protéger les invertébrés et les poissons contre l'effet toxique du nitrate.

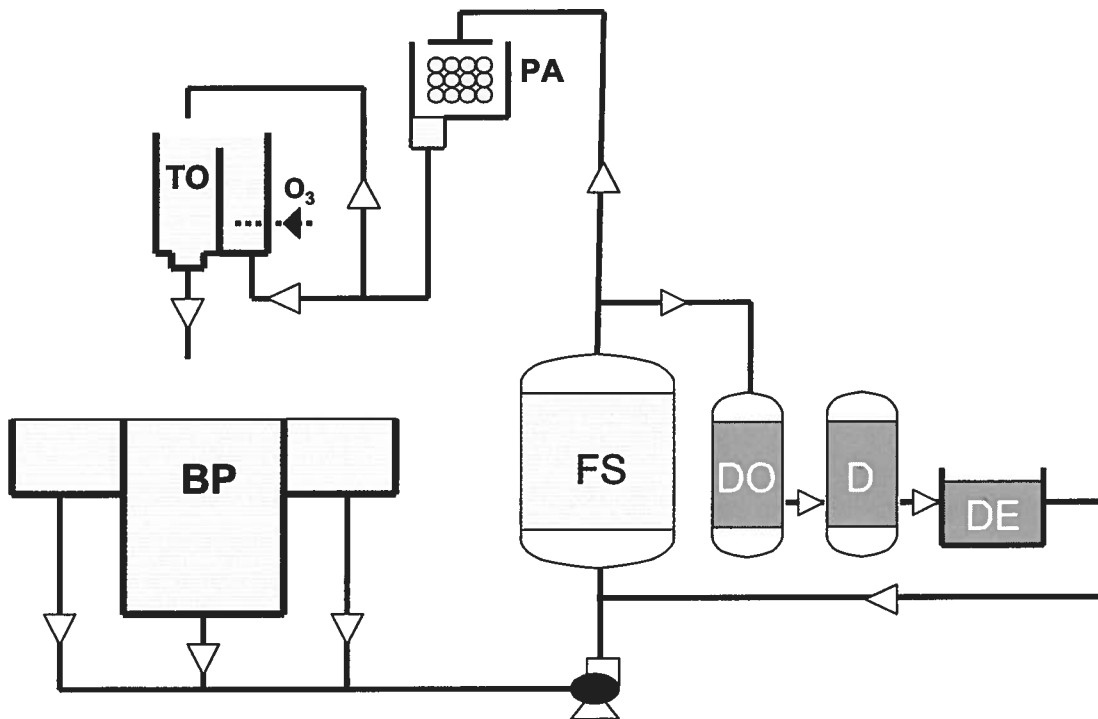


Figure 1.2. Schéma du système de traitement principal de l'eau du SLM suite à l'intégration du système de dénitrification. (BP) Bassin principal : Baie, Bassin médical et littoral rocheux, (FS) Filtrés à sable, (PA) Percolateur aérobique (nitrificateur), (TO) Système d'ozonation, (DO) Désoxygénateur, (D) Dénitrificateur et (DE) Décanteur. Les flèches indiquent le sens de la circulation de l'eau. Le schéma n'est pas à l'échelle.

A**B**

Figure 1.3. Photos du système de dénitrification du Biodôme de Montréal. (A) Désoxygénateur (à droite) et dénitrificateur (à gauche); (B) Photo d'une biobille de type Bioflow 9[®] sur laquelle s'est développé un biofilm.

1.4. Présentation du projet de recherche et des objectifs de la thèse

Depuis 2000, le laboratoire du Pr. Villemur étudie le biofilm dénitrifiant dans l'optique globale d'acquérir des connaissances sur la microbiologie du système et d'appliquer ces connaissances à l'amélioration des performances de dénitrification. D'une part, les travaux réalisés ont mis en évidence la disponibilité des métaux traces dans l'eau de mer artificielle comme facteur limitant l'activité des métalloenzymes impliquées dans la réaction de dénitrification (Labbé et al., 2003b). Les modifications apportées au système ont permis d'améliorer les performances de dénitrification sans toutefois permettre l'atteinte de l'objectif de 20 mg N-NO₃⁻/L fixé par le Biodôme de Montréal. Deux fois par jour, 370 mg FeSO₄*7H₂O, 130 mg MnSO₄*4H₂O et 20 mg CuSO₄*5H₂O sont ajoutés au système de dénitrification pour améliorer le taux de dénitrification (Labbé et al., 2003b). Le taux de dénitrification varie entre 200 et 300 g N-NO_x/ jour, ce qui a permis de maintenir la concentration de nitrate autour de 50 mg N-NO₃⁻/L suite à un important renouvellement de l'eau de mer artificielle dans le bassin du SLM (Figure 1.4).

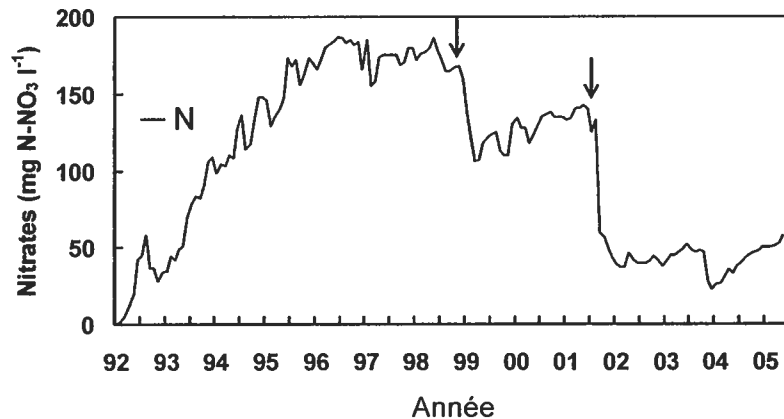


Figure 1.4. Évolution de la concentration de nitrate dans l'eau du Saint-Laurent Marin. Les flèches correspondent aux moments où un renouvellement de l'eau de mer artificielle à été réalisé.

Différentes études ont également mis en évidence la complexité du biofilm dénitrifiant. Par analyse du gène codant l'ARN ribosomal (ARNr) 16S, il a été démontré qu'une quinzaine d'espèces bactériennes parmi les plus abondantes sont présentes dans le biofilm, dont des bactéries affiliées aux genres *Methylophaga* et *Hyphomicrobium* (Labbé et al., 2003a). Également, les souches NL23 et NL21 ont été isolées à partir du biofilm. La souche NL23 est affiliée à *Hyphomicrobium zavarzinii* qui est une bactérie dénitrifiante. La souche NL21, *Nitratireductor aquibiodomus*, correspond à un nouveau genre bactérien et est capable de réduire le nitrate en nitrite seulement (Labbé et al., 2004). Une quantification des populations bactériennes ayant colonisées des lames à microscopie, placées dans la partie supérieure du réacteur de dénitrification, a été réalisée à l'aide de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Ces travaux ont révélé que les *Methylophaga* sp. et les *Hyphomicrobium* sp. représentent de 36 à 79% et de 7 à 8% de la population totale du biofilm, respectivement (Labbé et al., 2007). Ces études ont fourni une description des populations microbiennes présentes. Cependant, peu d'indices sur la fonctionnalité de ces populations ont été apportés.

Le présent programme de recherche a été entrepris dans le but de déterminer la fonctionnalité des populations présentes dans le biofilm. En effet, parmi les microorganismes que nous avons répertoriés, lesquels sont directement impliqués dans la dénitrification? Une approche combinant à la fois des méthodes dépendantes et indépendantes de la culture a été employée afin de réaliser les objectifs spécifiques de ce projet de recherche. Ces objectifs consistaient à :

- Identifier les microorganismes responsables de la consommation du méthanol dans le biofilm sous conditions dénitrifiantes.
- Identifier et quantifier la diversité fonctionnelle dénitrifiante dans le biofilm.
- Parmi les microorganismes dénitrifiants identifiés, déterminer ceux qui sont actifs dans les conditions d'opération du réacteur.

Bien que ce projet de recherche soit dans un premier temps appliqué à la problématique du Biodôme de Montréal, le biofilm constitue un modèle pour l'étude de la dénitrification appliquée au traitement d'effluents salés contaminés par des nitrates. Il est important d'approfondir nos connaissances sur l'écologie des populations bactériennes dans ces procédés pour mettre en œuvre des systèmes efficaces de dénitrification de l'eau salée.

1.5. Présentation de la thèse

Cette thèse est présentée sous forme d'articles scientifiques conformément aux exigences de l'INRS et du programme de doctorat en Biologie. La section 2 de ce document consiste en une revue exhaustive de la littérature dont la majeure partie est axée sur la dénitrification. Les résultats obtenus au cours de ce programme de recherche sont ensuite décrits, dans la section 3, dans les différents articles publiés ou soumis pour publication. Une discussion sur l'ensemble des résultats obtenus ainsi que des perspectives sur le projet de recherche sont finalement présentées à la section 4.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2.1. Le nitrate

2.1.1. Origine et présence dans l'environnement

En plus d'être le composé majoritaire de l'atmosphère terrestre (78%), l'azote fait partie intégrante des organismes vivants. Il est nécessaire à la synthèse de molécules telles que les acides nucléiques, les acides aminés, la porphyrine et les sucres aminés. Malgré son abondance dans l'atmosphère, la plupart des organismes, à l'exception de certains microorganismes capables de fixer l'azote, ne peuvent utiliser directement l'azote moléculaire (N_2) de l'atmosphère pour la synthèse de ces molécules. L'ammonium (NH_4^+ : forme ionisée de l'ammoniac (NH_3)), le nitrite (NO_2^-) et le nitrate (NO_3^-) sont les principales formes d'azote réactif dans les écosystèmes aquatiques. Ils y sont naturellement présents en raison, entre autres, de la fixation de l'azote, de la déposition atmosphérique et de la dégradation de la matière organique (Brandes et al., 2007). Le nitrate est généralement retrouvé en plus grande concentration due à la transformation de l'ammonium et du nitrite en nitrate par les bactéries nitrifiantes.

Au cours du dernier siècle, les besoins alimentaires croissants de la population mondiale ont mené à un engouement pour l'utilisation, dans le secteur agricole, de fertilisants à base d'azote. Ceux-ci sont entraînés dans les écosystèmes aquatiques par lessivage. En effet, le nitrate est une molécule hautement soluble qui diffuse rapidement dans les eaux de surface et souterraines. De plus, l'industrialisation a provoqué une augmentation de l'utilisation des combustibles fossiles. Lorsque brûlés, les combustibles fossiles relâchent dans l'atmosphère des oxydes d'azote qui sont ensuite déposés dans les écosystèmes terrestres et aquatiques par la pluie et la neige. Depuis 1970, la production d'azote réactif, de source anthropique, a augmenté de 120% et cette production continue d'augmenter année après année (Galloway et al., 2008). Cet apport croissant en azote anthropique a mené à une perturbation du cycle biogéochimique de l'azote.

De manière naturelle, le nitrate est présent à une concentration inférieure à 3 mg $N-NO_3^-$ /L dans les eaux souterraines (Smith et al., 1987). Une concentration supérieure à 3 mg $N-NO_3^-$ /L reflète habituellement une contamination due à l'activité humaine. Actuellement, en raison de l'apport anthropique, des concentrations de nitrate supérieures à 3 mg $N-NO_3^-$ /L sont fréquemment rencontrées dans les eaux souterraines à travers le monde (Babiker et al., 2004; Shomar et al., 2008; Alabdula'aly et al., 2010; Puckett et al., 2011). Des concentrations de nitrate

supérieures à 400 mg/L ont été rapportées en Inde comme une conséquence de l'utilisation intensive de fertilisants à base d'azote (Agrawal et al., 1999). D'autre part, dans les systèmes opérés en circuit fermé, utilisant des procédés de nitrification, comme les aquariums publics ou les bassins d'aquaculture, la concentration de nitrate augmente rapidement et peut atteindre plus de 100 mg N-NO₃⁻/L (Grguric et al., 2000; Parent and Morin, 2000).

2.1.2. Toxicité du nitrate

Il est reconnu que le nitrate est moins toxique que l'ammoniac et le nitrite, l'ordre de toxicité étant ammoniac > nitrite > nitrate. Cependant, à forte concentration, le nitrate est néfaste pour la santé et est également impliqué dans la dégradation des écosystèmes aquatiques.

Chez l'humain, en particulier chez les nouveaux-nés, la toxicité du nitrate vient principalement de sa transformation en nitrite par les bactéries anaérobies présentes dans le système digestif. Le nitrite ainsi produit provoque l'oxydation du fer réduit (Fe²⁺) de l'hémoglobine résultant en la formation de méthémoglobine (Fe³⁺). Sous sa forme oxydée le fer perd sa capacité à lier l'oxygène. Ceci a pour conséquence une diminution de l'apport en oxygène dans le sang et de ce fait, une diminution du transport de l'oxygène vers les cellules de l'organisme (Greer and Shannon, 2005). La méthémoglobinémie est rare de nos jours en raison de l'application des normes de contrôle du taux de nitrate dans l'eau potable. Au Canada comme aux États-Unis, les agences de santé publique ont fixé à 10 mg N-NO₃⁻/L, soit environ 45 mg/L de NO₃⁻, la concentration maximale acceptable de nitrate dans l'eau potable (Groupe scientifique sur l'eau, 2003).

Cette transformation des molécules permettant le transport de l'oxygène (hémoglobine et hémocyanine) en une forme incapable de fixer l'oxygène (méthémoglobine et méthémocyanine) constitue également la principale cause de toxicité du nitrate chez les organismes aquatiques (Muir et al., 1991; Cheng and Chen, 2002). Une concentration élevée de méthémoglobine a été démontrée comme étant responsable d'une diminution des performances de nage chez le saumon (Brauner et al., 1993). Camargo et al. (2005) ont observé qu'une exposition prolongée au nitrate est responsable d'une altération des mouvements et d'une augmentation de la mortalité chez certaines espèces d'invertébrés. Des concentrations de nitrate inférieures à 10 mg N-NO₃⁻/L en eau douce et à 20 mg N-NO₃⁻/L en milieu marin ont été recommandées afin de protéger les invertébrés et les poissons contre les effets toxiques du nitrate (Camargo et al., 2005).

Il est reconnu depuis plusieurs années que l'azote et le phosphate jouent un rôle important dans l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques. Le phosphate a été démontré comme étant le facteur limitant la production primaire dans les écosystèmes d'eau douce (Schindler, 1974). De son côté, l'azote a été reconnu comme étant le principal responsable de l'eutrophisation au niveau des écosystèmes marins côtiers et estuariens (Ryther and Dunstan, 1971; Howarth and Marino, 2006). Une augmentation de la concentration d'azote, sous forme de NH_4^+ , de NO_2^- ou de NO_3^- , dans ces écosystèmes résulte en une augmentation de la croissance des algues et phytoplanctons. Ceci a pour conséquence d'augmenter la turbidité de l'eau limitant ainsi la pénétration de la lumière et, par le fait même, l'activité photosynthétique. De plus, la décomposition subséquente de ces algues provoque une augmentation de la concentration de matières organiques, favorisant à son tour le développement de bactéries hétérotrophes aérobies. Ces bactéries consomment l'oxygène dissous dans l'eau créant ainsi des zones hypoxiques non propices au développement et à la survie des organismes aquatiques tels que les poissons et les invertébrés (Camargo and Alonso, 2006). De plus, la présence de ces zones hypoxiques favorise l'utilisation du sulfate par les bactéries sulfato-réductrices ce qui mène à la production de sulfure d'hydrogène, un composé hautement toxique (Castro et al., 2002; Camargo and Alonso, 2006; Reese et al., 2008). D'autre part, les algues, dont certaines espèces de cyanobactéries, de dinoflagellés et de diatomées, produisent des toxines qui peuvent être relâchées dans le milieu environnant lors de la croissance ou suite à la lyse cellulaire. Ces toxines affectent les organismes aquatiques et peuvent être transmises au niveau de la chaîne trophique (Xie et al., 2005; Kopp et al., 2011; Lurling et al., 2011).

2.2. Le cycle de l'azote : les transformations du nitrate dans l'environnement

Dans l'environnement, les concentrations de nitrate sont principalement régulées par le cycle de l'azote (Figure 2.1). La nitrification mène à la formation de nitrate à partir de l'ammonium. La dissimilation de l'azote est réalisée lors des processus de dénitrification, d'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox) et d'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification lesquels mènent à la transformation du nitrate, ou du nitrite, en N_2 , permettant ainsi le retour de l'azote inorganique à l'atmosphère. La réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA) est également un procédé de dissimilation de l'azote où, cependant, le nitrate est converti en ammonium. Dans les pages qui suivent, la nitrification, l'anammox,

l'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification et la DNRA seront brièvement décrites. Une attention particulière sera ensuite portée sur la dénitrification qui constitue le sujet principal de la thèse. Les informations fournies sur la dénitrification concernent majoritairement les bactéries à Gram négatif chez qui la dénitrification a été principalement étudiée.

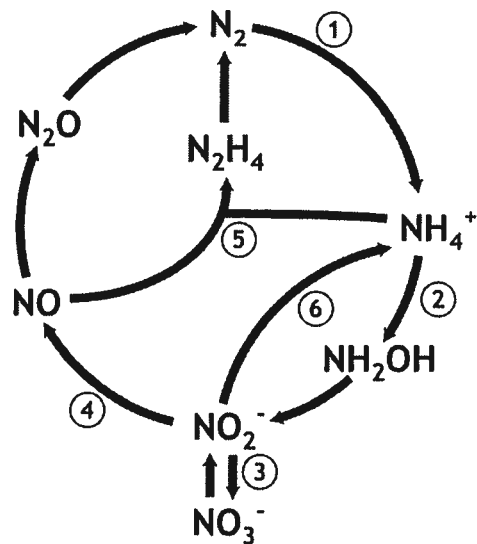


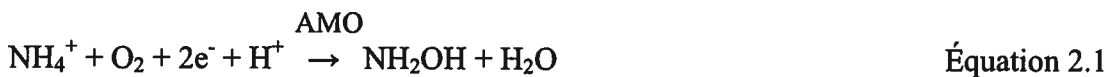
Figure 2.1. Cycle de l'azote. Réactions microbiennes impliquées dans la biogéochimie de l'azote. (1) Fixation de l'azote; (2) Oxydation aérobie de l'ammonium; (3) Oxydation aérobie du nitrite; (4) Dénitrification; (5) Oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox); (6) Réduction dissimilatrice du nitrate et du nitrite en ammonium (DNRA). La réaction globale représentée par 2 et 3 correspond à la nitrification. La réaction d'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification n'est pas représentée sur le schéma, voir la figure 2.2. Tirée de Jetten (2008).

2.2.1. La nitrification

La nitrification est l'oxydation du NH_4^+ en NO_3^- par l'intermédiaire du NO_2^- (Suzuki et al., 1974). Cette réaction est d'une grande importance car elle prévient l'accumulation d'ammoniac à des concentrations toxiques pour la faune. La nitrification est réalisée par des bactéries chimio-autotrophes. Ces microorganismes tirent leur énergie de l'oxydation d'un substrat inorganique tel l'ammonium et leur source de carbone de la matière inorganique telle le dioxyde de carbone (CO_2). Deux groupes de bactéries sont responsables de la nitrification. D'une part, il y a les bactéries nitreuses (AOB : ammonia-oxidizing bacteria) qui oxydent le NH_4^+ en NO_2^- . Parmi celles-ci, il y a les bactéries affiliées aux genres *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibro* (Harms et al., 1976; Prosser, 1989). D'autre part, il y a les bactéries nitrifiantes (NOB : nitrite-oxidizing bacteria) qui oxydent le NO_2^- en NO_3^- . Les NOB

sont affiliées aux genres *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* et *Nitrospina*. (Prosser, 1989). Récemment, une étude a amené les premières évidences de l'oxydation de l'ammonium en nitrite, chez les Archaea (AOA : ammonia-oxidizing Archaea) (Konneke et al., 2005). Les AOA sont largement répandues dans les environnements marins et dans les sols suggérant leur importance dans le cycle biogéochimique de l'azote (Francis et al., 2005; Leininger et al., 2006).

L'oxydation du NH_4^+ en NO_2^- par les AOB est réalisée en deux étapes. Tout d'abord, l'enzyme membranaire ammonium monooxygénase (AMO) catalyse l'oxydation du NH_4^+ en hydroxylamine (NH_2OH), un intermédiaire réactionnel (Équation 2.1). Ensuite, le NH_2OH est oxydé en NO_2^- grâce à l'action de l'hydroxylamine oxydoréductase (HAO), une enzyme périplasmique. Cette dernière réaction relâche quatre électrons dont deux sont utilisés par l'AMO et les deux autres servent à créer un gradient de protons menant à la génération d'énergie (Équation 2.2) (Richardson and Watmough, 1999; Kowalchuk and Stephen, 2001).



L'oxydation du NO_2^- en NO_3^- par les NOB est réalisée par la nitrite oxydoréductase (NXR) (Équation 2.3). Cette enzyme est réversible du fait qu'elle peut oxyder le NO_2^- en NO_3^- ou réduire le NO_3^- en NO_2^- (Prosser, 1989). Ces réactions utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons et donc ont lieu de manière générale qu'en présence d'oxygène. De plus, le peu d'énergie obtenue de la nitrification résulte en une croissance lente de ces microorganismes.



Schmidt et Bock (Schmidt and Bock, 1997) ont mis en évidence la capacité de *Nitrosomonas eutropha* à oxyder l'ammonium sous conditions anoxiques. En culture pure, *N. eutropha* oxyde le NH_4^+ en anaérobie lorsque le milieu est supplémenté avec du dioxyde d'azote et du CO_2 . Ceci résulte en une diminution du NH_4^+ et une production de NO_2^- . Simultanément, *N. eutropha* converti le NO_2^- en N_2 par dénitrification. L'activité d'oxydation du NH_4^+ observée en anaérobie chez *N. eutropha* est cependant dix fois inférieure à celle observée en aérobie.

2.2.2. Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium

La réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA) est un processus microbien survenant en conditions anaérobies dans lequel le NO_3^- est dans un premier temps converti en NO_2^- et ensuite en NH_4^+ (Équations 2.4 et 2.5). La DNRA a été décrite comme un « court circuit » dans le cycle de l'azote en raison du fait qu'elle permet de conserver l'azote au niveau des écosystèmes en ne passant ni par la dénitrification ni par la fixation de l'azote (Cole and Brown, 1980). Ce processus est favorisé, contrairement à la dénitrification, en présence d'un ratio C/ NO_3^- élevé, lorsque le nitrate devient limitant (Tiedje et al., 1982).

La DNRA a été observée chez des bactéries à Gram négatif affiliées aux Gamma-, Delta- et Epsilon-Protéobactéries ainsi que chez des bactéries à Gram positif (Bonin, 1996; Hoffmann et al., 1998; Simon, 2002; Eschbach et al., 2003). La première étape, soit la conversion du nitrate en nitrite, est réalisée par une nitrate réductase commune tant à la DNRA qu'à la dénitrification. La nitrate réductase périplasmique (Nap) est responsable de la réduction du NO_3^- en NO_2^- chez *Wolinella succinogenes* et d'autres Epsilon-Protéobactéries (Kern and Simon, 2009). Chez *Shewanella oneidensis* MR-1, une Gamma-Protéobactérie, Nap a également été démontrée responsable de l'activité de réduction du nitrate (Cruz-Garcia et al., 2007). La transformation du NO_2^- en NH_4^+ est réalisée par la cytochrome *c* nitrite réductase (NrfA) qui diffère des nitrite réductases de la dénitrification (Équation 2.5) (Einsle et al., 1999).

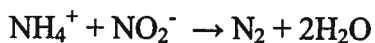


Les processus de DNRA et de dénitrification semblent mutuellement exclusifs. En effet, aucun microorganisme étant capable de réaliser la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium et la dénitrification n'a été identifié.

2.2.3. Oxydation anaérobie de l'ammonium

Les premières évidences de l'oxydation de l'ammonium en anaérobie (anammox) ont été apportées suite à l'observation d'une disparition de NH_4^+ conjointe à une disparition de NO_3^- dans un réacteur effectuant de la dénitrification biologique. Il avait été alors postulé que le NH_4^+ servait de donneur d'électrons pour la réduction du NO_3^- . van de Graaf et al. (1995) ont démontré

par l'utilisation d'isotopes stables (ammonium [^{15}N]) que le NH_4^+ était converti en N_2 et que le NO_2^- était l'accepteur d'électrons préférentiel de cette réaction. Suite à cette étude, la réaction anammox a été définie comme étant la conversion du NH_4^+ et du NO_2^- en N_2 , un atome d'azote provenant de l'ammonium et l'autre du nitrite (Équation 2.6). Des études ont démontré que le processus était inhibé par la présence d'oxygène (Strous et al., 1997). Également, il semble que la réaction anammox soit inhibée par le carbone organique dissous (COD) (van de Graaf et al., 1996; Guven et al., 2005).



Équation 2.6

Par l'analyse morphologique et l'analyse du gène de l'ARNr 16S, il a été montré que des bactéries appartenant aux planctomycètes étaient responsables de l'activité anammox (Strous et al., 1999a). Jusqu'ici quatre genres bactériens affiliés aux planctomycètes pouvant effectuer l'oxydation anaérobie de l'ammonium ont été identifiés, soit *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua*, *Anammoxoglobus* (Strous et al., 1999a; Schmid et al., 2003; Kartal et al., 2007).

Jusqu'à maintenant différents mécanismes de la réaction anammox ont été proposés. Dans le premier mécanisme proposé, le NH_4^+ et le NH_2OH sont combinés, grâce à l'action d'une hydrazine hydrolase, pour former l'hydrazine (N_2H_4). Le N_2H_4 est ensuite converti en N_2 par une hydrazine oxydase résultant en la génération de quatre équivalents réducteurs. Ces équivalents réducteurs sont utilisés pour réduire le NO_2^- en NH_2OH par l'action d'une nitrite réductase et pour la génération d'énergie (van de Graaf et al., 1997). Le séquençage du génome de "*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*" a permis la détection de neuf gènes codant pour des protéines affiliées aux hydroxylamine oxydoréductases (HAO) ainsi que des gènes codant pour la nitrate réductase membranaire (*narGH*) et la nitrite réductase (*nirS*). Sur la base des gènes trouvés chez "*Candidatus K. stuttgartiensis*", les auteurs proposent un nouveau modèle théorique de la réaction anammox. Dans ce mécanisme, la nitrite réductase converti le NO_2^- en oxyde nitrique (NO). Par la suite, l'intermédiaire N_2H_4 est formé à partir du NH_4^+ et du NO sous l'action d'une hydrazine hydrolase. Le N_2H_4 est finalement oxydé en N_2 par la HAO, produisant quatre équivalents réducteurs pour la production d'énergie (Strous et al., 2006). Dans ce mécanisme, le NO est impliqué comme intermédiaire au lieu du NH_2OH . Toutefois, plusieurs études supportent l'implication du NH_2OH comme intermédiaire de la réaction anammox (Schalk et al., 1998;

Schmid et al., 2003). Actuellement, le mécanisme de réduction du nitrite dans la réaction anammox est encore question à débat et aucun consensus commun n'a été trouvé.

2.2.4. Oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification

Un nouveau processus du cycle de l'azote, nommé oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification, a été découvert récemment et la recherche n'en est qu'à ces débuts dans la caractérisation de ce processus. Les premières évidences de l'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification ont été apportées par l'observation de la capacité d'un consortium microbien à oxyder le méthane en CO_2 en absence complète d'oxygène, sous conditions de dénitrification (Raghoebarsing et al., 2006). Dans cette réaction, la disparition du méthane est accompagnée par la production de N_2 issue de la consommation du nitrate ou du nitrite par dénitrification, le nitrite étant utilisé de façon préférentielle au nitrate. Les auteurs de cette étude ont également démontré, par le biais d'analyses moléculaires, que ce consortium était composé de deux groupes de microorganismes; une espèce bactérienne présente à environ 80% et appartenant à un phylum (NC10) n'ayant pas de représentant en culture pure ainsi qu'un Archaea présent à environ 10% et appartenant à l'ordre des Methanosarcinales. Les auteurs suggèrent alors l'hypothèse que l'oxydation du méthane est réalisée par les Archaea en association avec les bactéries dénitrifiantes.

Il a cependant été démontré, par la suite, que les bactéries du phylum NC10 ont la capacité d'oxyder le méthane en anaérobie dans un consortium où l'activité enzymatique des Archaea a été inhibée (Ettwig et al., 2008). L'analyse du génome de cette bactérie, nommée « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* », a permis de mettre en évidence la présence de gènes de dénitrification. Parmi ceux-ci, il y a les gènes *narGHJI* et *napAB* codant pour la nitrate reductase membranaire et la nitrate reductase periplasmique, respectivement, impliquées dans la réduction du NO_3^- en NO_2^- , les gènes *nirSJFD/GH/L* codant pour une nitrite reductase responsable de la réduction du NO_2^- en NO et le gène *qnorB* codant pour une oxyde nitrique réductase transformant le NO en oxyde nitreux (N_2O). Cependant, les gènes *nosZDFY* codant l'enzyme responsable de la réduction du N_2O en N_2 n'ont pas été détectés dans le génome de « *Candidatus M. oxyfera* » (Ettwig et al., 2010). Ils ont observé également que « *Candidatus M. oxyfera* » possède les gènes codant pour la totalité des enzymes constituant la voie de l'oxydation aérobie du méthane, dont

les gènes *pmoCAB* codant l'enzyme méthane monooxygénase impliquée dans l'oxydation du méthane en méthanol. Ces gènes ont été démontrés comme étant exprimés en anaérobie.

Les résultats des analyses génomiques ont mené les auteurs à proposer un mécanisme pour l'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification (Figure 2.2). Dans ce mécanisme, le NO_2^- est réduit en NO sous l'action de la nitrite réductase codée par les gènes *nirSJF/D/GH/L*. Deux molécules de NO sont ensuite converties en N_2 et en O_2 sous l'action d'une NO dismutase hypothétique. L'oxygène ainsi produit est alors disponible pour oxyder le méthane expliquant ainsi la présence des gènes codant pour les enzymes de la voie d'oxydation aérobie du méthane.

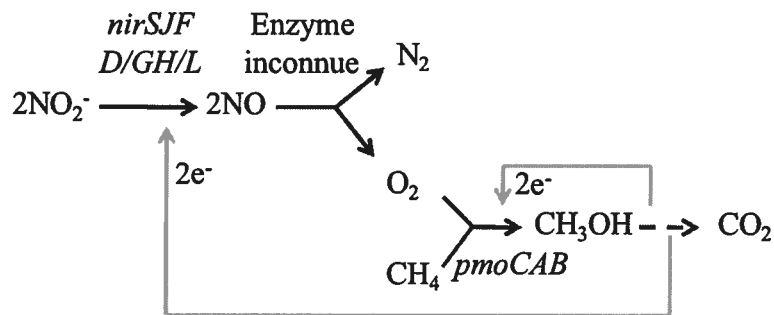


Figure 2.2. Mécanisme de la réaction d'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification. Modifiée de Ettwig et al. (2010).

Jusqu'à maintenant des bactéries appartenant au phylum NC10 ont été détectées dans divers écosystèmes d'eau douce (Ettwig et al., 2009). Bien qu'aucune donnée n'ait été fournie quant à la contribution de ces microorganismes à la dissimilation de l'azote dans l'environnement, il est possible de penser qu'ils pourraient jouer un rôle important dans le cycle biogéochimique de l'azote.

2.3. La dénitrification

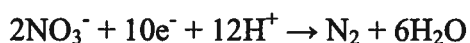
La dénitrification a été découverte il y a plus d'un siècle maintenant par R. A. Smith qui a observé, en 1867, une perte systématique de nitrate dans l'eau. En 1882, Dehérain et Maquenne ont observé l'influence de la présence d'une concentration élevée de matière organique et d'une absence d'oxygène sur la réduction du nitrate dans le sol. La même année, le terme « dénitrification » a été proposé par Gayon et Dupetit. Quelques années plus tard, en 1886, Gayon et Dupetit isolent les premiers microorganismes capables de dénitrifier amenant ainsi les preuves

de l'origine biologique de la dénitrification (Payne, 1981). Depuis sa découverte, la dénitrification a été largement étudiée et est maintenant reconnue comme étant ubiquitaire et jouant un rôle majeur dans le cycle biogéochimique de l'azote tant au niveau des sols que des écosystèmes aquatiques.

La dénitrification est un processus respiratoire alternatif dans lequel les microorganismes utilisent les oxydes d'azote comme accepteurs finaux d'électrons (Knowles, 1982). Ce processus a pour résultat de transformer l'azote de sa forme la plus oxydée, le NO_3^- , en N_2 en passant par le NO_2^- , le NO et le N_2O selon le schéma réactionnel suivant : $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$. Ces réactions sont catalysées par différentes métalloenzymes, soit la nitrate réductase, la nitrite réductase, l'oxyde nitrique réductase et l'oxyde nitreux réductase. La réduction du NO_3^- en N_2 est couplée à la synthèse d'ATP par l'intermédiaire de la chaîne de transport des électrons. Les quatre réactions de la dénitrification possèdent des potentiels d'oxydoréduction, supérieurs à 0.35V, permettant la conservation d'énergie (Tableau 2.1.) (Payne, 2001). De ce fait, l'ensemble de ces quatre réactions n'est pas nécessaire pour avoir une conservation nette d'énergie et supporter la croissance. D'ailleurs, plusieurs microorganismes possèdent des voies de dénitrification tronquées ne réalisant, par exemple, que la première étape de la dénitrification ou dénitrifiant jusqu'au N_2O (Casella et al., 2006; Jones et al., 2008).

Tableau 2.1. Équations et potentiels d'oxydoréduction (E_0') des réactions de la dénitrification. Selon Tavares et al. (Tavares et al., 2006) et Payne (Payne, 2001).

Réaction globale :



Réactions de la dénitrification :	E_0' (Volts) :
$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	+ 0.43
$\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	+ 0.36
$2\text{NO} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	+ 1.18
$\text{N}_2\text{O} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	+ 1.36

2.3.1. Importance environnementale de la dénitrification

La dénitrification joue un rôle majeur dans la dissimilation de l'azote réactif en N_2 permettant ainsi son retour à l'atmosphère. Ce processus est d'autant plus important aujourd'hui puisqu'il permet de réduire les effets néfastes de l'apport croissant d'azote anthropique sur les écosystèmes aquatiques ou terrestres. Jusqu'à ces dernières années la dénitrification était d'ailleurs considérée comme étant le seul processus biologique permettant la dissimilation de l'azote. Cependant, la découverte du processus anammox a amené les scientifiques à reconnaître la contribution d'une autre réaction à la dissimilation de l'azote complexifiant, par le fait même, le cycle biogéochimique de l'azote (van de Graaf et al., 1995). Tel que mentionné précédemment, l'anammox est défini comme étant la conversion du NH_4^+ et du NO_2^- en N_2 en absence d'oxygène. Il a été démontré que l'anammox est le processus dominant responsable de la production de N_2 au niveau de la zone de minimum d'oxygène (OMZ- oxygen minimum zone) située au sud-est de l'océan Pacifique Tropical (Thamdrup et al., 2006; Hamersley et al., 2007). Malgré la découverte du processus anammox, la dénitrification demeure un acteur principal dans la dissimilation de l'azote tant au niveau des océans, des estuaires, des lacs, des rivières et des sols (Galloway et al., 2004). Ward et al. (2009) ont mis en évidence, par l'utilisation de méthodes de marquage isotopique, que la production de N_2 dans l'OMZ de la mer d'Arabie, soit la plus grande OMZ océanique, était majoritairement due à la dénitrification. Rich et al. (2008) ont évalué la production de N_2 attribuable à la dénitrification et à l'anammox à différents endroits de la baie de Chesapeake, le plus grand estuaire des États-Unis. Ils ont observé que la dénitrification était ubiquitaire dans l'écosystème de la baie de Chesapeake. L'anammox était responsable de 0 à 22% de la production de N_2 , la majorité étant attribuable à la dénitrification.

Une attention particulière a été apportée à la dénitrification au cours des dernières années en raison de son impact sur la réduction de la couche d'ozone et sur le réchauffement climatique. Le N_2O , intermédiaire de la réaction de dénitrification, est un gaz à effet de serre. De ce fait, une dénitrification incomplète peut mener à l'émission de N_2O . Par exemple, les bactéries du genre *Streptomyces*, retrouvées de façon abondante dans les sols, dénitrifient jusqu'au N_2O (Shoun et al., 1998). Les organismes possédant des voies de dénitrification tronquées au niveau de l'oxyde nitreux réductase contribuent, de ce fait, à l'augmentation des émissions de N_2O dans l'atmosphère et donc à l'augmentation de l'effet de serre. Bien que le N_2O se retrouve en faible concentration dans l'atmosphère, son potentiel de réchauffement global est 298 fois plus

important que celui du CO₂ (Forster et al., 2007). Plus du deux tiers du N₂O émis naturellement provient des processus de nitrification et dénitrification qui surviennent dans les sols, le reste étant attribuable aux océans (Folland et al., 2001). Le N₂O est un sous-produit de la première étape de la nitrification (Jiang and Bakken, 1999). L'émission de N₂O a augmenté au cours des dernières années en raison des activités humaines qui sont à l'origine de près du tiers des émissions actuelles de N₂O (Folland et al., 2001). Cependant, très peu de données sont disponibles quant à la contribution des processus de nitrification et dénitrification à l'émission de N₂O. De 0 à 14% de la charge en azote est transformée en N₂O dans les systèmes de traitement des eaux usées et la dénitrification hétérotrophe est responsable de 17 à 42% de cette production (Kampschreur et al., 2009). D'autre part, la dénitrification a été démontrée comme étant majoritairement responsable de la production de N₂O dans des sédiments de mangroves retrouvés dans les estuaires des fleuves Mandova et Chapora en Inde (Fernandes et al., 2010).

2.3.2. Les organismes dénitrifiants

L'habileté à utiliser les oxydes d'azote comme accepteurs alternatifs d'électrons lors de la respiration est un phénomène majoritairement retrouvé chez les procaryotes, bien qu'observé également chez certaines espèces de levures. Plus de 60 genres bactériens parmi les Protéobactéries, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* regroupent des espèces dénitrifiantes (Shapleigh, 2006). Chez les bactéries à Gram négatif, la dénitrification est principalement observée chez les Alpha-, Bêta-, Gamma- et Epsilon-Protéobactéries. Aucune espèce bactérienne affiliée aux Delta-Protéobactéries n'a été caractérisée comme étant dénitrifiante (Shapleigh, 2006). Bien que moins répandue que chez les bactéries à Gram négatif, la dénitrification a été observée chez un grand nombre de bactéries à Gram positif formant des endospores (*Bacillales* et *Actinomycetales*) ou non (Verbaendert et al., 2011). La dénitrification a aussi été observée chez quelques espèces parmi les Archaea dont l'hyperthermophile *Pyrobaculum aerophilum* (Volkl et al., 1993).

Certaines espèces de levures peuvent respirer les oxydes d'azote dont *Gibberella*, *Trichoderma*, *Chaciomhun*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon* (Shoun et al., 1992). Chez la levure le produit final de la dénitrification est généralement le N₂O en raison de l'absence de l'oxyde nitreux réductase. Il a été démontré chez *Fusarium oxysporum* et *Cylindrocarpon tonkinense* que la dénitrification est associée à la mitochondrie (Kobayashi et al., 1996). De plus,

une nitrite réductase contenant du cuivre, homologue à celle rencontrée chez les bactéries, a été détectée chez la levure suggérant que les systèmes de dénitrification bactériens et fongiques sont issus d'un ancêtre commun (Kim et al., 2009; Nakanishi et al., 2010).

En plus d'être retrouvée chez des microorganismes qui diffèrent grandement d'un point de vue taxonomique, la dénitrification est retrouvée chez des bactéries qui diffèrent au niveau métabolique. La dénitrification est principalement observée chez les bactéries hétérotrophes qui utilisent des substrats organiques comme source de carbone. Elle a également été observée chez des bactéries qui croissent de manière autotrophe. Dans la dénitrification autotrophe, l'hydrogène et le soufre sont utilisés comme donneurs d'électrons par les microorganismes autotrophes. Smith et al. (2005) ont démontré la capacité de *Rhodocyclus sp.* HOD 5 à éliminer le nitrate dans une eau contaminée en présence d'hydrogène comme donneur d'électrons et de CO₂ comme seule source de carbone. Brettar et al. (2006) ont montré l'implication d'une bactérie affiliée à *Thiomicrospira denitrificans* dans la réduction du nitrate couplée à l'oxydation de composés soufrés réduits.

La caractérisation de la flore microbienne du dénitrificateur du Biodôme de Montréal, par analyse du gène codant pour l'ARNr 16S et par des méthodes dépendantes de la culture, a mené à l'identification de plusieurs espèces bactériennes. Certaines de ces espèces sont affiliées à des espèces dénitrifiantes connues telles qu' *Hyphomicrobium zavarzinii*, *Paracoccus denitrificans* et *Thiomicrospira denitrificans*, appartenant aux Alpha et Epsilon-Protéobactéries (Labbé et al., 2003a). De plus, cette étude a permis l'identification d'un nouveau genre bactérien, nommé *Nitratreductor aquibiodomus* (Labbé et al., 2003a; Labbé et al., 2004). *N. aquibiodomus* est un bacille à Gram négatif appartenant à la sous-classe des Alpha-Protéobactéries. Elle peut croître dans un milieu contenant jusqu'à 5% de NaCl justifiant sa capacité à se développer dans le dénitrificateur dont la concentration en sels du milieu est de 3%. *N. aquibiodomus* est une bactérie aérobie facultative. Elle a la capacité de réduire le NO₃⁻ en NO₂⁻, en absence d'oxygène, l'utilisant comme accepteur d'électrons lors de la respiration, sans toutefois réduire le NO₂⁻ en N₂ (Labbé et al., 2004).

2.3.3. Les enzymes de la dénitrification

Tel que mentionné précédemment, les réactions de la dénitrification sont catalysées par différentes métalloenzymes, soit la nitrate réductase, la nitrite réductase, l'oxyde nitrique

réductase et l'oxyde nitreux réductase (Philippot, 2002). Chez les bactéries à Gram négatif, les enzymes de la dénitrification sont retrouvées au niveau de la membrane cytoplasmique et du périplasme. D'une part, il y a les enzymes membranaires parmi lesquelles sont retrouvées la nitrate réductase membranaire (Nar) et l'oxyde nitrique réductase (Nor). D'autre part, il y a les enzymes périplasmiques dont la nitrate réductase périplasmique (Nap), la nitrite réductase (Nir) ainsi que l'oxyde nitreux réductase (N₂Or). Les gènes codant pour les différentes réductases de la dénitrification sont présentés au tableau 2.2. Chez les bactéries à Gram positif, en raison d'un espace périplasmique étroit, l'ensemble des réductases de la dénitrification sont retrouvées en association avec la membrane (Suharti and de Vries, 2005).

2.3.3.1. Nitrate réductase

La capacité de réduire le NO₃⁻ en NO₂⁻ est retrouvée chez plusieurs microorganismes. Cette réduction peut être effectuée soit lors de l'assimilation de l'azote pour la biosynthèse des constituants cellulaires, soit lors de la respiration pour la production d'énergie, et ce, autant par les bactéries dénitrifiantes que par les bactéries réductrices de nitrate lesquelles réduisent le nitrate en nitrite seulement. Lors du processus respiratoire, la réduction du nitrate en nitrite peut être réalisée par deux types d'enzymes qui diffèrent au niveau de leurs localisations cellulaires, la nitrate réductase membranaire (Nar) et la nitrate réductase périplasmique (Nap) (Zumft, 1997). Cette aptitude à respirer le nitrate est largement répandue chez les bactéries. En effet, les analyses des séquences provenant d'espèces bactériennes isolées ou des projets de séquençage génomique a montré la présence de Nar chez les Archaea, les Actinobactéries, les Protéobactéries et les *Firmicutes*, et de Nap chez les Protéobactéries (Richardson et al., 2001; Philippot, 2002, 2005).

Des évidences supportant la coexistence de Nar et Nap ont été apportées par des études sur *Thiosphaera pantotropha*, reclassée *Paracoccus pantotrophus* (Rainey et al., 1999). En effet, l'étude des fractions cellulaires de *P. pantotrophus* a mis en évidence une activité nitrate réductase dans la fraction membranaire ainsi que dans la fraction périplasmique (Bell et al., 1990). De plus, l'analyse de 77 séquences génomiques procaryotes a montré la coexistence de ces enzymes chez *Rhodobacter spheroides*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella thyphimurium* (Richardson et al., 2001).

La nitrate réductase membranaire est constituée de trois sous-unités soit NarG, NarH et NarI (Figure 2.3A). La sous-unité NarG correspond au site actif de la protéine. Elle contient un

cofacteur molybdoptérine ainsi qu'un centre [4Fe-4S]. La sous-unité NarH contient trois centres [4Fe-4S] et un centre [3Fe-4S] impliqués dans le transfert des électrons. Les sous-unités NarG et NarH constituent le domaine cytoplasmique de l'enzyme. La sous-unité NarI est faite de deux hèmes de type *b* et est le domaine d'ancrage à la membrane. Cette dernière accepte les électrons d'un pool d'ubiquinol et les transfère via ses hèmes de type *b* à la sous-unité NarH qui achemine ensuite les électrons vers la sous-unité NarG, lieu de la réduction du nitrate (Philippot, 2002). Les sous-unités NarG, NarH et NarI sont codées par les gènes *narG*, *narH* et *narI*, respectivement, organisés en un opéron avec le gène *narJ* (Figure 2.3A). Ce dernier code pour une protéine chaperonne impliquée dans la maturation des sous-unités NarG et NarH ainsi que dans l'assemblage du complexe NarGHI (Sodergren et al., 1988; Dubourdieu and Demoss, 1992). Chez les bactéries à Gram négatif l'ensemble des gènes *nar* comprend également au moins une copie du gène *narK* qui code pour une protéine appartenant aux transporteurs de la superfamille des MFS (Major Facilitator Superfamily). NarK est impliquée dans le transport du nitrate et du nitrite à travers la membrane cytoplasmique (DeMoss and Hsu, 1991; Wood et al., 2002).

La nitrate réductase périplasmique est un hétérodimère constitué des sous-unités NapA et NapB codées par les gènes *napA* et *napB*, respectivement (Figure 2.3B). La sous-unité catalytique NapA contient un cofacteur molybdoptérine et un ensemble [4Fe-4S] alors que la sous-unité NapB est un cytochrome de type *c*. Cette dernière transmet les électrons en provenance d'un pool de quinol à la sous-unité NapA. Les gènes *napA* et *napB* font partie d'un opéron contenant également les gènes *napC* et *napD*. *napC* code pour un cytochrome de type *c* ancré à la membrane impliqué dans le transfert des électrons de la quinol vers la nitrate réductase périplasmique (Philippot, 2002). *napD* code pour une protéine cytoplasmique qui a été suggérée pour être impliquée dans la formation d'une nitrate réductase périplasmique mature (Berks et al., 1995; Reyes et al., 1998). Dépendamment de l'espèce bactérienne, cinq autres gènes *nap* soit *napE*, *napF*, *napG*, *napH* et *napK* peuvent être retrouvés selon différentes combinaisons (Figure 2.3B). Chez *Escherichia coli*, NapG et NapH forment une quinol déhydrogénase jouant un rôle dans le transfert des électrons de l'ubiquinol vers NapC (Brondijk et al., 2004). NapF est quant à elle impliquée dans l'assemblage du centre [4Fe-4S] de la sous-unité NapA (Olmo-Mira et al., 2004).

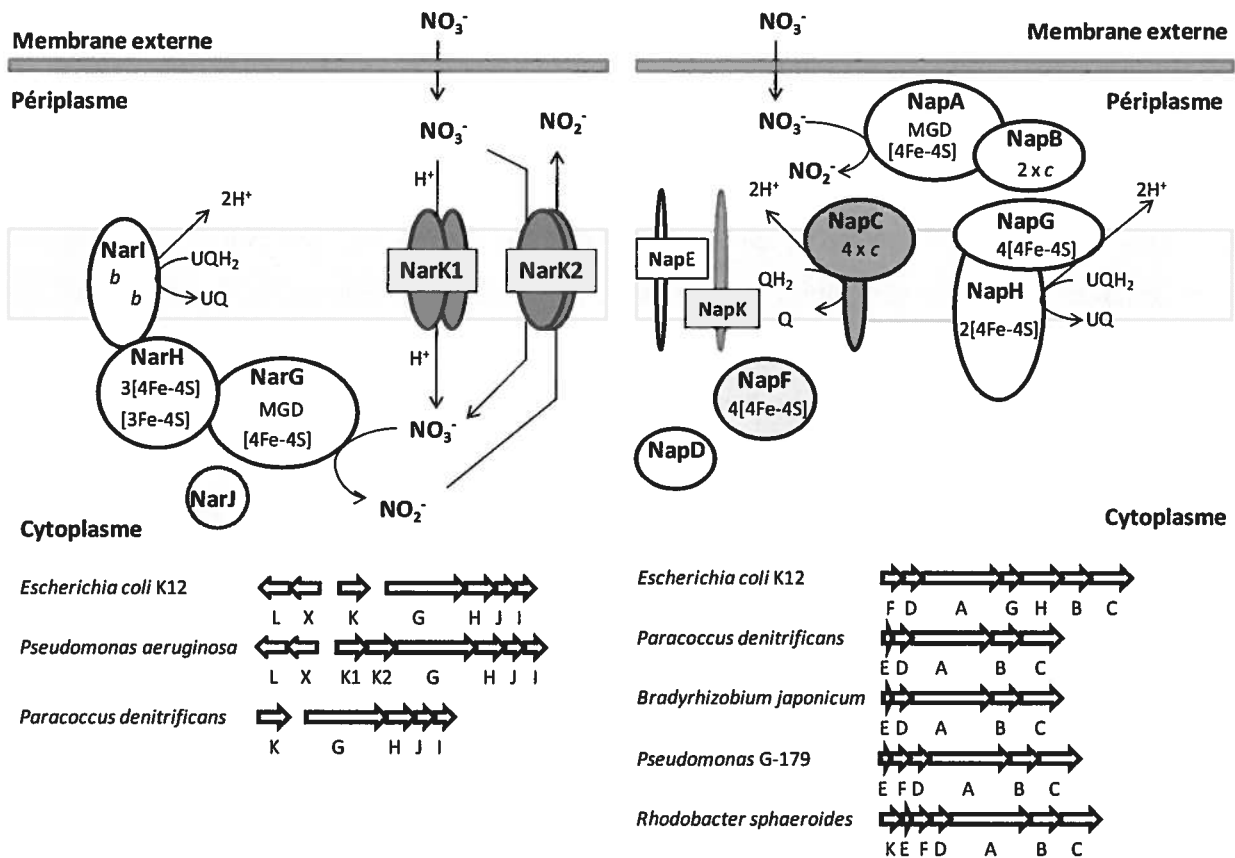


Figure 2.3. Protéines impliquées dans la réduction du nitrate en nitrite et organisation des gènes codant pour la nitrate réductase membranaire (A) et la nitrate réductase périplasmique (B). Modifiée de Richardson et al. (2001) et Gonzalez et al. (2006).

Bien que Nar soit reconnue pour son implication dans la respiration du nitrate, la fonction de Nap est moins bien établie. En effet, différentes fonctions ont été attribuées à la nitrate réductase périplasmique, et ce, dépendant de l'espèce bactérienne. Gavira et al. (2002) ont mis en évidence le rôle de Nap dans le maintien de l'équilibre redox cellulaire chez *Rhodobacter sphaeroides* par la dissipation de l'excès de réducteur. Ce rôle est également supporté par une augmentation de l'expression de Nap de *Paracoccus denitrificans* GB17 en présence de substrats réduits comparativement à son expression en présence de substrats oxydés (Richardson and Ferguson, 1992). Bell et al. (1990) ont, de leur côté, démontré que Nap était exprimée principalement lorsque *P. pantotrophus* était cultivée en conditions aérobies et était donc responsable de la réduction du nitrate observée en présence d'oxygène. D'autre part, le rôle de Nap dans la dénitrification anaérobie a été mis de l'avant, entre autres, chez *Pseudomonas* G-179 et *Bradyrhizobium japonicum* (Bedzyk et al., 1999; Delgado et al., 2003).

2.3.3.2. Nitrite réductase

La transformation du NO_2^- en NO est effectuée par la nitrite réductase. Elle constitue l'enzyme clé de la dénitrification en catalysant la première étape menant à un intermédiaire gazeux, distinguant ainsi les bactéries dénitrifiantes de celles qui ont seulement la capacité de réduire le nitrate en nitrite. Cette enzyme existe sous deux formes qui diffèrent au niveau de leurs cofacteurs soit la nitrite réductase contenant un cytochrome de type *cdI* (cdNir), soit la nitrite réductase contenant un cofacteur cuivre (CuNir) (Zumft, 1997). Cependant, cdNir et CuNir sont fonctionnellement équivalentes. Glockner et al. (1993) ont montré une restauration de l'activité de dénitrification suite à l'expression du gène codant pour CuNir de *Pseudomonas aureofaciens* chez un mutant *Pseudomonas stutzeri* où le gène codant pour cdNir avait été inactivé. Il semble, également, que cdNir et CuNir soient mutuellement exclusives pour une souche bactérienne donnée, même si les deux formes de l'enzyme peuvent être présentes chez des bactéries d'un même genre ou d'une même espèce (Coyne et al., 1989; Heylen et al., 2006). Ces enzymes sont retrouvées chez des bactéries appartenant à divers groupes taxonomiques (Zumft, 1997).

De manière générale, chez les bactéries à Gram négatif, cdNir ainsi que CuNir sont localisées dans l'espace périplasmique (Coyne et al., 1990). La seule exception connue est cdNir de *Thiobacillus denitrificans* qui est une enzyme membranaire (Hole et al., 1996). cdNir correspond à un homodimère dont chaque sous-unité contient un hème *c* et un hème *d₁*. L'hème *d₁* est le site de la réduction du nitrite alors que la fonction de l'hème *c* est de transférer les électrons vers le site actif. cdNir est codée par le gène *nirS* (Philippot, 2002). *nirS* fait partie d'un ensemble comprenant plusieurs gènes, dont la combinaison diffère selon l'espèce bactérienne, codant des protéines nécessaires à la synthèse d'une enzyme active. Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa* les gènes *nirFDLGHJEN* sont impliqués dans la biosynthèse de l'hème *d₁* alors que *nirM* code pour un cytochrome *c₅₅₁* ayant un rôle de donneur d'électrons (Arai et al., 1990; Kawasaki et al., 1997).

CuNir, codée par le gène *nirK*, est un homotrimère dont chaque monomère contient deux atomes de cuivre (Shapleigh, 2006). Très peu de données sont disponibles quant aux autres gènes nécessaires à la production d'une CuNir active. Le gène *nirV*, de fonction inconnue, a été démontré comme étant transcrit conjointement avec *nirK* chez *Rhodobacter sphaeroïdes* 2.4.3 et par insertion d'un transposon *tn5*, nécessaire à l'activité de réduction du nitrite chez *Sinorhizobium meliloti* JJ1c10 (Jain and Shapleigh, 2001; Chan and McCormick, 2004).

Des études ont démontré des fonctions alternatives pour la nitrite réductase en plus de son rôle dans la réduction du NO_2^- en NO. *Rhizobium sllae* sp. HCNT1 possède, comme seule enzyme de la voie de dénitrification, une CuNir fortement affiliée aux CuNir des bactéries dénitrifiantes. En conditions microaérobies, cette enzyme réduit le NO_2^- en NO inhibant ainsi la croissance de *R. sllae* sp. HCNT1 en raison de la toxicité du NO, suggérant une fonction alternative pour cette enzyme. *R. sllae* sp. HCNT1 a la capacité de croître en présence d'une forte concentration de sélénite, un composé hautement toxique. Basaglia et al. (2007) ont mis en évidence la réduction du sélénite en sa forme élémentaire, le sélénium, par la CuNir chez *R. sllae* sp. HCNT1, démontrant ainsi le rôle de CuNir dans la détoxification du sélénite. De plus, une fonction cytochrome oxydase de cdNir a été démontrée chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Paracoccus pantotrophus* où l'enzyme purifiée catalyse la réduction, impliquant quatre électrons, du dioxygène (O_2) en H_2O (Silvestrini et al., 1994; Koppenhofer et al., 2000).

2.3.3.3. Oxyde nitrique réductase

L'oxyde nitrique est un radical libre qui, en grande quantité, est toxique pour les microorganismes (Choi et al., 2006). Il est également toxique pour les bactéries dénitrifiantes, malgré la présence d'un système de production du NO chez ces bactéries. En effet, il a été montré que l'inactivation de l'oxyde nitrique réductase de *Pseudomonas stutzeri* inhibe sa croissance (Braun and Zumft, 1991). Ceci met en évidence le rôle de l'oxyde nitrique réductase dans la protection des microorganismes contre la toxicité du NO. L'oxyde nitrique réductase est responsable de la réduction du NO en N_2O . Cette enzyme est retrouvée sous deux formes périplasmiques, cNorB et qNorB, chez les bactéries à Gram négatif.

cNorB a été retrouvée exclusivement chez les bactéries capables de croître par dénitrification (Braker and Tiedje, 2003). C'est un hétérodimère constitué des sous-unités NorB et NorC. La sous-unité NorB est un cytochrome de type *b* de 12 régions transmembranaires qui est codé par le gène *norB*. NorB est le site de la réduction du NO en N_2O (Philippot, 2002). La sous-unité NorC, codée par le gène *norC*, est un cytochrome de type *c* ancré à la membrane. Elle transfère les électrons du donneur d'électrons périplasmique vers la sous-unité catalytique NorB (Figure 2.4A) (Tavares et al., 2006). L'opéron *norCB* est associé à d'autres gènes qui peuvent varier selon l'espèce, mais dont l'organisation la plus commune chez les bactéries est un

ensemble de six gènes, *norEFQBQD* (Zumft, 2005). Les gènes *norQ* et *norD* sont essentiels à l'expression d'une enzyme cNorB active (DeBoer et al., 1996; Bartnikas et al., 1997).

Une autre forme de l'enzyme, nommée qNorB, codée par le gène *qnorB* (aussi nommé *norZ*), a été découverte chez *Ralstonia eutropha* H16 (Cramm et al., 1997). Celle-ci ne contient pas de cytochrome de type *c* et montre une homologie de séquence avec la sous-unité NorB de l'enzyme cNorB. Cette forme d'oxyde nitrique réductase reçoit ses électrons directement du pool de quinol (Figure 2.4B) (Philippot, 2002). Aucun gène accessoire du gène *qnorB* n'a été identifié. qNorB a été détectée chez des bactéries dénitrifiantes ainsi que chez des bactéries non dénitrifiantes (Büsch et al., 2002; Braker and Tiedje, 2003). En effet, cette enzyme est exprimée, en absence des autres enzymes de la dénitrification, chez des bactéries pathogènes leur conférant ainsi une protection contre le NO produit par les macrophages afin d'éliminer les microorganismes invasifs (Hendriks et al., 2000; Stevanin et al., 2005).

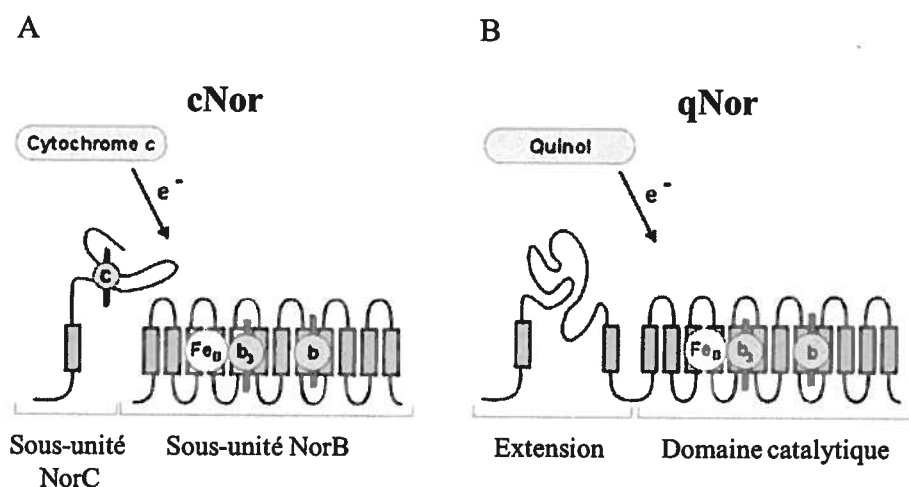


Figure 2.4. Représentations schématiques de l'oxyde nitrique réductase. (A) Oxyde nitrique réductase de type cNorB et (B) oxyde nitrique réductase de type qNorB.

Une troisième forme de l'enzyme (qCu(A)NOR), la première Nor décrite chez les bactéries à Gram positif, a été découverte chez *Bacillus azotoformans*. qCu(A)NOR est composée de deux sous-unités, l'une contenant deux hèmes *b* ainsi qu'un atome de fer non hémique et l'autre contenant un centre Cu_A constitué de deux atomes de cuivre (Suharti et al., 2001). Elle est similaire à l'enzyme qNorB du fait qu'elle contient l'hème *b*, mais ne contient pas l'hème *c* retrouvé chez cNorB. qCu(A)NOR reçoit ses électrons du cytochrome c₅₅₁ ou de la ménaquinone (Heering and de Vries, 2004). L'enzyme qCu(A)NOR n'a été observée que chez *B. azotoformans* et les gènes impliqués n'ont pas été identifiés.

2.3.3.4. Oxyde nitreux réductase

La transformation de l'oxyde nitreux en N_2 constitue la dernière étape de la dénitrification. L'oxyde nitreux réductase (N_2Or) est l'enzyme responsable de cette conversion du N_2O en N_2 . Elle correspond à un homodimère dont chaque monomère est composé d'un domaine N-terminal et d'un domaine C-terminal contenant respectivement les sites Cu_Z et Cu_A . Le site Cu_Z contient quatre atomes de cuivre et constitue le site actif de l'enzyme. Le site Cu_A , quant à lui, contient deux atomes de cuivre et permet le transfert des électrons, provenant de la pseudoazurin ou d'un cytochrome de type *c*, vers le site actif (Figure 2.5) (Richardson and Watmough, 1999; Tavares et al., 2006). N_2Or est située dans l'espace périplasmique.

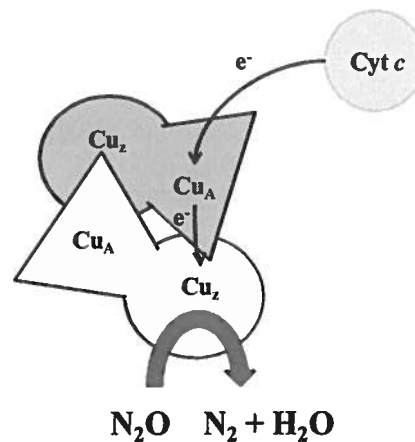


Figure 2.5. Représentation schématique de l'oxyde nitreux réductase. Cyt *c* : cytochrome *c*; e^- : électron. Tirée de Ramunsen et al. (2005).

N_2Or est codée par le gène *nosZ*. Chez la plupart des bactéries dénitrifiantes, *nosZ* fait partie d'un opéron comprenant les gènes *nosDFYL* situé en aval du gène *nosZ* (Philippot, 2002; Zumft and Kroneck, 2007). Les gènes *nosDFYL* codent les protéines nécessaires à la production d'une enzyme fonctionnelle. *nosDFY* codent pour un transporteur putatif de type ABC (Zumft et al., 1990; Honisch and Zumft, 2003). Il a été suggéré que *nosL* code pour une protéine chaperonne liant le cuivre impliquée dans l'assemblage des centres métalliques de l'oxyde nitreux réductase (McGuirl et al., 2001).

Les gènes *nos* ont été détectés principalement chez les Alpha-, Bêta- et Gamma-Protéobactéries alors qu'ils n'ont été détectés que récemment chez les bactéries à Gram positif. Le séquençage du génome de *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, une bactérie à Gram

positif capable de croître par dénitrification, a révélé la présence d'un ensemble de gènes contenant des homologues de *nosZDFY* (Feng et al., 2007). Les analyses génomiques ont également permis la détection des gènes *nos* chez l'Archaea *Haloarcula marismortui* (Baliga et al., 2004).

Tableau 2.2. Gènes codant les enzymes de la dénitrification.

Enzymes	Gènes	Produit du gène ou fonction présumée	Références
Nitrate réductase membranaire (Nar)	<i>narG</i>	Sous-unité catalytique NarG	(Philippot, 2002)
	<i>narH</i>	Sous-unité NarH : transfert des électrons vers NarG	(Philippot, 2002)
	<i>narI</i>	Sous-unité NarI : domaine d'ancrage à la membrane et transfert des électrons vers NarH	(Sodergren et al., 1988; Philippot, 2002)
	<i>narJ</i>	Assemblage du complexe NarGHI	(Sodergren et al., 1988; Dubourdieu and Demoss, 1992)
	<i>narK</i>	Transporteur de la superfamille des MFS : transport du nitrate et du nitrite	(DeMoss and Hsu, 1991; Wood et al., 2002)
Nitrate réductase périplasmique (Nap)	<i>napA</i>	Sous-unité catalytique NapA	(Berks et al., 1995)
	<i>napB</i>	Sous-unité NapB : transfert des électrons vers NapA	(Berks et al., 1995)
	<i>napC</i>	Cytochrome de type <i>c</i> impliqué dans le transfert des électrons de la quinol vers la nitrate réductase périplasmique	(Berks et al., 1995)
	<i>napD</i>	Maturation de l'enzyme	(Berks et al., 1995; Reyes et al., 1998)
	<i>napG, napH</i>	NapGH : quinol déhydrogénase impliquée dans le transfert des électrons vers NapC	(Brondijk et al., 2004)
	<i>napF</i>	Assemblage du centre [4Fe-4S] de la sous-unité NapA	(Olmo-Mira et al., 2004)
Nitrite réductase contenant un cytochrome de type <i>cdI</i> (cdNir)	<i>nirS</i>	Nitrite réductase contenant un cytochrome de type <i>cdI</i>	(Philippot, 2002)
	<i>nirFDL</i>	Biosynthèse de l'hème <i>dl</i>	(Kawasaki et al., 1997)
	<i>GHJEN</i>		
	<i>nirM</i>	Cytochrome c_{551} ayant un rôle de donneur d'électrons	(Arai et al., 1990)
Nitrite réductase contenant un cofacteur cuivre (CuNir)	<i>nirK</i>	Nitrite réductase contenant un cofacteur cuivre	(Shapleigh, 2006)
	<i>nirV</i>	Fonction inconnue (essentiel à l'activité de l'enzyme)	(Jain and Shapleigh, 2001; Chan and McCormick, 2004)
Oxyde nitrique réductase (cNorB)	<i>norB</i>	Sous-unité catalytique NorB	(Philippot, 2002)
	<i>norC</i>	Sous-unité NorC : transfert les électrons du donneur d'électrons périplasmique vers la sous-unité catalytique NorB	(Tavares et al., 2006)
	<i>norQ, norD</i>	Essentiels à l'expression d'une enzyme active	(DeBoer et al., 1996; Bartnikas et al., 1997)
Oxyde nitrique réductase (qNorB)	<i>qNorB</i>	Oxyde nitrique réductase	(Cramm et al., 1997)
Oxyde nitreux réductase (N ₂ Or)	<i>nosZ</i>	Oxyde nitreux réductase	(Zumft and Kroneck, 2007)
	<i>nosD, nosF,</i>	Codent un transporteur putatif de type ABC (essentiel à la fonction de l'enzyme)	(Zumft et al., 1990; Honisch and Zumft, 2003)
	<i>nosY</i>		
	<i>nosL</i>	Assemblage des centres métalliques de l'oxyde nitreux réductase	(McGuire et al., 2001)

Les gènes en gras sont ceux codant les réductases.

2.3.3.5. Chaîne de transport des électrons

Les enzymes de la dénitrification reçoivent leurs électrons des éléments de la chaîne respiratoire. Certains de ces éléments, permettant le transport des électrons, sont communs entre la dénitrification et la respiration aérobie utilisant l'O₂ comme accepteur final d'électrons. Le cytochrome *bc1* consiste en un de ces éléments retrouvés aussi bien dans la dénitrification que dans la respiration aérobie (Baker et al., 1998). La chaîne de transport des électrons impliquée dans la dénitrification a principalement été caractérisée chez *Paracoccus denitrificans* (Figure 2.6). Chez *P. denitrificans* Nar oxyde directement l'ubiquinol du côté périplasmique de l'enzyme libérant ainsi un proton dans l'espace périplasmique. L'électron issu de cette réaction est transféré, à travers la membrane, vers le site actif de l'enzyme se situant du côté cytoplasmique. Ceci résulte en la formation d'un gradient de protons à travers la membrane (Parsonage and Ferguson, 1983). cdNir, cNorB et N₂Or reçoivent quant à elles leurs électrons d'un cytochrome *c₅₅₀* ou de la pseudoazurine, deux protéines périplasmiques réduites par le complexe membranaire cytochrome *bc₁* (Matchova and Kucera, 1991). Le cytochrome *bc₁* est quant à lui réduit par l'ubiquinol qui est issu de la réduction de l'ubiquinone par la NADH déshydrogénase. Les enzymes périplasmiques cdNir et N₂Or ne sont pas impliquées directement dans la formation d'un gradient de protons à travers la membrane. Également, bien que cNorB soit une enzyme membranaire elle ne semble pas participer à la formation d'un gradient de protons (Reimann et al., 2007). La conservation d'énergie associée aux réactions de cdNir, cNorB et N₂Or provient du complexe cytochrome *bc1* qui catalyse la translocation des protons à travers la membrane (Brandt and Trumpower, 1994). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, il a été démontré que CuNir reçoit ses électrons d'un cytochrome *c* (Vijgenboom et al., 1997). Ce dernier étant également réduit par le complexe cytochrome *bc1*. Nap oxyde directement l'ubiquinol du côté périplasmique de la membrane. La réduction du nitrate a également lieu au niveau périplasmique résultant en l'absence de formation d'un gradient de protons (Richardson, 2000). Comme mentionné précédemment, plusieurs fonctions ont été attribuées à Nap, dont un rôle dans la dénitrification. Il a été démontré que Nap peut supporter la croissance en conditions dénitrifiantes chez un mutant Nir⁻ de *Pseudomonas* G-179, suggérant que la réduction du NO₃⁻ en NO₂⁻ permet la génération d'énergie (Bedzyk et al., 1999). Cependant, le mécanisme de production d'énergie chez les bactéries dénitrifiantes possédant l'enzyme Nap n'a pas encore été élucidé.

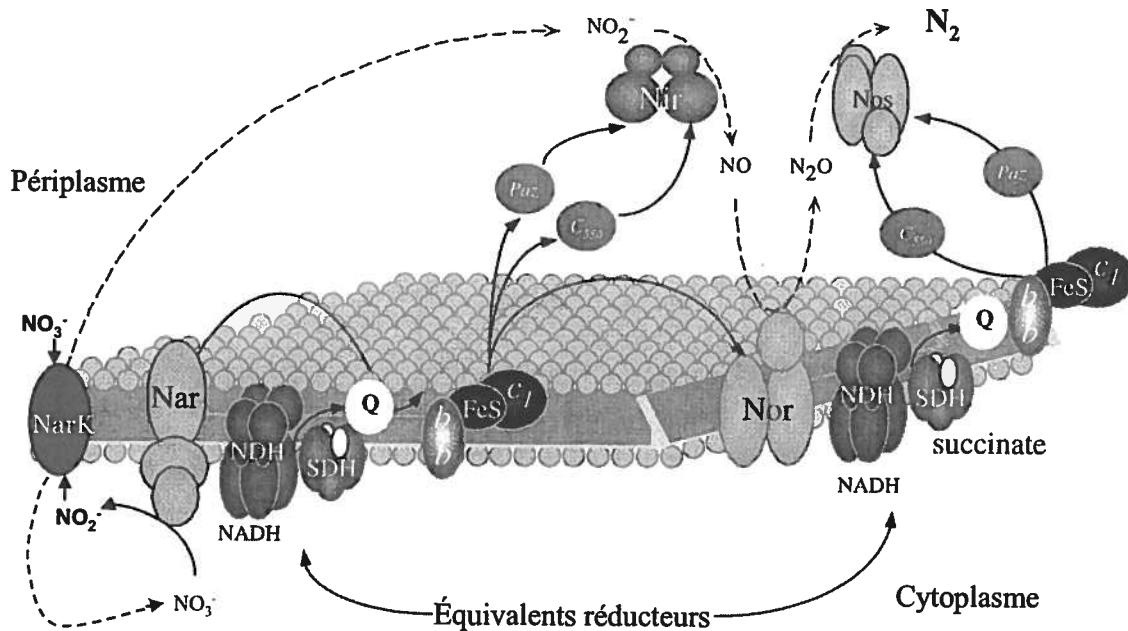


Figure 2.6. Chaîne de transport des électrons lors de la dénitrification chez *Paracoccus denitrificans*. Dans cet exemple le succinate sert de source de carbone et d'énergie. Nar, nitrate réductase membranaire; Nir : nitrite réductase (cdNir); Nor : oxyde nitrique réductase (cNorB); Nos : oxyde nitreux réductase (N₂Or); NDH : NADH-ubiquinone oxidoréductase; SDH, succinate déhydrogenase; Q : réservoir d'ubiquinone; NarK : transporteur nitrate/nitrite; P_{az} : pseudoazurine; c₅₅₀ : cytochrome c₅₅₀; Complexe bb/FeS/C1 : complexe cytochrome bc₁. Modifiée de Baker et al. (1998).

2.3.4. Organisation et localisation des gènes de dénitrification

Plus d'une cinquantaine de gènes sont impliqués dans la dénitrification dont des gènes codant pour les enzymes de la dénitrification ainsi que des gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation, la maturation, la synthèse de cofacteurs et le transfert des électrons (Zumft, 1997). Ces gènes sont, de manière générale, organisés en opéron comprenant l'ensemble des gènes nécessaires à la fonction de l'enzyme. Leurs localisations dans le génome varient d'une bactérie à l'autre. Chez *P. aeruginosa* les gènes de dénitrification sont concentrés dans un secteur chromosomique correspondant à 20 à 36 minutes et forment trois loci séparés soit *nar*, *nir-nor* et *nos*. Les gènes *nap* forment un locus additionnel à environ 63 minutes (Vollack et al., 1998). Cette liaison des gènes *nir* et *nor* observée également chez d'autres espèces bactériennes ainsi que l'expression concomitante de ces gènes pourraient permettre d'éviter l'accumulation de NO à des concentrations toxiques pour la cellule (Braun and Zumft, 1992; van Spanning et al., 1995; DeBoer et al., 1996; Vollack et al., 1998). Contrairement à ce qui est observé chez *P. aeruginosa*,

les gènes *nir* et *nor* sont dispersés sur le chromosome de *Bradyrhizobium japonicum* (Mesa et al., 2001). Les gènes codant les enzymes de la dénitrification peuvent être localisés sur le chromosome (Vollack et al., 1998; Mesa et al., 2001) ou sur un plasmide (Schwintner et al., 1998; Schwartz et al., 2003). La localisation extrachromosomique des gènes de dénitrification suggère que des bactéries non dénitrifiantes peuvent acquérir ces gènes par transfert de plasmides.

2.3.5. Expression des gènes de la dénitrification

La synthèse des enzymes impliquées dans la réaction de dénitrification est soumise à un contrôle complexe au niveau transcriptionnel en réponse à des changements environnementaux dont une diminution de la concentration en oxygène et la présence d'oxydes d'azote (Zumft, 1997). Plusieurs études ont été réalisées afin de comprendre la régulation de l'expression des gènes de la dénitrification. De manière générale, il semble que l'expression de ces gènes soit sous le contrôle de régulateurs transcriptionnels appartenant à la grande famille CRP (cAMP receptor protein)/FNR (Fumarate and Nitrate reductase regulation). Des homologues de FNR ont été retrouvés chez les bactéries dénitrifiantes et ont été reconnus pour être actifs en réponse à différentes molécules signales (Arai et al., 1995; Ye et al., 1995; van Spanning et al., 1999; Vollack et al., 1999; Wood et al., 2001).

2.3.5.1. Effet de l'oxygène

La réduction du NO_3^- en N_2 est un processus respiratoire dont l'apport énergétique est moindre que celui de la respiration de l'oxygène. De ce fait, l'utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électrons est favorisée par rapport à l'utilisation des oxydes d'azote lors de la respiration chez les microorganismes. La concentration d'oxygène dans le milieu constitue alors un facteur limitant de la dénitrification. Plusieurs études ont démontré l'impact de l'oxygène sur le rendement de dénitrification tant chez des espèces bactériennes isolées que dans des systèmes complexes. Gomez et al. (2002) ont étudié l'effet de l'oxygène sur la dénitrification dans un système à lit submergé pour le traitement des eaux usées. Ils ont montré une corrélation négative entre la concentration d'oxygène présente et l'élimination de l'azote. Une étude réalisée par Satoh et al. (2003) a permis de démontrer, par la mesure des concentrations d'ammonium et de nitrate à l'aide de microélectrodes, l'inhibition de la dénitrification dans des floccs bactériens en

présence d'une forte concentration d'oxygène. En effet, à forte concentration, l'oxygène pénètre complètement le floc permettant ainsi la nitrification, mais pas la dénitrification en raison de l'absence d'une zone anoxique.

L'oxygène agit directement sur l'activité des enzymes de dénitrification et sur la régulation de l'expression des gènes de dénitrification. Par exemple, l'oxygène inactive la protéine FNR, un activateur transcriptionnel de l'opéron *narGHJI* qui code pour la nitrate réductase membranaire, par une conversion de FNR en sa forme monomérique (Philippot, 2002).

L'effet inhibiteur de l'oxygène sur la dénitrification varie d'une espèce bactérienne à une autre (Knowles, 1982). Bien que la dénitrification soit acceptée depuis toujours comme étant un phénomène respiratoire anoxique, plusieurs investigations ont été réalisées pour démontrer la possibilité d'une dénitrification aérobie. Patureau et al. (1998) ont montré, malgré une augmentation de la vitesse de dénitrification à faible concentration d'oxygène, la capacité de *Microvirgula aerodenitrificans* à co-respirer l'oxygène et le nitrate, donc de dénitrifier en présence d'oxygène.

2.3.5.2. Effet des oxydes d'azote

Les gènes codant les enzymes de la dénitrification sont exprimés, également, en réponse à la présence d'oxydes d'azote. Chez *Pseudomonas stutzeri*, l'absence d'oxygène n'est pas suffisante pour induire la synthèse des enzymes Nar, cdNir et N₂Or. En effet, la présence d'oxydes d'azote est un pré-requis. Le nitrate induit la synthèse de l'ensemble des enzymes de la dénitrification probablement en raison de la production d'intermédiaire de la dénitrification. Le nitrite et l'oxyde nitreux induisent la cdNir et la N₂Or, mais ont un très faible effet inducteur sur Nar (Korner and Zumft, 1989).

Les protéines de la famille FNR sont également impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de dénitrification stimulée par la présence d'oxydes d'azote. Chez *Paracoccus denitrificans* la protéine NNR, homologue aux protéines de la famille FNR, est responsable de l'expression des gènes *nir* et *nor* en conditions anaérobies en réponse à la présence d'oxyde nitrique (van Spanning et al., 1995; van Spanning et al., 1999).

En plus des protéines de la famille FNR, d'autres régulateurs ont été identifiés comme jouant un rôle dans l'activation de la transcription des gènes de dénitrification en réponse à la présence d'oxydes d'azote. Chez la bactérie réductrice de nitrate *E.coli*, NarXL active la

transcription de l'opéron *narGHJI* en réponse à la présence de nitrate. NarX correspond à un senseur du nitrate et NarL à un régulateur transcriptionnel. Ces régulateurs appartiennent à la famille des systèmes de régulation à deux composants (Nohno et al., 1989). Des protéines homologues à NarXL contrôlant la transcription de l'opéron *narGHJI* ont également été identifiées chez des bactéries dénitrifiantes (Hartig et al., 1999; Stewart, 2003).

2.3.6. Utilisation des gènes fonctionnels comme indice de la diversité dénitrifiante

L'identification des microorganismes basée sur la caractérisation de cultures bactériennes pures ne permet pas, en raison de la difficulté à isoler la majorité d'entre eux, d'étudier la composition des populations bactériennes dans les environnements naturels et sous-estime souvent la diversité de ces communautés. Présentement, environ 8700 espèces bactériennes ont été reconnues dans le monde (Euzéby, 1998-2011). Néanmoins, il est estimé que plus de 99% des microorganismes présents dans l'environnement n'ont pas de représentant en culture pure (Amann et al., 1995). Les limitations des méthodes dépendantes de la culture ont été surmontées par l'utilisation de méthodes indépendantes de la culture reposant sur les techniques de biologie moléculaire ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S (Amann et al., 1995; Yoshie et al., 2004a).

La diversité phylogénétique des bactéries dénitrifiantes rend difficile l'utilisation du gène de l'ARNr 16S pour la détection des populations bactériennes dénitrifiantes dans un échantillon environnemental (Shapleigh, 2006). Les études utilisant des méthodes indépendantes de la culture ont alors ciblé les gènes fonctionnels codant pour les sous-unités catalytiques des différentes réductases de la dénitrification afin d'évaluer la diversité des populations dénitrifiantes (Smith and Tiedje, 1992; Braker et al., 1998; Hallin and Lindgren, 1999; Braker et al., 2000; Oakley et al., 2007). Braker et al. (2000) ont révélé par l'analyse de la diversité des gènes *nirS* et *nirK* la présence de microorganismes dénitrifiants appartenant aux sous-classes des Alpha-, Bêta- et Gamma-Protéobactéries dans des sédiments marins du nord-ouest du Pacifique. Henry et al. (2006) par l'utilisation d'amorces dégénérées amplifiant le gène de l'oxyde nitreux réductase, ont démontré que *nosZ* est présent dans le sol chez des bactéries appartenant aux sous-classes des Alpha-, Bêta- (*Ralstonia solanacearum* et *Cupriavidus metallidurans*) et Gamma-Protéobactéries (*Pseudomonas sp.*).

La quantification des populations dénitrifiantes et la détermination de leur activité dans un environnement sont essentielles afin d'évaluer la contribution de ces populations à la dénitrification. La méthode quantitative par amplification PCR (polymerase chain reaction) est maintenant largement utilisée en écologie microbienne pour mesurer l'abondance de gènes taxonomiques ou fonctionnels dans l'environnement. Cette technique a d'ailleurs été exploitée afin de quantifier l'ensemble des populations dénitrifiantes dans divers environnements en ciblant, à l'aide d'amorces dégénérées, les gènes codant pour les enzymes de la dénitrification (Henry et al., 2004; Kandeler et al., 2006; Dandie et al., 2007b; Geets et al., 2007; Smith et al., 2007; Levy-Booth and Winder, 2010). L'utilisation de méthodes indépendantes de la culture a mis de l'avant la sous-estimation de l'abondance des populations dénitrifiantes par les méthodes dépendantes de la culture (Michotey et al., 2000; Henry et al., 2004).

Jusqu'à maintenant, seules quelques études ont évalué l'expression des gènes de dénitrification dans des environnements naturels par transcription inverse couplée à la PCR (RT-PCR) afin d'identifier les populations dénitrifiantes actives. De manière générale, ces études montrent que seulement quelques espèces ou groupes de bactéries sont actifs par rapport à l'ensemble des populations dénitrifiantes détectées par PCR (Nogales et al., 2002; Wertz et al., 2009).

2.3.7. Caractère phylogénétique des gènes fonctionnels de la dénitrification et transfert horizontal des gènes.

Plusieurs études ont employé les gènes fonctionnels comme marqueurs phylogénétiques de la dénitrification. Cependant, de plus en plus d'études semblent montrer une divergence entre la phylogénie des gènes fonctionnels de la dénitrification et celle du gène de l'ARNr 16S (Delorme et al., 2003; Heylen et al., 2006; Dandie et al., 2007a; Heylen et al., 2007; Jones et al., 2008). Heylen et al. (2006) ont analysé les séquences en acides aminés des gènes *nirS* et *nirK* chez 109 isolats dénitrifiants d'origine environnementale. Bien qu'ils observent que ces gènes, dont particulièrement *nirS*, contiennent des informations taxonomiques, les auteurs démontrent également certaines divergences entre la classification phylogénétique à partir du gène de l'ARNr 16S et celle à partir de *nirK* et *nirS*. En effet, les analyses phylogénétiques des gènes *nirK* et *nirS* démontrent que des membres de différentes classes bactériennes groupent ensemble dans les arbres phylogénétiques. Les auteurs suggèrent donc l'utilisation de ces gènes comme marqueurs

de la diversité fonctionnelle plutôt que comme marqueurs phylogénétiques des organismes dénitrifiants, et ce, surtout dans les études indépendantes de la culture. De plus, des copies multiples des gènes codant pour les enzymes de la dénitrification ont été retrouvées chez certaines espèces bactériennes. Par exemple, trois copies du gène *nirS* ont été trouvées chez *Magnetospirillum magneticum* ainsi que deux copies chez *Dechloromonas aromaticum* et *Thauera sp.* (Etchebehere and Tiedje, 2005; Jones et al., 2008). Deux copies du gène *cnorB* ont également été trouvées chez *Thiobacillus denitrificans* (Beller et al., 2006). Ces gènes sont généralement peu similaires et groupent distinctement lors des analyses phylogénétiques (Jones et al., 2008).

Le transfert horizontal de gènes (HGT : horizontal gene transfert) a été proposé afin d'expliquer les divergences phylogénétiques observées pour les gènes fonctionnels de la dénitrification. Il a été démontré que les gènes fonctionnels de la dénitrification peuvent être aussi bien présents dans le chromosome que sur plasmides supportant la possibilité d'HGT (Schwintner et al., 1998; Schwartz et al., 2003; Chan and McCormick, 2004; Pothier et al., 2008). Suite à l'étude de génomes, Jones et al. (2008) concluent qu'il est peu probable que de récents événements de HGT puissent expliquer les divergences observées chez les gènes *nirK*, *nirS*, *cnorB*, *qnorB* et *nosZ*. Ils n'excluent toutefois pas la possibilité d'événements de HGT trop anciens pour être détectés par les méthodes employées, dont l'analyse de l'usage des codons et du pourcentage en GC. Ils proposent des explications alternatives aux divergences observées telles que des événements de duplication et dégénérescence de gènes ou de tri du polymorphisme ancestral (« lineage sorting »). Palmer et al. (2009) ont également évalué la possibilité de HGT par analyse de génomes et concluent qu'il est peu probable que l'opéron *Nar* ait été sujet à de récents événements de HGT. Cependant, Alvarez et al. (2011) ont démontré que la capacité de dénitrification pouvait être transférée par compétence naturelle ou par conjugaison d'une souche *Thermus thermophilus* dénitrifiante à une souche *T. thermophilus* aérobie stricte, supportant la possibilité de transferts horizontaux des gènes de la dénitrification.

2.3.8. La dénitrification et le traitement des eaux usées

En plus de son importance environnementale, la dénitrification a marqué l'intérêt dans le domaine du traitement des eaux usées et est de nos jours largement exploitée pour éliminer le nitrate de l'eau.

2.3.8.1. Les procédés de dénitrification

L'application de la dénitrification au traitement des eaux usées a été largement étudiée et différentes technologies ont été développées et employées telles que les systèmes à boues activées et les systèmes utilisant les biofilms. Généralement, les systèmes à biofilms sont préférés aux systèmes avec biomasse en suspension. En effet, l'utilisation des biofilms procure plusieurs avantages par rapport à l'utilisation d'une biomasse en suspension dans ces systèmes. D'un point de vue opérationnel, la biomasse organisée en biofilm facilite l'étape de séparation biomasse-eau par décantation nécessaire avant de réutiliser l'eau ou de la rejeter dans l'environnement (Stams and Elferink, 1997). Également, les systèmes à biofilms requièrent moins d'énergie, ils sont plus simples à opérer, nécessitent moins de maintenance et permettent l'optimisation du volume actif des réacteurs et de maintenir un niveau élevé de biomasse en raison de la surface spécifique élevée qu'offrent les supports employés (Rodgers and Zhan, 2003). L'utilisation des biofilms procure également des avantages d'un point de vue microbiologique. La population microbienne dans ces traitements est généralement hétérogène. De ce fait, des microorganismes à croissance plus ou moins rapide ayant une affinité plus ou moins grande pour le substrat s'y retrouvent. Il est connu que le biofilm protège les bactéries de la prédation et des composés toxiques pouvant nuire à leur développement (Hoyle et al., 1992; Matz et al., 2005). L'utilisation de biofilm dans les systèmes de traitement des eaux aide donc à maintenir la présence de microorganismes à croissance lente qui auraient une haute affinité pour le substrat. De plus, la proximité favorise les échanges entre les différents microorganismes (Donlan, 2002).

Parmi les procédés employant les biofilms, il y a les systèmes à lit fixe et les systèmes à biofilm « circulant ». Dans ce dernier type de système, les supports sur lesquels se développe le biofilm sont maintenus continuellement en mouvement par l'application de forces mécaniques ou hydrauliques. Les systèmes à biofilm « circulant » procurent des avantages par rapport au système à lit fixe. D'une part, il y a la réduction des problèmes associés au colmatage du système qui sont contrôlés par les forces de cisaillement de l'eau. D'autre part, le mouvement des supports dans le réacteur favorise le transfert de masse et permet une homogénéisation des conditions du système (Rodgers and Zhan, 2003). Les réacteurs à lit mobile (Moving bed biofilm reactor, MBBR) font partie des systèmes à biofilm « circulant ». Dans les MBBR le biofilm se développe sur de petits supports de polyéthylène ou polypropylène, ayant une surface spécifique élevée et une densité légèrement inférieure à celle de l'eau. Dans les MBBR anoxique, les supports sont

généralement maintenus en mouvement par l'application d'une force mécanique (Figure 2.7) (Rodgers and Zhan, 2003). Ce type de réacteur a montré son efficacité dans la dénitrification (Rodgers and Zhan, 2004; Weiss et al., 2005). Le Biodôme de Montréal opère un réacteur de dénitrification de type MBBR pour éliminer le nitrate de l'eau de son bassin du Saint-Laurent Marin. Contrairement aux réacteurs de type MBBR anoxique conventionnel, le brassage des supports est assuré par injection d'eau plutôt que par l'utilisation d'un agitateur mécanique.

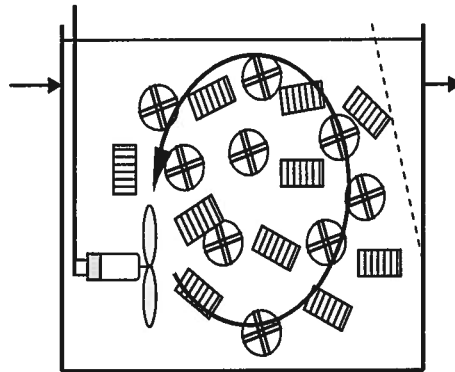


Figure 2.7. Schéma d'un MBBR anoxique avec agitation mécanique. Modifiée de Rodgers et al. (2003).

2.3.8.2. La dénitrification hétérotrophe pour le traitement des eaux usées

La dénitrification est majoritairement réalisée par des bactéries aérobies facultatives hétérotrophes. En conditions anoxiques, ces bactéries réduisent les oxydes d'azote et oxydent les composés carbonés en dioxyde de carbone. C'est par l'oxydation des composés carbonés que ces bactéries dénitrifiantes hétérotrophes obtiennent les électrons de la chaîne respiratoire. De ce fait, elles ont besoin d'une source de carbone qui en plus d'être utilisée pour leur croissance, le sera également pour la respiration.

Dans les processus de dénitrification où la concentration en carbone est faible, il est nécessaire d'ajouter une source externe de carbone organique afin d'atteindre un taux de dénitrification satisfaisant (Mateju et al., 1992). C'est d'ailleurs le cas du système de dénitrification du Biodôme de Montréal. En effet, l'affluent de l'unité de dénitrification est, lors d'une étape antérieure, filtré dans des filtres à sable diminuant ainsi la concentration de carbone disponible pour les microorganismes. Les filtres à sable ont pour fonction l'élimination des matières en suspension.

Différentes sources de carbone ont été testées afin de déterminer celles qui favorisent l'élimination du nitrate dans les traitements d'eaux usées (Aravinthan et al., 2001; Mergaert et al., 2001; Min et al., 2002; Aslan and Turkman, 2003; Sage et al., 2006; Fernandez-Nava et al., 2010). Gomez et al. (2000) ont étudié l'effet du sucrose, de l'éthanol et du méthanol sur la dénitrification dans un système à lit fixe submergé pour le traitement des eaux souterraines. Ils ont observé le plus bas rendement d'élimination de l'azote en présence de sucrose ayant pour conséquence une accumulation de nitrite. À l'inverse, la concentration en nitrite était pratiquement nulle en présence du méthanol et de l'éthanol. Ceci peut s'expliquer par le fait que le développement d'une biomasse dénitrifiante était davantage favorisé en présence de méthanol et d'éthanol qu'en présence de sucrose. De plus, le sucrose entraînait une forte croissance de la biomasse menant à des problèmes de colmatage du système. Pour combler le manque de carbone dans l'affluent du dénitrificateur, du méthanol est ajouté au système de dénitrification du Biodôme de Montréal. Cette source de carbone a déjà montré son efficacité dans d'autres systèmes de dénitrification (Gomez et al., 2000; Grguric et al., 2000). De plus, le méthanol est régulièrement employé dans les systèmes de traitement des eaux usées municipales en raison de son efficacité et de son faible coût.

Le rapport entre la quantité de carbone et d'azote est un facteur critique lors de la dénitrification. Un ratio carbone/azote (C/N) inadéquat peut mener à différentes situations dans les procédés de dénitrification. En présence de carbone lorsque l'oxygène et le nitrate deviennent limitants, c'est-à-dire un ratio C/N élevé, les bactéries sulfato-réductrices utilisent le sulfate comme accepteur d'électrons le réduisant en sulfure d'hydrogène, un composé corrosif et très toxique pour les organismes vivants (Westermann and Ahring, 1987). Ce phénomène est particulièrement présent en milieu marin dû à une grande concentration de sulfate dans l'eau salée. En présence de nitrate lorsque la concentration de carbone devient limitante, c'est-à-dire un ratio C/N bas, l'azote se trouve en excès résultant ainsi en une dénitrification incomplète. Ceci entraîne une accumulation d'intermédiaires de la dénitrification tels que le nitrite et l'oxyde nitrique qui sont des composés toxiques (Her and Huang, 1995).

Une étude portant sur l'optimisation de la dénitrification par le biofilm du dénitrificateur du Biodôme de Montréal a été réalisée afin d'évaluer l'effet de différents ratio C/N sur l'activité de dénitrification. Les conditions du dénitrificateur ont été reproduites dans des essais en fiole. Le méthanol a été ajouté selon des ratios C/N de 0.5 à 2.0. Les résultats de l'étude suggèrent qu'un ratio C-CH₃OH/N-NaNO₃ de 1.5 est optimal pour la dénitrification (Laurin, 2005).

2.4. Les composés monocarbonés

Comme mentionné précédemment, l'unité de dénitrification du Biodôme est alimentée au méthanol. Seules certaines bactéries, désignées bactéries méthylophes, ont la capacité d'utiliser le méthanol comme source de carbone.

2.4.1. Métabolisme des composés monocarbonés

Les bactéries méthylophes sont des microorganismes qui utilisent des substrats à un seul atome de carbone (composé C1) comme source de carbone et d'énergie. Parmi ces bactéries, il y a celles capables de croître en présence de méthanol, de méthane, d'amines méthylées et de méthane halogéné (Lidstrom, 2006). Ces composés C1 sont dans un premier temps oxydés en formaldéhyde, lequel est ensuite, d'une part, oxydé en CO₂ pour la production d'énergie et d'autre part assimilé dans les constituants cellulaires carbonés (Kato et al., 2006). Selon l'espèce bactérienne, l'assimilation du formaldéhyde pour la biosynthèse peut emprunter la voie du ribulose monophosphate (Bêta- et Gamma-Protéobactéries, bactéries à Gram positif) ou la voie de la sérine (Alpha-Protéobactéries) (Lidstrom, 2006). Ces voies d'assimilation du formaldéhyde amènent la production de composés C3 tels que le pyruvate, le 3-phosphoglycérate et le glyceraldéhyde-3-P qui permettront la biosynthèse des constituants cellulaires (Figure 2.8.).

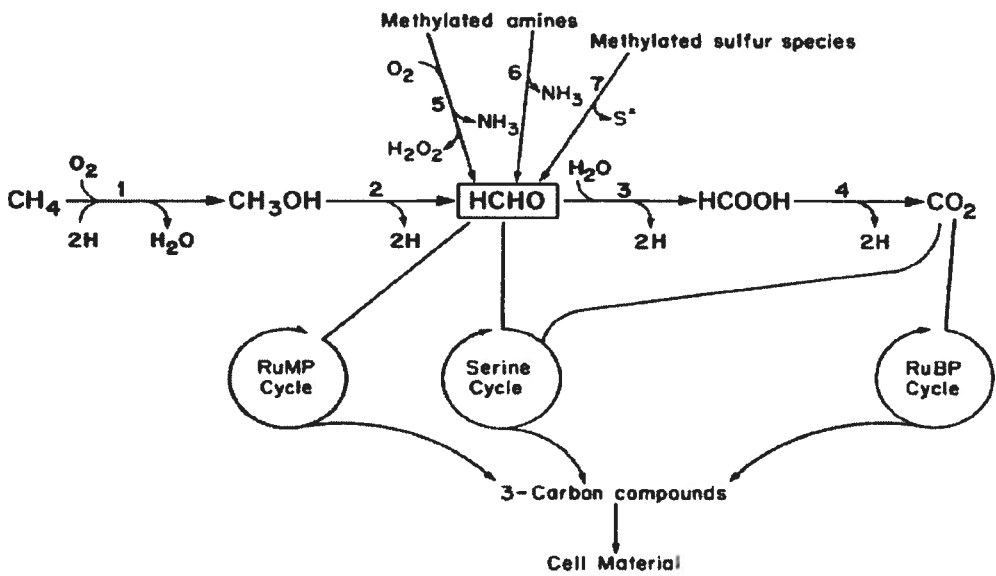


Figure 2.8. Schéma du métabolisme des composés monocarbonés. Chaque composé C1 est ultimement oxydé en formaldéhyde (HCHO) lequel peut être oxydé en CO₂ ou être assimilé pour la biosynthèse. RuMP cycle : cycle du ribulose monophosphate. RuBP cycle : cycle Calvin-Benson-Bassham pour l'assimilation du CO₂ par les bactéries méthylothropes autotrophes. Tirée de Lidstrom (2006)

2.4.2. Organismes méthylothropes

Les bactéries méthylothropes sont répandues dans la nature aussi bien dans les écosystèmes aquatiques que terrestres jouant un rôle important dans le cycle biogéochimique du carbone. Elles se divisent en deux groupes : il y a celles capables de croître en utilisant le méthane, dites méthanotrophes et il y a celles capables de croître en utilisant, à l'exception du méthane, des composés C1 tels que le méthanol et les amines méthylés. Il existe des bactéries méthylothropes obligatoires, facultatives restreintes et facultatives. Les bactéries méthylothropes obligatoires regroupent presque exclusivement les bactéries méthanotrophes qui utilisent le méthane comme seule source de carbone et d'énergie. Parmi celles-ci il y a les bactéries des genres *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus* et *Methylocystis* (Anthony, 1982). Jusqu'à récemment, toutes les bactéries méthanotrophes étaient considérées comme étant méthylothropes obligatoires. Cependant, il a été démontré que les bactéries du genre *Methylocella* utilisent comme seule source d'énergie le méthane et le méthanol ainsi que des composés multicarbonés tels que l'acétate, le pyruvate, le succinate, le malate et l'éthanol (Dedysh et al., 2005). Les méthylothropes facultatifs restreints se distinguent des méthylothropes facultatifs en raison de la

faible variété de composés multicarbonés qui supportent leur croissance. L'utilisation facultative des composés C1 est rencontrée spécialement chez les bactéries capables de croître en utilisant le méthanol. Parmi les bactéries méthylophages facultatives restreintes, il y a celles affiliées aux genres *Hyphomicrobium* et *Methylophaga* (Urakami et al., 1995; McDonald et al., 2001; Doronina et al., 2003a; Kim et al., 2007). Parmi les bactéries méthylophages facultatives, il y a celles affiliées aux genres *Paracoccus* et *Thiobacillus*. Les membres du genre *Paracoccus* oxydent complètement le méthanol en CO₂ lequel est ensuite assimilé en empruntant le cycle de Calvin (Cox and Quayle, 1975).

Les microorganismes méthylophages ont été retrouvés principalement chez les Alpha-, Bêta- et Gamma-Protéobactéries, mais également parmi les bactéries à Gram positif dont *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* et *Nocardia* (Lidstrom, 2006). Récemment, la capacité d'utiliser les composés C1, notamment le méthane et le méthanol, a été découverte chez des membres du phylum *Verrucomicrobia* (Dunfield et al., 2007; Pol et al., 2007).

2.4.3. Microorganismes méthylophages dans les systèmes de dénitrification

Le méthanol est couramment employé dans les systèmes de traitement des eaux usées pour augmenter le taux de dénitrification. La source de carbone employée a un impact sur les populations bactériennes en favorisant le développement des microorganismes pouvant la métaboliser. Une étude a démontré que l'enrichissement des bactéries du genre *Hyphomicrobium* était favorisé en présence de méthanol et de nitrate (Sperl and Hoare, 1971). La plupart des bactéries méthylophages sont caractérisées comme étant aérobies strictes. Toutefois, la capacité de dénitrifier a été observée chez *Paracoccus denitrificans* et chez des membres du genre *Hyphomicrobium* (Urakami et al., 1995; Baumann et al., 1996). Des bactéries méthylophages ont également été détectées dans des systèmes de dénitrification alimentés au méthanol (Lee and Welander, 1996; Neef et al., 1996; Labbé et al., 2003a). Cependant, dans la plupart des cas une incertitude demeure à savoir si le même organisme est responsable à la fois de la dénitrification et de la consommation du méthanol observées dans ces systèmes. Osaka et al. (2006) ont utilisé la technique du "stable isotope probing" (SIP) afin d'identifier les bactéries assimilatrices de méthanol, sous conditions dénitrifiantes, dans une boue activée d'un traitement des eaux municipales. Ils ont mis en évidence deux phylotypes majeurs dont un était relié aux *Methylophilaceae* et l'autre aux *Hyphomicrobiaceae* tels le genre *Hyphomicrobium*. Par SIP et

micro-autoradiographie (MAR) couplée à l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH), Ginige et al. (2004) ont démontré que les membres de l'ordre des *Methylophilales* étaient responsables de la consommation du méthanol et de l'activité dénitrifiante dans un réacteur biologique séquentiel alimenté au méthanol.

Une étude portant sur la caractérisation de la structure et de la fonctionnalité du biofilm du dénitrificateur du Biodôme de Montréal a montré que la plupart des bactéries retrouvées dans le biofilm étaient affiliées aux genres *Methylophaga* (Gamma-Protéobactérie) et *Hyphomicrobium* (Alpha-Protéobactérie) (Labbé et al., 2007). Les espèces bactériennes du genre *Methylophaga* sont des méthylotrophes qui utilisent la voie du ribulose monophosphate pour l'assimilation du formaldéhyde (Janvier and Grimont, 1995). Cependant, les études de MAR-FISH ont montré que même si les *Methylophaga* sp. incorporent du méthanol-¹⁴C en présence d'oxygène, ils ne seraient pas impliqués dans l'assimilation du méthanol en conditions dénitrifiantes. De plus, les expériences de MAR-FISH n'ont pu mettre en évidence l'implication des *Hyphomicrobium* sp. dans l'assimilation du méthanol en conditions dénitrifiantes (Labbé et al., 2007).

2.5. Écologie microbienne : étude des communautés microbiennes

L'écologie microbienne est une discipline qui tente de comprendre les communautés microbiennes et comment celles-ci interagissent avec leur environnement. Le domaine de l'écologie microbienne a grandement évolué, depuis ses tout débuts, grâce au développement des outils de biologie moléculaire, tels que la PCR et le séquençage, qui ont facilité l'étude, entre autres, de la composition, la structure et la fonctionnalité des communautés microbiennes.

2.5.1. Étude de la diversité microbienne

Différentes techniques de biologie moléculaire ont été développées pour évaluer la diversité des microorganismes dans l'environnement.

2.5.1.1. Génomique

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S est l'une des méthodes les plus employées pour évaluer la biodiversité dans un échantillon environnemental. Le gène de l'ARNr 16S possède à la fois des régions hautement conservées parmi les différentes espèces

bactériennes et d'autres très variables (Olsen et al., 1986). La variabilité de ces régions permet d'établir des relations phylogénétiques et de faire la distinction entre les différents microorganismes. De manière traditionnelle, le séquençage des gènes de l'ARNr 16S est réalisé par l'intermédiaire d'une génothèque. Dans cette technique, l'ADN génomique total est isolé et purifié. Les gènes de l'ARNr 16S sont ensuite amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques, ciblant un groupe (Nübel et al., 1997; Schäfer et al., 2010) ou universelles, ciblant l'ensemble des bactéries (Frank et al., 2008). Les différents produits d'amplification sont ensuite séparés par clonage dans un vecteur adéquat, et par transformation dans des bactéries *Escherichia coli* compétentes. Les inserts d'ADN des différents clones sont séquencés et les séquences sont comparées avec les séquences disponibles dans les banques de données afin d'établir des relations phylogénétiques. La construction de génothèques a permis de déterminer la diversité microbienne de différents écosystèmes dont, entre autres, la biodiversité dans des systèmes de dénitrification (Yoshie et al., 2001; Labbé et al., 2003a; Cortes-Lorenzo et al., 2006). Elles sont également largement employées pour déterminer la diversité des gènes fonctionnels, dont ceux codant pour les enzymes de la dénitrification (Hallin et al., 2006; Wan et al., 2011).

Durant les dernières années, le domaine de l'écologie microbienne a été grandement marqué par l'avènement des techniques de séquençage à haut débit telles que le « pyrosequencing » de 454 Life science et la technologie Solexa d'Illumina. Ces technologies ont offert un moyen de séquencer des dizaines de milliers de séquences partielles d'ADN dans des échantillons environnementaux, et ce, rapidement et efficacement (Edwards et al., 2006; Biddle et al., 2008; Bowen et al., 2011; Flores et al., 2011; Nacke et al., 2011). Ces techniques permettent le séquençage direct de l'ADN d'un grand nombre d'échantillons en parallèle sans nécessité de clonage et offrent une couverture élevée de la diversité génétique permettant la détection des microorganismes rares (Sogin et al., 2006). Cependant, ces technologies sont encore jeunes et font face à certaines limites telles que la taille courte des fragments obtenus variant de 75 pb à 400 pb et l'analyse laborieuse des résultats qui nécessite des systèmes informatiques et des outils de bioinformatiques sophistiqués. Malgré tout, ces technologies évoluent rapidement, deviennent de plus en plus abordables et constitueront dans l'avenir des méthodes de choix pour l'évaluation de la diversité microbienne et fonctionnelle dans l'environnement.

2.5.1.2. Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant

L'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) est une technique permettant l'analyse de fragments, amplifiés par PCR, du gène de l'ARNr 16S ou de gènes fonctionnels. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet de déterminer directement la diversité génétique d'un échantillon sans la nécessité de cloner et séquencer les fragments d'ADN. De plus, elle constitue un outil rapide pour évaluer la dynamique des populations en réponse aux variations environnementales. Le DGGE est une méthode permettant de faire la distinction entre des fragments d'ADN doubles brins de même taille, mais ayant des séquences nucléotidiques différentes. Dans cette technique, les fragments d'ADN doubles brins sont soumis à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide ayant une concentration croissante en dénaturant. Les fragments migrent dans le gel en fonction de leurs températures de fusion. Lorsqu'ils atteignent la concentration de dénaturant correspondant à leurs températures de fusion, les fragments se dénaturent et leurs migrations arrêtent. La température de fusion étant caractéristique de la séquence, les fragments d'ADN sont ainsi séparés en fonction de leurs séquences. La technique de PCR-DGGE du gène de l'ARNr 16S a été appliquée pour la première fois au domaine de l'écologie microbienne par Muyzer et al. (1993). Depuis ce temps, le DGGE a été largement utilisé pour évaluer la diversité microbienne ou fonctionnelle dans divers environnements (Yoshie et al., 2002; Labbé et al., 2003a; Gugliandolo et al., 2011; Wan et al., 2011).

2.5.2. Étude de la fonction des microorganismes

Un des grands défis de l'écologie microbienne a longtemps été et est encore aujourd'hui l'identification des microorganismes responsables d'une activité métabolique observée dans un environnement. Traditionnellement, cette relation entre fonction et identité était établie par l'isolement de microorganismes et la détermination de leurs activités en culture pure. Cependant, il est reconnu que seule une fraction des microorganismes dans l'environnement est facilement cultivable (Amann et al., 1995; Hugenholz et al., 1998). Les techniques de biologie moléculaire telles le « stable isotope probing » (SIP) (Boschker et al., 1998; Radajewski et al., 2000) constituent de nouvelles avenues permettant maintenant aux écologistes microbiens de caractériser, dans une certaine mesure, la fonction des microorganismes dans l'environnement.

2.5.2.1. Stable isotope probing

Le SIP est sans aucun doute une des méthodes les plus en vogue à l'heure actuelle pour établir la relation entre phylogénie et fonction. Cette technique exploite la faible abondance naturelle des isotopes stables afin de déterminer les membres fonctionnellement actifs d'une communauté microbienne. Une première étape consiste à incuber l'échantillon en présence d'un substrat enrichi en isotopes stables tels que le ^{13}C , le ^{15}N ou le ^2H . Les microorganismes qui assimilent le substrat incorporent dans leurs constituants cellulaires l'isotope stable. Boschker et al. (1998) ont été les premiers à employer le marquage à l'aide d'isotopes stables, et ce, pour identifier les microorganismes responsables de la réduction du sulfate et de l'oxydation du méthane dans des sédiments aquatiques. Ils ont utilisé les acides gras phospholipidiques (PLFA) comme marqueur phylogénétique. Le PLFA-SIP offre une très grande sensibilité. Cependant, cette technique est limitée par le nombre restreint de profils lipidiques disponibles comparativement au nombre de plus en plus croissant des séquences nucléotidiques retrouvées dans les banques de données. Radajewski et al. (2000) ont de leur côté exploité l'ADN (DNA-SIP) comme biomarqueur pour l'identification de microorganismes du sol actifs dans l'assimilation du méthanol. Ils ont utilisé l'ultracentrifugation en gradient de densité de chlorure de césium afin de séparer l'ADN enrichi en isotopes stables de l'ADN provenant des microorganismes qui ont été incapables d'assimiler le substrat marqué. L'ADN génomique enrichi ainsi isolé offre la possibilité d'identifier les microorganismes en ciblant, par PCR, le gène de l'ARNr 16S, mais également les gènes codant les enzymes clés d'une voie métabolique (Dumont et al., 2011). Plus tard, la technique de SIP basée sur l'ARN a été développée. En effet, Manefield et al. (2002) ont démontré l'efficacité du RNA-SIP dans l'identification des microorganismes impliqués dans la dégradation du phénol dans un réacteur aérobie industriel. L'avantage de cette méthode repose sur la diminution du temps d'incubation et de la quantité de substrat nécessaire au marquage en raison du haut taux de synthèse de l'ARN dans les cellules actives. Le marquage de l'ADN nécessite, quant à lui, la réplication de la cellule. La principale difficulté réside dans l'obtention d'ARN de haute qualité. Jusqu'à présent le SIP a été utilisé pour identifier les microorganismes responsables de l'assimilation d'une variété de substrats tels que le méthanol, le méthane, le dioxyde de carbone, le phénol et les biphényles polychlorés, et ce, dans

divers environnements (Borodina et al., 2005; Cebon et al., 2007; Leigh et al., 2007; Neufeld et al., 2007b; Osaka et al., 2008a; Liu et al., 2011; Pratscher et al., 2011). Cependant, du fait que le SIP repose sur des processus d'assimilation, les transformations non assimilatrices demeurent en dehors du champ d'application du SIP.

3. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1

3.1. Mise en contexte de l'article 1

Le biofilm du réacteur de dénitrification du Biodôme de Montréal est une communauté microbienne complexe dont la fonction des différentes populations qui la composent demeure inconnue. Bien que faisant preuve d'une activité de dénitrification, le biofilm ou plutôt les microorganismes présents n'ont jamais permis d'atteindre la performance d'élimination du nitrate souhaitée par le Biodôme de Montréal. Le réacteur de dénitrification est alimenté au méthanol. L'utilisation du méthanol comme source de carbone est restreinte à un groupe de microorganismes spécialisés, les méthylotrophes, capables de métaboliser les composés contenant un seul atome de carbone. L'activité du réacteur repose donc sur le développement d'une flore bactérienne spécialisée, pouvant métaboliser le méthanol et dénitrifier. Certaines bactéries ont été caractérisées dans la littérature comme étant méthylotrophes dénitrifiantes telles qu'*Hyphomicrobium* et *Paracoccus*. Elles ont également été associées à des systèmes de dénitrification alimentés au méthanol. Cependant, une ambiguïté reste souvent à savoir si ces microorganismes sont responsables à la fois de la consommation du méthanol et de la dénitrification dans ces systèmes.

L'identification des populations bactériennes du biofilm a révélé la présence de bactéries affiliées, entre autres, aux *Methylophaga* sp. et aux *Hyphomicrobium* sp. Les bactéries du genre *Methylophaga* y sont retrouvées de manière abondante. Bien qu'elles soient caractérisées méthylotrophes, elles ont été décrites jusqu'à maintenant comme étant aérobies strictes. Les études réalisées précédemment n'ont pas permis de mettre en évidence l'implication des *Methylophaga* sp. dans la dénitrification ou dans l'utilisation du méthanol (Labbé et al., 2007). Nous ne savons donc pas si elles participent à l'activité de dénitrification ou si plutôt elles compétitionnent avec les bactéries dénitrifiantes pour la source de carbone réduisant ainsi l'activité du réacteur.

Une étude a été réalisée afin d'identifier les microorganismes responsables de la consommation du méthanol sous conditions de dénitrification dans le biofilm du dénitrificateur du Biodôme de Montréal. L'article 1, accepté pour publication dans *International Society for Microbial Ecology Journal*, présente les résultats de cette étude.

3.2. Contribution de l'étudiante à l'article 1

L'ensemble des travaux présentés dans cet article est le fruit d'une collaboration entre l'étudiante et chacun des co-auteurs. Le réacteur de dénitrification du Biodôme de Montréal est opéré depuis 1998 par Serge Parent (Ph.D) et le personnel de soutien du Biodôme de Montréal qui ont supervisé et aidé à l'échantillonnage du biofilm. La méthode de mesure de l'incorporation isotopique dans l'ADN a été élaborée par François Lépine (Ph.D.) avec contribution de l'étudiante. Pour le reste, la mise au point de la technique de SIP, l'ensemble des manipulations et le traitement des données ont été effectués par l'étudiante. L'article a été écrit par l'étudiante avec Richard Villemur (Ph.D) et François Lépine (Ph.D.) et vérifié par Serge Parent (Ph.D.).

3.3. Article 1: Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a *Methylophaga* strain containing two highly divergent *narG* sequences.

Julie Auclair¹, François Lépine¹, Serge Parent², Richard Villemur^{1*}

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

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

*Corresponding Author

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

Référence: Auclair, J., Lépine, F., Parent, S. et Villemur, R. (2010) Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a *Methylophaga* strain containing two highly divergent *narG* sequences. ISME Journal, vol. 4, p.1302-1313.

3.4. Résumé

Les bactéries affiliées au genre *Methylophaga* sont communément associées aux environnements marins et ont été caractérisées comme étant aérobies strictes. Il a été démontré précédemment que les *Methylophaga* sp. représentent de 50 à 70% de la population bactérienne du biofilm du réacteur de dénitrification alimenté au méthanol, utilisé pour traiter l'eau d'un aquarium marin au Biodôme de Montréal. En raison de leur caractère aérobie, il est surprenant de trouver ces bactéries en si forte concentration sous conditions anoxiques. Dans cet article, une approche combinant des méthodes dépendantes et indépendantes de la culture a permis de mettre en évidence l'implication d'une souche bactérienne affiliée au genre *Methylophaga* dans le processus de dénitrification. Le DNA-SIP, lors duquel le biofilm a été cultivé sous conditions dénitrifiantes en présence de ¹³C-méthanol, a révélé l'enrichissement d'un taxon particulier. Lors du criblage d'une génothèque du gène de l'ARN ribosomal 16S, réalisée à partir d'une fraction d'ADN ¹³C isolée par gradient de densité, 62% des séquences correspondaient à une séquence affiliée au genre *Methylophaga*. Une souche, nommée JAM1, représentant cette espèce a été isolée. La souche JAM1 peut croître en aérobie, mais aussi sous conditions dénitrifiantes en réduisant le nitrate en nitrite. Cette activité de réduction du nitrate est corrélée avec la présence et l'expression de deux gènes *narG* (*narG1* et *narG2*) distincts. *narG1* est fortement affilié au gène *narG* de *Thiobacillus denitrificans* suggérant une acquisition de *narG1* chez la souche JAM1 par transfert horizontal de gènes. Cette étude fournit les premières évidences directes de l'adaptation d'une bactérie du genre *Methylophaga* à un environnement limité en oxygène.

Mots-clés : biofilm; dénitrification; transfert horizontal de gènes; *Methylophaga*; *narG*

3.5. Abstract

Methylophaga spp. are methylotrophs commonly associated with marine environments and have been defined as strict aerobic methylotrophs. They have been shown previously to represent 50-70% of the bacterial population in the biofilm of the methanol-fed denitrification reactor treating a large seawater aquarium at the Montreal Biodome. It was therefore surprising to find such a high concentration of *Methylophaga* spp. in anoxic conditions. In this study, we showed by cultivation-independent and -dependent approaches that one *Methylophaga* strain present in the anoxic biofilm is involved in the denitrification process. DNA stable-isotope probing (SIP) experiments in which the biofilm was cultured under denitrifying conditions with ¹³C-methanol have revealed the enrichment of one particular taxon. By screening a 16S ribosomal RNA gene library derived from a ¹³C-DNA fraction of the SIP gradients, 62% of the library was composed of one sequence affiliated with the genus *Methylophaga*. One strain, named JAM1, representing this *Methylophaga* species was isolated. It grows aerobically but also under denitrifying conditions by reducing nitrate into nitrite. The nitrate-reducing activity was correlated with the presence and the expression of two highly divergent *narG* genes (*narG1* and *narG2*). *narG1* showed a high percentage of identity with the corresponding part of *narG* found in *Thiobacillus denitrificans*, which suggests a recent acquisition of *narG* in strain JAM1 by horizontal gene transfer. This study provides the first direct evidence of the adaptation of a *Methylophaga* species to an oxygen-limited environment.

Keywords: biofilm; denitrification; horizontal gene transfer; *Methylophaga*; *narG*

3.6. Introduction

Public aquariums and aquaculture tanks that are operated in closed circuit require water treatment facilities such as provision of sand filters or biological filtration systems for removing organic matter and other waste (Parent and Morin, 2000; Hamlin et al., 2008a). However, highly soluble molecules such as nitrate, which is generated from animal-derived nitrogenous compounds (that is urea), could prove to be toxic for the fish and invertebrates (Grguric et al., 2000; Parent and Morin, 2000; Hamlin et al., 2008b). For instance, in marine environments, the nitrate concentration should not exceed 20 mg NO₃⁻-N/L to protect aquatic animals (Camargo et al., 2005). On the other hand, the option of replacing the water for decreasing the nitrate concentration is expensive, especially in artificial seawater aquarium, as well as stressful to the fauna. Biological denitrification is a valuable alternative for removing nitrate from seawater (Balderston and Sieburth, 1976; Grguric et al., 2000; Tal et al., 2003). Denitrification is a process that generally occurs in the absence of oxygen and in which heterotrophic bacteria reduce nitrate into N₂ (Zumft, 1997).

In 1998, the Montreal Biodome established a methanol-fed, fluidized denitrification reactor for controlling the concentration of nitrate in its three million liter seawater aquarium wherein the concentration had reached a critical level of 200 mg NO₃⁻-N/L (Parent and Morin, 2000). Owing to the low organic charge of the seawater, methanol was used as an exogenous carbon source to sustain denitrification (Mateju et al., 1992). The bacterial biota of the denitrifying biofilm in the denitrification system was estimated to contain between 15 and 20 species, among which two methanol utilizing denitrifying bacteria (methylotrophs), *Hyphomicrobium zavarzinii* and *Paracoccus denitrificans*, were isolated (Labbé et al., 2003a). However, it was estimated by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) that more than 50% of the biofilm was composed of bacteria that belonged to the genus *Methylophaga* (Labbé et al., 2007).

Methylophaga spp. are halophilic, methylotrophic bacteria that were isolated from diverse marine environments (Janvier et al., 1985; Doronina et al., 2003a; Doronina et al., 2003b). They have been shown to be involved in methanol assimilation in marine environments (Neufeld et al., 2007b) or associated with phytoplankton that produce methanol (Janvier et al., 1985; Neufeld et al., 2008a). Thus, the presence of *Methylophaga* spp. in the methanol-fed marine reactor at the Biodome was no surprise. However, their high proportion in the denitrifying biofilm was not

expected as they have been defined as strictly aerobic (Janvier et al., 1985; Doronina et al., 2003a; Doronina et al., 2003b; Kim et al., 2007). Their presence suggested that *Methylophaga* spp. were involved in the denitrification process or were involved in crossfeeding with other denitrifying bacteria.

Some *Methylophaga* species have been shown to reduce nitrate into nitrite; however, very limited information is available from these reports regarding this activity (Doronina et al., 2003b; Kim et al., 2007). Osaka et al. (2008b) found 16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequences associated with the genus *Methylophaga* when wastewater sludge was acclimated with 4% NaCl in a methanol-fed denitrifying reactor. However, direct evidence of the denitrifying activity of *Methylophaga* spp. *in situ* has not been shown.

In this paper, we used cultivation-independent and -dependent approaches to identify the denitrifying methylotrophic bacteria present in the denitrification reactor of the Montreal Biodome. DNA stable-isotope probing (DNA-SIP) was first performed with the denitrifying biofilm in artificial seawater containing nitrate and ^{13}C -methanol. Our results indicated a specific enrichment of *Methylophaga* spp., which strongly suggested their involvement in denitrification. Then, one *Methylophaga* strain, named JAM1, representing the most dominant bacteria enriched in the SIP assay was isolated from the biofilm. It has the capacity of growing in the presence of methanol in denitrifying conditions by reducing nitrate into nitrite. This was correlated with the presence and the expression in strain JAM1 of two putative nitrate reductase genes (*narG*). This study is the first to reveal the capacity of a *Methylophaga* strain to reduce nitrate into nitrite under denitrifying conditions.

3.7. Materials and methods

3.7.1. Determination of the concentration of nitrate, nitrite and ammonium

The nitrate concentration was measured by spectrophotometry or high-performance liquid chromatography (HPLC). The NO_3^- concentration was determined by spectrophotometry using the standard method (Clesceri et al., 1998) with NaNO_3 as the standard. The nitrate and nitrite concentrations were measured using a Dionex DX 500 HPLC (Dionex Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) equipped with a IonPac AS20 column (250 mm, 4 mm ID) and coupled to an ASRS 300 4 mm suppressor operating in recycle mode and an ED-40 electrochemical detector as recommended by the manufacturer's instructions using a gradient of sodium hydroxide.

Ammonium concentration was measured by means of the colorimetric method as described by Mulvaney (1996).

3.7.2. DNA-SIP

The denitrification system at the Montreal Biodome was described in Labbé et al. (2007). The denitrifying biofilm was carefully scraped from the Bioflow 9-mm carriers (1.020 density; Rauschert, Steinwiessen, Germany) taken from the reactor and rinsed three times with artificial seawater (Labbé et al., 2007) to remove residual methanol. Incubation was carried out in 120 ml serum vials in which 1.5 g wet weight of biofilm and 30 ml of artificial seawater supplemented with 300 mg NO_3^- -N/L (21.4mM final concentration) were added. CO_2 traps (1 ml of 1M KOH) were used to prevent bacterial uptake of $^{13}\text{CO}_2$ derived from mineralization (Labbé et al., 2007). The vials were purged with nitrogen, then sealed and preincubated for 1 h before adding either ^{13}C - or ^{12}C -methanol (37.5 mM final concentration) in a 1.5 C/N ratio to remove residual oxygen. The 1.5 C/N ratio was determined earlier in our laboratory and was shown to support optimal denitrifying activity (data not shown). The vials were incubated for 7 days at room temperature. Each day, the cultures were shaken to disperse the biomass, and subsequently a 1-ml volume was taken and centrifuged. The residual nitrate concentration was measured daily in the supernatant by spectrophotometry. On the basis of the nitrate removal, methanol and nitrate were added in a 1.5 C/N ratio to maintain the denitrifying activity. Subsequently, the nitrite concentration was determined by HPLC.

The biomass from the daily samples was extracted for the total DNA. DNA extraction was carried out as described in Labbé et al. (2007). A portion of the extracted DNA was used for ^{13}C incorporation measurement in thymine by HPLC coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) in both ^{12}C - and ^{13}C methanol amended cultures. DNA (2.5 μg) was hydrolyzed with 0.5 ml of 88% formic acid at 140 °C for 45 min. The sample was flushed with nitrogen to remove the acid, and the hydrolyzed DNA was suspended in 60 ml of water containing 1% acetic acid. The separation of nitrogenous bases was achieved using an HP 1100 HPLC (Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON, Canada) equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 μm , 4.6 x 150-mm column (Agilent Technologies Canada) by isocratic elution with 1% acetic acid–water solution at a flow rate of 0.4 ml min^{-1} . The HPLC was coupled to a Quattro II triple-quadrupole mass spectrometer (Waters, Mississauga, ON, Canada) that was operated in positive electrospray ionization mode. The analyses were performed in selected ion monitoring mode using the ions

appearing at m/z 127, 128, 129, 130, 131, 132 at the retention time of thymine. The isotope incorporation percentages were calculated as the sum of the intensities of the isotopic ion peaks' area divided by the intensity of the pseudomolecular ion (m/z 127). The HPLC-MS measurements were carried out in triplicate on each DNA sample. It was found that the ^{13}C incorporation measurement in cytosine generated similar results (data not shown).

The remaining DNA samples were separated by CsCl density-gradient ultracentrifugation as described in Ginige et al. (2004), with 10 μg of DNA per centrifuge tubes (3.9 ml). Ethidium bromide was included in the gradient to visualize the efficiency of the separation. Each CsCl gradient was fractionated from the bottom of the tube to the top into 13 fractions of 275 μl and the fractions were extracted with isopropanol saturated with NaCl to remove ethidium bromide, and diluted four times; the DNA was precipitated with 2-volume ethanol and dissolved in water.

3.7.3. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rRNA gene library

The PCR protocols, the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), the extraction of DGGE bands and their reamplification, and the construction of the 16S rRNA gene library were carried out as described by Lafortune et al. (2009) using previously published primers (Table 3.1). The 16S clones were screened by PCR-DGGE, and grouped according to their migration profile. At least one representative clone of each group was sequenced. For comigration experiments, representative clones were run side by side with the heavy fractions of the ^{13}C -methanol cultures on DGGE.

3.7.4. 16S rRNA gene sequence analyses

The 16S rRNA gene sequences were examined for chimeras with BELLEROPHON (Huber et al., 2004). No chimeric sequences were detected. Using the ARB program and the ARB databases (SSURef_100_SILVA_20_03_09), sequences related to *Methylophaga* spp. were aligned with the lineage of Thiotrichales using Pt_servers for this lineage, and Fastaligner from ARB with 10 neighbors (Ludwig et al., 2004; Pruesse et al., 2007). The resulting alignments were refined by hand and then used for positioning the sequences in the ARB tree by the fast parsimony method using the pos_var_Bacteria filter. From the consensus positions in the tree, representative sequences were selected for deriving a multiple alignment sequence with the pos_var_Bacteria filter. These alignments were refined using BIOEDIT 7.0.4.1 (Hall, 1999). Phylogenetic analyses were performed using DNADIST (F84 distance method) and FITCH

(Fitch Margoliash method) and SEQBOOT/CONSENSE (bootstrap analysis) programs in PHYLIP 3.65 software package (Felsenstein, 1989).

3.7.5. Isolation of *Methylophaga* strains

The denitrifying biofilm was carefully scraped from carriers, homogenized and diluted in a 10-fold series (10^{-1} to 10^{-3}), and spread on the following agar media: R2A (Becton Dickinson Co., Cockeysville, MD, USA), ASW (Janvier et al., 1985), MSM (Kim et al., 2007), ATCC medium 1090 (marine methanol) and on artificial seawater. Artificial seawater was prepared as described above and was supplemented to obtain a final concentration of 0.3% methanol, $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ B12 vitamin and 1.5% agar. The culture media were incubated in the presence of oxygen at 30 °C for 1 week to promote the growth of *Methylophaga* species. Unique isolated colonies were picked and grown in liquid medium according to their isolation medium. DNA was extracted from 1.5 ml centrifuged cultures as described earlier (Labbé et al., 2007). To identify the strains, 25 ng of DNA was used as template to amplify the nearly fulllength 16S rRNA gene with the 27f-YM and 1541r primers (Table 3.1), and the PCR product was sequenced.

In addition to cultured isolates, *M. alcalica* ATCC BAA-297 was cultured with the NMS medium (Doronina et al., 2003b) whereas *M. marina* ATCC 35842 was cultured with the ASW medium (Janvier et al., 1985). These species were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

3.7.6. Detection of denitrification genes in the isolated strains

Deduced amino-acid sequences of the denitrification genes *narG*, *napA*, *nirK* and *cnorB* taken from type-strain bacteria were collected from protein databases (National Center for Biotechnology Information (NCBI), January 2006, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and aligned with ClustalW (Thompson et al., 1994). Degenerated oligonucleotides were designed based on the amino-acid consensus sequences, and used as primers for PCR (Table 3.1). For *nirS* and *nosZ*, we used previously published primers (Table 3.1). All these primers showed positive PCR amplifications for the respective genes with total DNA extracted from the biofilm.

3.7.7. Expression of *narG* in *Methylophaga* sp. strain JAM1

The *Methylophaga* sp. strain JAM1 was incubated in 25 ml ASW liquid medium supplemented with 200 mg NO₃⁻-N/L in a 125 ml serum vials that were flushed previously for 10 min with nitrogen gas to remove oxygen. The vials were then sealed and incubated at 30 °C with agitation (250 r.p.m.). In addition, the strains were cultured under aerobic conditions (25 ml ASW medium, 30 °C, 250 r.p.m.) either with 200 mg NO₃⁻-N/L or in the absence of nitrate. In all, 10 ml of culture was centrifuged for 8 min at 3650 g and 4 °C, and RNA was extracted from the pellet using the RiboPure-Bacteria kit (Ambion Inc., Austin, TX, USA) according to the manufacturer's specifications. The total RNA (40 µg) was treated with 20U DNase I in 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂ at 37 °C for 1 h in a 60-µl volume. Another 20 U of DNase I was added after 1 h of incubation and the reaction mix was incubated for an additional 30 min at 37 °C. DNase I was inactivated by the DNase Inactivation Reagent supplied with the RiboPure-Bacteria kit. The treated RNA (1 µg) was used for reverse transcription (RT) with 2 µM of the *narG1*-384r or *narG2*-397r primer (Table 3.1) as described earlier (Villemur et al., 2007). In all, 5 µl of the RT reaction was used for PCR amplification with the *narG1*-180f/*narG1*-384r or *narG2*-175f/*narG2*-397r primer pairs (Table 3.1) as described earlier (Villemur et al., 2007). The amplifications were performed at 94 °C for 5 min, at 56 or 57 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 72 °C for 60 s, at 94 °C for 60 s, at 56 or 57 °C for 60 s and finally an extension period of 10 min at 72 °C.

The deduced amino-acid sequences of *narG1* and *narG2* were compared against the protein databases with BLASTP (NCBI). The most related sequences of type-strain organisms were selected. The sequences were aligned with ClustalW (Thompson et al., 1994). The alignments were manually refined in BIOEDIT (Hall, 1999). Phylogenic analysis was performed using the PROTDIST (Jones—Taylor—Thornton distance method), FITCH (Fitch Margoliash method) and SEQBOOT/CONSENSE (bootstrap analysis) programs in PHYLIP 3.65 software package (Felsenstein, 1989).

Table 3.1. Oligonucleotides used as PCR primers.

Name	Sequence (5'-3')	Hybridization temperature (°C)	Primer concentration (nM)	References
Bacteria¹				
27f-YM	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	55	200	(Frank et al., 2008)
1541r	AAGGAGGTGATCCARCCGCA			
Bacteria²				
341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	55	200	(Muyzer et al., 1993)
534r	ATTACCGCGGCTGCTGG			
<i>narG</i>³				
narG-A241f	TTY TAYGAYTGGTAYGCNGA	46	500	This study
narG-C241f	TTYTAYGAYTGGTAYTGYGA		500	
narG-631r	TTRTCRTGNCCNACYTAYTG		1000	
narG1-180f ⁴	CCCTGTACGCTCGATACCA	56	200	This study
narG1-384r	GCCAGTACGCAAGGTTAAGC			
narG2-175f ⁴	TCACGCGCAATTTGAACCAC	57	200	This study
narG2-397r	TCCAACAGCGAAAAGTACCG			
<i>napA</i>³				
napA-206f	GAYCCNAA YGCNMGNCAYTGYATGGC	51	1000	This study
napA-F457r	TGYTGRTTRAANCCCATNGTCCA		500	
napA-M457r	TGYTGRTTNATNCCCATNGTCCA		500	
<i>nirS</i>				
primer F1acd	TAYCACCCSGARCCGC	57	1000	(Hallin and Lindgren, 1999)
primer R4cd	GGSTGGCCRTTCAAGTTGC			
<i>nirK</i>				
nirK-203f	TTYGTNTAYCAITGYGCNCC	56	8000	This study
nirK-326r	TCNCCYTGNCNCDDATNARRTGNGG			
<i>norB</i>³				
cnorB-V212f	TGGGTNGARGGNGTNTGGGA	51	500	This study
cnorB-T212f	TGGGTNGARGGNACNTGGGA		500	
cnorB-355r	TANGCNCCRWARAANGC		1000	
<i>nosZ</i>				
Nos661f	CGGCTGGGGGCTGACCAA	56	400	(Scala and Kerkhof, 1998)
Nos1773r	ATRTCGATCARCTGBTCGTT			

¹ The 27f-YM and 1541r primers were used to derive the 16S rRNA gene library.

² The 341f and 534r primers were used for reamplifying DNA fragments extracted from DGGE. 341F-GC had the same sequence as 341f except for the following sequence upstream: CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G, and were used with 534r for PCR-DGGE.

³ The forward primers narG-A241f/narG-C241f were used with the reverse primer narG-631r; the forward primer napA-206f with the reverse primers napA-F457r/napA-M457r; and the forward primers cnorB-V212f/cnorB-T212f with the reverse primer cnorB-355r.

⁴ The narG1-180f/narG1-384r and the narG2-175f/narG2-397r primer pairs were used for RT-PCR experiments.

3.8. Results

3.8.1. Enrichment of denitrifying methylotrophic bacteria by DNA-SIP

The biofilm taken from the denitrification reactor of the Montreal Biodome was incubated under denitrifying conditions in artificial seawater supplemented with nitrate and ^{13}C -methanol for 7 days. A control experiment was carried out with ^{12}C -methanol. The biofilm sustained denitrifying activity in both cultures (Figure 3.1a). Ammonium was not detected in the cultures (data not shown).

The ^{13}C incorporation percentages in ^{13}C -methanol cultures increased during the experiment (Figure 3.1b) and reached almost 50% after 7 days. On the basis of the minimal isotopic enrichment of 20% proposed by Radajewski et al. (2000) to obtain a clear separation of ^{13}C -DNA and ^{12}C -DNA, and to minimize the bias generated by bacterial cross-feeding, the biomass taken at day 3, for which there was 28% of ^{13}C incorporation, was chosen to extract the DNA and then to perform the CsCl density-gradient ultracentrifugations.

A bacterial diversity profile was derived for the 'light' and 'heavy' DNA fractions from the SIP CsCl gradients (Figure 3.2). There was little difference in the profiles between the heavy and the light fractions for the ^{12}C -methanol cultures, with both profiles being very similar to the one derived from the original biofilm. However, there was a clear difference in the number of distinct DGGE bands in the profile of the heavy fraction of the ^{13}C -methanol culture, reflecting ^{13}C incorporation into methylotrophic bacteria. One intense DNA band was found to dominate this profile. Sequencing of this band showed affiliation with *Methylophaga* spp. To determine the non-methylotrophic bacteria that were present in the biofilm, sequencing of some bands from the light fraction was also performed, and the bands for which readable sequences were successfully obtained showed affiliation with Oceanospirillales, *Vibrio* spp., and Rhizobiales (Figure 3.2). The band related to *Methylophaga* spp. was still present in the light fraction, at a lower intensity than the heavy fraction. This is probably because of carryover from the heavy fraction as the ^{13}C -*Methylophaga* DNA band in the heavy fraction represented a high proportion of the total DNA.

The DNA recovered from the heavy fractions of ^{13}C -methanol cultures at day 3 was used to derive a 16S rRNA gene library. The screening of 93 clones by PCR-DGGE showed seven different migration profiles. Phylogenetic analyses showed that two groups of clones (IAFJAsip1 and IAFJAsip4), which composed 69% of the screened clones, were affiliated with the genus *Methylophaga* (Table 3.2; Figure 3.3). The most abundant clones (62%; representative sequence

IAFJAsip1) were closely related (96%) to *M. alcalica* (Table 3.2). PCR-DGGE experiments with the heavy fraction (fraction 4) and IAFJAsip1 showed comigration between the most prominent band and the IAFJAsip1-derived band (data not shown).

IAFJAsip3, representing about 20% of the screened clones, showed a low-level affiliation with *M. thalassica* (93%) (Table 3.2). Phylogenetic analysis showed that IAFJAsip3 rather grouped with uncultured bacteria retrieved from different marine habitats (Figure 3.3). The other clones (10/93) were all affiliated with Proteobacteria (Table 3.2).

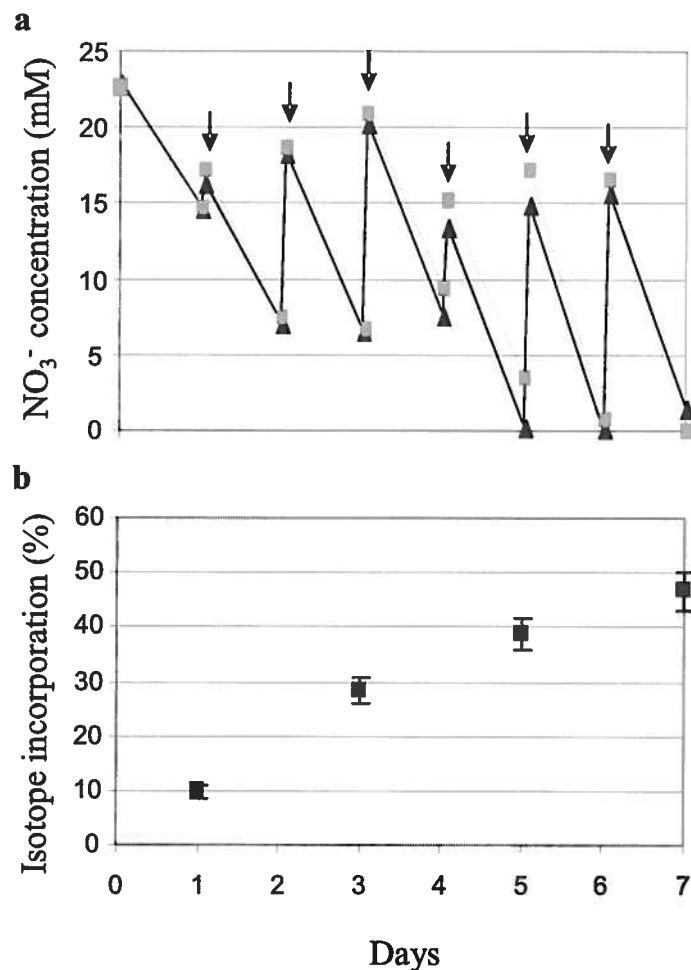


Figure 3.1. NO_x removal (a) and ^{13}C incorporation in DNA (b) during SIP cultures. (a) The biofilm taken from the denitrification reactor of the Montreal Biodome was cultured under denitrifying conditions in artificial seawater supplemented with $300\text{mg NO}_3^- \text{-N/L}$ and ^{13}C -methanol (C/N ratio of 1.5) for 7 days. Nitrate and methanol at the same C/N ratio were added on a daily basis (arrows) for maintaining the biofilm under denitrifying conditions. Total residual NO_x concentration was measured by spectrophotometry. The nitrite concentration was afterwards determined by HPLC. Nitrite accounted for the residual NO_x concentration for the first 4 days. ^{13}C -methanol (triangle) and ^{12}C -methanol (square) cultures. (b) The biomass from ^{12}C - and ^{13}C -methanol cultures was sampled on days 0, 1, 3, 5 and 7, and the total DNA was extracted. This DNA was acid hydrolyzed and thymine was analyzed by HPLC-MS for ^{13}C incorporation. Each value was subtracted with the ^{13}C incorporation percentages in thymine in the day 0 samples (before adding ^{13}C -methanol), which represented the natural abundance ^{13}C incorporation in thymine. The ^{13}C incorporation percentage for the ^{12}C -methanol cultures remained stable throughout the experiment with a percentage similar to the theoretical isotopic distribution of thymine because of the natural 1% abundance of ^{13}C (data not shown).

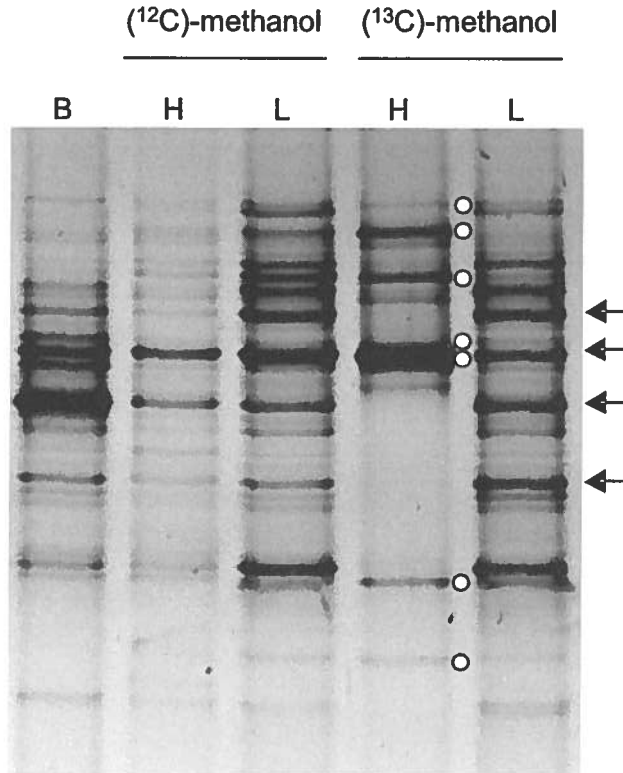


Figure 3.2. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles for the ‘light’ and ‘heavy’ DNA from the SIP CsCl gradients. DNA extracted from day 3 of the ^{12}C - and ^{13}C -methanol cultures was subjected to CsCl gradient ultracentrifugations, and fractionated. PCR was performed on each fraction for part of the 16S rRNA gene sequences, and the resulting amplicons were separated by DGGE. DGGE migration profiles from representatives of the heavy (fraction 4) and light (fraction 7) fractions are shown. Migrating profile of DNA extracted from the original biofilm before the beginning of the experiment is included for comparison. Dots: correspondence between the 16S rRNA clones and the heavy DNA fraction of the ^{13}C -methanol culture as determined by PCR-DGGE comigration experiments. From top to bottom: IAFJAsip25, IAFJAsip3, IAFJAsip28, IAFJAsip4, IAFJAsip1, IAFJAsip30 and IAFJAsip2 (see Table 3.2). Arrows: these DNA bands were extracted from gel, reamplified and sequenced. From the top to the bottom, bands were affiliated with Oceanospirillales, *Methylophaga* spp., *Vibrio* spp. and Rhizobiales, respectively. H: heavy fraction; L: light fraction; B: biofilm.

Table 3.2. Closest affiliation of the screened clones from the 16S rDNA library derived from the heavy fraction (fraction 4) of (¹³C)-methanol cultures.

Affiliation	Number of clones	Representative clone	%	Accession identity number
-Gamma-Proteobacteria; Thiotrichales; <i>Piscirickettsiaceae</i> (83/93)				
<i>Methylophaga alcalica</i>	58/93	IAFJAsip1	96	GU567807
<i>Methylophaga thalassica</i>	19/93	IAFJAsip3	93	GU567809
<i>Methylophaga marina</i>	6/93	IAFJAsip4	95	GU567810
-Gamma-Proteobacteria; unclassified Gamma-Proteobacteria				
<i>Sedimenticola selenatireducens</i>	1/93	IAFJAsip25	98	GU567811
-Delta-Proteobacteria; Bdellovibrionales; <i>Bacteriovoracaceae</i>				
<i>Bacteriovorax</i> sp.	4/93	IAFJAsip28	98	GU567812
-Delta-Proteobacteria	3/93	IAFJAsip2	<90	GU567808
-Alpha-Proteobacteria; Rhodobacterales; <i>Rhodobacteraceae</i>				
<i>Rhodovulum</i> sp.	2/93	IAFJAsip30	96	GU567813

DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis.

Ninety-three clones were screened by PCR-DGGE and classified based on their migration profile. One to three representative clones were sequenced.

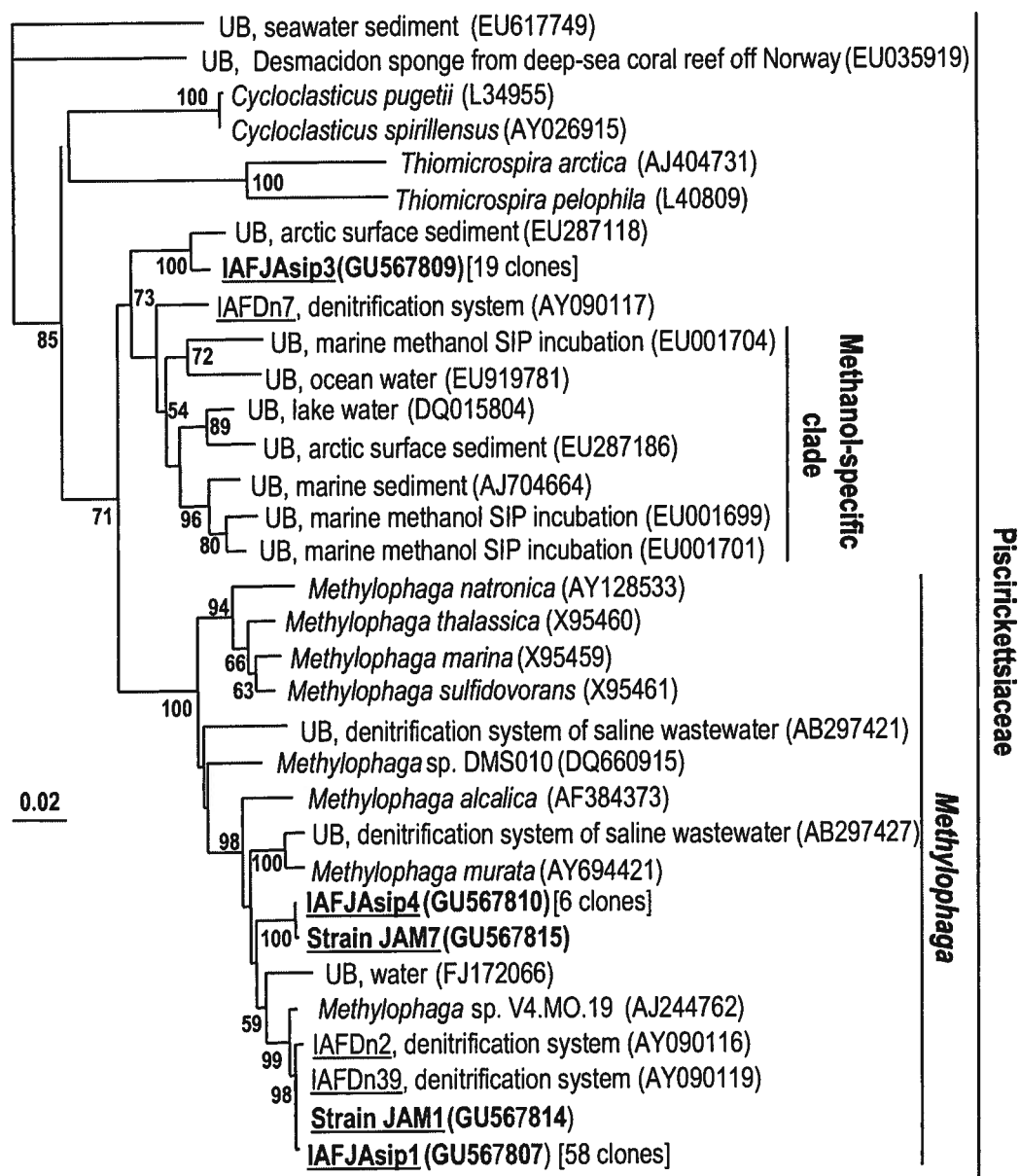


Figure 3.3. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences affiliated with the genus *Methylophaga*. Unrooted phylogenetic trees showed the evolutionary relationship among 16S rRNA gene sequences from clones (IAFJAsip1, IAFJAsip3 and IAFJAsip4) and strains (JAM1 and JAM7), and from representative members of the genus *Methylophaga* and closely related *Piscirickettsiaceae*. Trees were inferred from a matrix of pairwise distance using aligned sequences containing 789 positions. The scale bar represents nucleotide substitutions per position. Bootstrap values above 50% are indicated at the branches. GenBank accession numbers are in parentheses beside each species name. The number of clones retrieved from the 16S rRNA gene library and represented by IAFJAsip1, IAFJAsip3 and IAFJAsip4 is indicated. UB: uncultured bacterium.

3.8.2. Isolation of *Methylophaga* strains from the biofilm

Five different strains were isolated when the biofilm was spread on different solid media in aerobic conditions to isolate *Methylophaga* colonies. The analyses of 16S rRNA gene sequences showed that strains JAM1 and JAM7 were related (96%) to *M. alcalica* and *M. murata*, respectively (Figure 3.3). These two strains were both isolated from the ASW and artificial seawater media. The three other strains were affiliated with the genera *Bacillus* (99%), *Halomonas* (99%) and *Vibrio* (98%). The 16S rRNA gene sequence of strain JAM1 has only one nucleotide difference with IAFJAsip1. This result suggests that the *Methylophaga* sp. strain JAM1 represents the most abundant bacterial species in the biofilm.

The five strains were tested for their denitrification capacity. No significant growth or nitrate reduction occurred under denitrifying conditions with the *Bacillus*, *Halomonas* and *Vibrio* strains or with the *Methylophaga* sp. strain JAM7 (data not shown). However, nitrate was completely depleted by strain JAM1 in 10 h (Figure 3.4a), with equimolar production of nitrite. Moreover, nitrate reduction was observed when strain JAM1 was cultured in the presence of nitrate and oxygen (Figure 3.4a). Reduction of nitrate into nitrite and growth were not observed when *M. alcalica* or *M. marina* was cultured under denitrifying conditions (data not shown).

Growth was observed when strain JAM1 was cultured with methanol and nitrate in the presence or the absence of oxygen (Figure 3.4b). Microbial flocs and attachment of the biomass to glass surface were observed during the growth. Aerobic conditions resulted in an increased growth yield, especially when nitrate was not present (Figure 3.4b). This difference could be explained by the low energetic yield of nitrate respiration when compared with oxygen respiration and by the accumulation of the toxic nitrite. There was a fourfold decrease in biomass when strain JAM1 was cultured aerobically in presence of 0.36 mM (5 mg l⁻¹) nitrite at the beginning of the culture, and no growth occurred in the presence of 0.71 mM (10 mg l⁻¹) nitrite (Figure 3.4c).

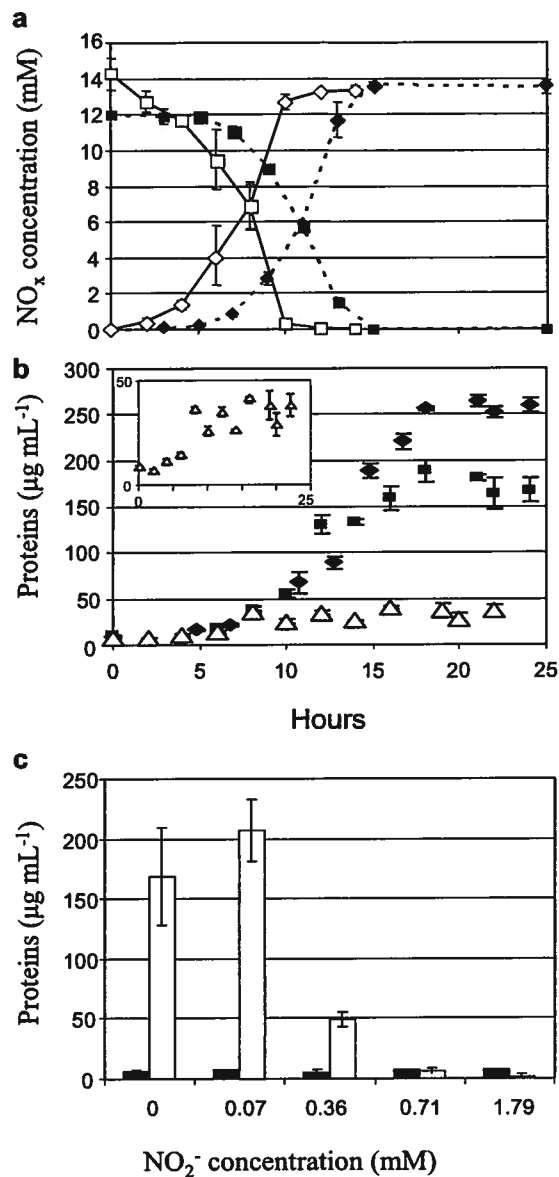


Figure 3.4. Growth of *Methylophaga* sp. strain JAM1 under aerobic and denitrifying conditions. (a) ASW medium supplemented with 200 mg NO₃⁻-N/L was inoculated with strain JAM1 (10 mg protein per ml, final concentration). This was incubated at 30 °C for 3 days in the absence of oxygen (—) or in the presence of oxygen (- - -). At regular intervals, a 1-ml sample was taken and centrifuged. The supernatant was used for measuring the nitrate (square) and nitrite (diamond) concentrations by HPLC. (b) Strain JAM1 was cultured with methanol and nitrate in the absence of oxygen (triangle), with nitrate in the presence of oxygen (square) and with oxygen in the absence of nitrate (diamond). Growth was measured by protein concentration. The inserted graph is for better visualization of growth under denitrifying conditions. (c) Nitrite toxicity to *Methylophaga* sp. strain JAM1. Strain JAM1 was cultured aerobically in the absence of nitrate, but in presence of different concentrations of nitrite at the beginning of the culture. Growth was measured by protein concentration at time 0 (black bars) and after 24 h (white bars).

3.8.3. Detection of denitrification genes in *Methylophaga* strains and their expression

Detection of the different reductases involved in denitrification such as *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB* and *nosZ* sequences in the *Methylophaga* strains was assessed with degenerated PCR primers (Table 3.1). PCR amplifications occurred with the *narG* primers on DNA extracted from strain JAM1. Subsequent cloning of the PCR product showed that two sequences related to *narG* were present in strain JAM1. Using specific pairs of primers for each of these *narG*, PCR amplifications were still occurring, confirming the presence of these two genes in the JAM1 genome. No PCR amplification occurred with primers targeting sequences related to *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB* and *nosZ* in strain JAM1. There was no PCR amplification with primers targeting all these genes, including *narG*, with the *Methylophaga* sp. strain JAM7, *M. alcalica* and *M. marina*.

The *narG1* and *narG2* cloned sequences contain each a continuous coding frame of 359 and 370 codons, respectively. They share 61% identity in their nucleic sequence and 55% identity in the deduced amino-acid sequence (65% similarity). Phylogenetic analyses showed that NarG1 has a high percentage of identity (88%; 93% similarity) to the corresponding sequence of NarG in *Thiobacillus denitrificans* (Figure 3.5). The phylogenetic analyses also showed the NarG2 affiliation with the Gamma-Proteobacteria.

The expression of *narG1* and *narG2* was monitored by RT-PCR in *Methylophaga* sp. strain JAM1 (Figure 3.6). *narG1* and *narG2* were expressed under denitrifying conditions but also in the presence of both oxygen and nitrate. Finally, *narG1* and *narG2* were expressed under aerobic conditions in the absence of nitrate.

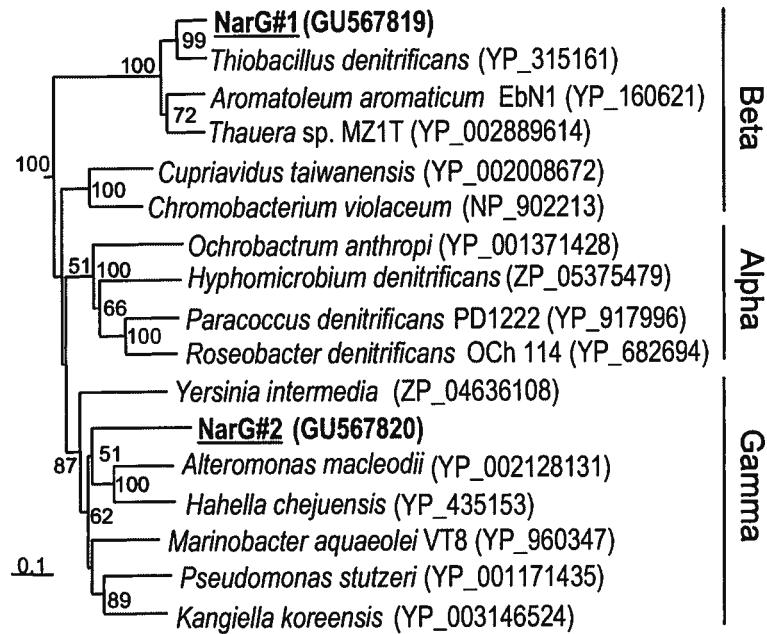


Figure 3.5. Phylogenetic tree of *narG* deduced amino-acid sequences of *Methylophaga* sp. strain JAM1. Unrooted phylogenetic trees showed the evolutionary relationship of NarG1 and NarG2, and representative NarG sequences affiliated with the Beta-, Alpha- and Gamma-Proteobacteria. Trees were inferred from a matrix of pairwise distance using aligned sequences containing 382 positions. The scale bar represents amino-acid substitutions per position. Bootstrap values above 50% are indicated at the branches. NarG sequences of *Bacillus licheniformis* (AAU40964) and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (CAB09020) were used as outgroups. Outgroups were not included for clarity. GenBank accession numbers are indicated beside species name in parentheses.

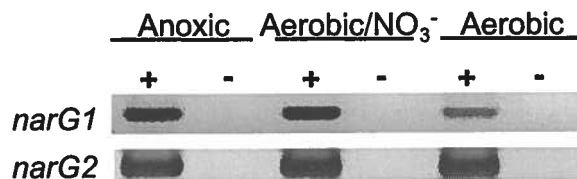


Figure 3.6. Expression of *narG1* and *narG2* in *Methylophaga* sp. strain JAM1. RT-PCR were performed on total RNA extracted from strain JAM1 cultured under anoxic (absence of oxygen and presence of nitrate) or aerobic (supplemented or not with nitrate) conditions. PCR products were run onto agarose gel electrophoresis. +: RT-PCR with reverse transcriptase, -: RT-PCR without reverse transcriptase (negative control).

3.9. Discussion

By using cultivation-independent and -dependent approaches, we clearly showed the involvement of the dissimilatory reduction of nitrate by one *Methylophaga* strain present in the biofilm of the denitrification reactor at the Montreal Biodome. The DNA-SIP experiments and the subsequent screening of the 16S rRNA gene library showed a clear enrichment of one bacterial species in the ^{13}C fractions that was affiliated with the genus *Methylophaga*. Cultivation approach allowed the isolation of this *Methylophaga* strain, JAM1, from the biofilm, which had the capacity to reduce nitrate into nitrite, but not further. The 16S rRNA gene sequence of strain JAM1 is almost identical to clone IAFDn39 (1-nt difference), the most numerous clones present in the 16S rRNA gene library of the biofilm reported by Labbé et al. (2003a). This suggests that JAM1 represents the major bacteria in the biofilm of the denitrification reactor of the Montreal Biodome.

These results are in contradiction with the previously obtained results by microautoradiography coupled with FISH (MAR-FISH) (Labbé et al., 2007). In the MAR-FISH experiments, the denitrifying biofilm was incubated for 17 h with ^{14}C -methanol under denitrifying conditions. No positive MAR response was obtained for *Methylophaga* spp. suggesting that *Methylophaga* spp. was not involved in methanol consumption under these conditions. One possible explanation is that the incubation time of 17 h was insufficient for *Methylophaga* spp. to assimilate enough ^{14}C -methanol under denitrifying conditions and to be detected by MAR-FISH. In fact, Figure 3.1 shows that there was < 10% ^{13}C incorporation in the biofilm after 17 h under denitrifying conditions.

16S rRNA gene sequences affiliated with the genus *Methylophaga* were observed elsewhere in anoxic environments. About 10% of the population of a methanol-fed denitrification reactor for the treatment of industrial saline wastewater was reported to be affiliated with this genus (Osaka et al., 2008b). In another study involving an offshore oil field, deoxygenated seawater was injected into the underground oil reservoir to increase pressure and oil recovery. To avoid souring, nitrate was added to the deoxygenated seawater to favour denitrifying conditions to prevent the growth of sulfate-reducing bacteria. The deoxygenation system used methanol in the presence of a catalyst to consume O_2 . Schwermer et al. (2008) studied the changes in the bacterial biota in the biofilm that developed in the pipes when nitrate was added. They observed an enrichment of 16S rRNA gene sequences related to *Methylophaga* spp., which represented

more than 50% of the 16S rRNA gene libraries. Residual methanol was probably present in effluent of the deoxygenation system that favoured the growth of *Methylophaga* spp. in the pipes. These results suggested that *Methylophaga* spp. could adapt to anoxic conditions. Unfortunately, the 16S rRNA gene sequences of this study were not available and no phylogenetic analysis could have been performed with our sequences.

This study is the first to reveal the capacity of a *Methylophaga* species to reduce nitrate into nitrite under denitrifying conditions. This was supported by growth assays, and the detection of two putative highly divergent *narG* gene sequences (*narG1* and *narG2*) and their expression in strain JAM1 growing under denitrifying conditions. Some *Methylophaga* species have been previously reported to reduce nitrate into nitrite but only under aerobic conditions (Urakami and Komagata, 1987; Doronina et al., 2003a). These studies, however, did not assay for the presence of the nitrate reductases *narG* or *napA*. No such genes were found in the only available *Methylophaga* genome sequence from *M. thiooxidans* DMS010 (GenBank accession number ABXT000000000), and there is no indication as to whether *M. thiooxidans* could reduce nitrate into nitrite (Schäfer, 2007). Finally, *narG* or *napA*, or any other denitrification genes were not detected in *M. alcalica* or *M. marina* with the primers used in our study.

The expression of *narG1* and *narG2* in strain JAM1 was also observed under aerobic conditions with or without nitrate addition, suggesting the constitutive expression of these genes. Aerobic nitrate respiration has been shown in a number of bacteria (Davies et al., 1989; Robertson et al., 1989). In *Thiosphaera pantotropha*, also known as *Paracoccus pantotrophus*, the simultaneous use of oxygen and nitrate increases the specific growth rate (Robertson and Kuenen, 1984; Kelly et al., 2006). It has also been suggested that the presence of a constitutive enzyme allows for a better adaptation to oxygen concentration changes in the environment (Robertson and Kuenen, 1984). Recently, Gao et al. (2010) observed high rate of aerobic denitrification in marine coastal sediments, which may result from adaptation of denitrifying bacteria to tidally induced redox oscillations. Several lines of evidence have linked the aerobic nitrate-reducing activity to the periplasmic nitrate reductase (Nap) (Bell et al., 1990; Carter et al., 1995). The gene encoding for NapA was not detected in strain JAM1 with our PCR primers. Another explanation for the nitrate reduction in the presence of oxygen is the formation of anoxic zone in the microbial clumps, allowing for nitrate reduction in the absence of oxygen inside the clumps.

The deduced amino-acid sequence of *narG1* showed a high identity percentage (88%) with the corresponding part of NarG of *T. denitrificans*. This species belongs to the Beta subdivision of Proteobacteria, which suggests that strain JAM1 acquired *narG* by horizontal gene transfer. NarG2 clustered with the NarG sequences of the Gamma-Proteobacteria, suggesting that this gene is indigenous to the genus *Methylophaga*, or was acquired from another Gamma-Proteobacterium. Multiple copies of *narG*, with some of which clustered distantly from each other, have been observed in *Escherichia coli*, *Burkholderia pseudomallei* and *Ralstonia pickettii* 12J (Philippot, 2002; Palmer et al., 2009). Palmer et al. (2009) suggesting that two *narG* genes would originate from different lineage if their sequences were < 67% similar in their nucleic acid sequence. As *narG1* and *narG2* are 61% similar in their nucleic acid sequences, it reinforces the hypothesis of horizontal gene transfer of *narG1* to strain JAM1.

A substantial number of bacterial species, many in marine environments (Zobell, 1946), are able to reduce nitrate into nitrite. Nitrite can be converted into N₂ by denitrification and by anaerobic ammonium oxidation (anammox), or into ammonium by means of dissimilatory nitrate reduction to ammonium. Low nitrite concentration initially added to the medium affected the growth of strain JAM1. However, nitrite accumulation during the SIP cultures was not observed, which suggests that denitrifying microorganisms in the biofilm used nitrite produced by the strain JAM1 and thus prevented its toxic effect.

The 16S rRNA gene library from the ¹³C-DNA showed the affiliation of one other 16S rRNA gene sequence (IAFJAsip4) with the genus *Methylophaga*. In the 16S rRNA gene library derived from the biofilm, Labbé et al. (2003a) reported one other sequence, besides IAFDn39, affiliated with the genus *Methylophaga* (IAFDn2). These results suggest that several *Methylophaga* species lived in the biofilm. On the basis of their low abundance in the two screened 16S rRNA gene libraries, we hypothesize that these *Methylophaga* species were not capable of using nitrate for their growth as observed with strain JAM7. Residual dissolved oxygen (0.5 p.p.m.) was present in the denitrification unit of the Montreal Biodome, which may have initially sustained the growth of non-nitrate-reducing bacteria such as JAM7 (Labbé et al., 2007). Crossfeeding could explain their presence in the SIP assay where absence of residual oxygen occurred.

Neufeld et al. (2007b) performed SIP experiments with ¹³C-methanol to examine the diversity of methylotrophic bacteria in coastal seawater. Besides finding 16S rRNA gene

sequences affiliated with the genus *Methylophaga*, a distinct clade closely related to *Methylophaga* spp. was found. The authors suggested that these sequences could represent a methanol-specific clade of marine methylotrophs. Phylogenetic analyses showed that IAFJAsip3 and IAFDn7 clustered with this clade (Figure 3.3). This suggests that the denitrifying biofilm could be the reservoir of uncharacterized marine methylotroph bacteria.

A number of studies have highlighted the implication of *Methylophaga* species in the biogeochemical cycling of methanol in marine environments using independent-cultured techniques (Neufeld et al., 2007b; Neufeld et al., 2008a; Neufeld et al., 2008b). Regarding the presence of *Methylophaga* spp. in such environments and the demonstration of the anaerobic nitrate-reducing activity of *Methylophaga* sp. JAM1, *Methylophaga* spp. could contribute, by the formation of nitrite, to the nitrogen dissimilation in the oxygen-limited zone of the ocean. For instance, they could provide the nitrite needed by the anammox bacteria (Strous et al., 1999b; Lam et al., 2009) or be reduced into N₂ by denitrifying bacteria.

Approximately 10% of the 16S rRNA gene library of the ¹³C fractions was related to species found in marine environments. With the exception for the clone IAFJAsip25 affiliated with *Sedimenticola selenatireducens*, which is known to reduce nitrate and nitrite under denitrifying conditions (Narasingarao and Haggblom, 2006), none of clones were affiliated with bacteria known to denitrify or to reduce nitrate into nitrite. However, one sequence was related to *Bacteriovorax* sp., which suggests that bacteria devourers were present in the biofilm that probably fed on the denitrifying methylotrophic bacteria. *Hyphomicrobium* spp. was shown to represent 8% of the bacterial population in the biofilm as determined by FISH (Labbé et al., 2007). The absence of detected isotope incorporation into the DNA of *Hyphomicrobium* spp. during the SIP experiments could be connected with their slow growth rate (division time of about 10 h) (Matzen and Hirsch, 1982).

This study presents the first direct evidence of the adaptation of a *Methylophaga* strain in a limited oxygen environment. The fitness of *Methylophaga* spp. for marine environments could have allowed efficient colonization on the fluidized supports by strain JAM1 in the reactor. Furthermore, the abundance of methanol in the denitrification system and the presence of denitrifying bacteria such as *Hyphomicrobium* spp. that can consume the toxic nitrite could have allowed the development of a high proportion of this *Methylophaga* strain in the biofilm. In return, it could have provided subproducts of their metabolism to the denitrifying bacteria.

3.10. Acknowledgements

This research was supported by the Montreal Biodome, by two scholarships to JA from the Fondation Armand- Frappier and the Fonds de recherche sur la nature et les technologies du Québec, as well as by a grant to RV from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We are grateful to Sylvain Milot, Roger Dubuc, Maxime Hémond and the engineering staff of the Biodome for their technical support.

4. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2

4.1. Mise en contexte de l'article 2

L'utilisation des méthodes indépendantes de la culture a permis au cours des dernières années d'élargir notre perception de la diversité dénitrifiante dans divers environnements, mettant en évidence une variété d'organismes dénitrifiants non répertoriés par les méthodes dépendantes de la culture. Les études dépendantes de la culture réalisées à partir du biofilm dénitrifiants ont permis l'isolement d'*Hyphomicrobium* sp. NL23 et *Paracoccus* sp. NL8, lesquelles sont dénitrifiantes, ainsi que de *Methylophaga* sp. JAM1 et *Nitratireductor aquibiodomus* qui ont la capacité de réduire de NO_3^- en NO_2^- . Les souches NL23 et JAM1 sont abondantes dans le biofilm alors que NL8 et *N. aquibiodomus* y sont présentes en faible concentration (non détectées par PCR à partir de l'ADN du biofilm). Bien que ces études aient mis en évidence la présence de microorganismes dénitrifiants et réducteurs de nitrate dans le biofilm, nous croyons qu'il renferme une diversité dénitrifiante plus complexe. Ces microorganismes pourraient jouer un rôle important dans l'activité de dénitrification du réacteur du Biodôme de Montréal.

Une étude a donc été réalisée afin de caractériser l'ensemble de la diversité fonctionnelle dénitrifiante du biofilm. Une approche indépendante de la culture a été employée et les résultats obtenus sont présentés dans l'article 2 qui a été soumis à *Environmental Microbiology* le 9 mai 2011.

4.2. Contribution de l'étudiante à l'article 2

Les travaux présentés dans cet article ont été réalisés par l'étudiante sous la supervision de Richard Villemur (Ph.D). L'isolement d'*Hyphomicrobium* sp. NL23 avait été réalisé lors d'une étude précédente par Normand Labbé (Labbé et al., 2003a). L'article a été écrit par l'étudiante et R. Villemur (Ph.D.) et commenté par Serge Parent (Ph.D.).

4.3. Article 2: Functional diversity in the biofilm of the methanol-fed, marine denitrification system at the Montreal Biodome.

Julie Auclair¹, Serge Parent² and Richard Villemur^{1*}

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

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

***Corresponding author:**

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

richard.villemur@iaf.inrs.ca

Tel: 450-687-5010 #4611

Fax: 450-686-5501

Running title:

Functional diversity of a marine denitrifying biofilm

Cet article a été soumis au journal *Environmental Microbiology* le 9 mai 2011

4.4. Résumé

Le nitrate est toxique pour les organismes aquatiques et son accumulation représente une problématique sérieuse rencontrée dans les aquariums marins publics opérés en circuit fermé. Le Biodôme de Montréal opère un réacteur de dénitrification à lit mobile pour éliminer le nitrate son aquarium marin, le Saint-Laurent Marin. Les microorganismes naturellement présents dans l'affluent du système de dénitrification ont colonisé les supports du réacteur pour former un biofilm. La composition microbienne du biofilm a été précédemment caractérisée par l'utilisation de méthodes de culture et par la construction de génothèques du gène de l'ARN ribosomal 16S. Cependant, nous croyons que peu d'informations concernant les microorganismes directement impliqués dans la dénitrification ont été obtenues par ces approches. Dans cet article, la diversité fonctionnelle du biofilm a été analysée par l'étude des séquences des gènes *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *qnorB* et *nosZ*. Au total, 25 séquences affiliées à ces gènes ont été détectées dans le biofilm. Parmi celles-ci, les gènes *napA*, *nirK*, *cnorB* et *nosZ* d'*Hyphomicrobium* sp. NL23 et les gènes *narG1* et *narG2* de *Methylophaga* sp. JAM1; deux souches précédemment isolées à partir du biofilm. Les gènes *narG* et *napA*, pouvant appartenir aux bactéries réductrices de nitrate ou dénitrifiantes, ainsi que *nirS* et *nirK*, retrouvés chez les bactéries dénitrifiantes, ont été quantifiés par qPCR. Les gènes les plus abondants étaient associés à *Methylophaga* sp. JAM1 et *Hyphomicrobium* sp. NL23. Les autres gènes étaient de 10 à 10000 fois moins abondants suggérant une implication mineure des populations à qui appartiennent ces gènes dans le procédé de dénitrification. L'étude de l'expression des gènes, par RT-PCR, a permis de détecter dans l'ARN extrait du biofilm les transcrits des gènes *nirK*, *cnorB* et *nosZ* d'*Hyphomicrobium* sp. NL23, mais pas *napA*. Le transcrit du gène *narG1* de *Methylophaga* sp. JAM1 a également été détecté. Nos résultats montrent la prédominance de *Methylophaga* sp. JAM1 et *Hyphomicrobium* sp. NL23 dans le biofilm. De plus, ils suggèrent qu'*Hyphomicrobium* sp. NL23 utilisent directement le nitrite présent dans le biofilm, généré par les bactéries réductrices de nitrate telles *Methylophaga* sp. JAM1.

4.5. Abstract

Nitrate can be a serious problem in closed-circuit seawater public aquarium as its accumulation can be toxic for the exposed organisms. A moving bed biofilm denitrification reactor was installed at the Montreal Biodome to treat its seawater aquarium. Natural-occurring microorganisms from the seawater affluent have colonized the reactor carriers to form a denitrifying biofilm. We previously characterized this biofilm by culture methods and by 16S ribosomal gene libraries to determine the composition of the microbial biota. We believe that limited information about microorganisms directly involved in denitrification was obtained by these approaches. Here, we investigate the functional diversity of this biofilm by isolating gene sequences related to *narG*, *napA*, *nirK*, *nirS*, *cnorB*, *qnorB* and *nosZ*. A total of 25 sequences related to these genes were retrieved from the biofilm. Among these sequences, the corresponding *napA*, *nirK*, *cnorB* and *nosZ* sequences were also found in *Hyphomicrobium* sp. NL23 and two corresponding *narG* in *Methylophaga* sp. JAM1 (*narG1* and *narG2*); two bacterial strains previously isolated from this biofilm. To assess the abundance of denitrifiers and nitrate respirers in the biofilm, the level of the all the *narG*, *napA*, *nirS*, and *nirK* sequences found in biofilm was determined by real-time PCR. The most abundant genes were associated with *Methylophaga* sp. JAM1 and *Hyphomicrobium* sp. NL23. The other genes were 10 to 10000 times less abundant, which suggests minor involvement of bacteria carrying these genes in the denitrification process. The *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nirK*, *cnorB* and *nosZ* transcripts were detected in the biofilm but not *napA*, and only the *Methylophaga* sp. JAM1 *narG1* transcripts were detected. Our results showed the predominance of *Methylophaga* sp. JAM1 and *Hyphomicrobium* sp. NL23 in the biofilm. It also suggests that *Hyphomicrobium* sp. NL23 used directly the nitrite present in the biofilm generated by nitrate-respirers such as *Methylophaga* sp. JAM1.

4.6. Introduction

Nitrate is a soluble molecule that has proven to be toxic at high concentrations. In marine environments, the nitrate concentration should not exceed 20 mg NO₃⁻-N/L to protect fish and invertebrates from the adverse effects of nitrate (Camargo et al., 2005). In closed marine facilities such as public aquariums or aquaculture tanks, nitrate can exceed such concentration (Grguric et al., 2000; Parent and Morin, 2000), and maintaining the concentration below this level involved frequent and expensive replacement of the seawater. Biological denitrification is a valuable alternative for removing nitrate from seawater (Balderston and Sieburth, 1976; Sauthier et al., 1998; Grguric et al., 2000; Tal et al., 2003; Visvanathan et al., 2008). Denitrification is a stepwise respiratory process in which microorganisms reduce nitrate (NO₃⁻) or nitrite (NO₂⁻) to nitric oxide (NO), nitrous oxide (N₂O) and dinitrogen (N₂) gases. The four reactions of the denitrification pathway are performed by nitrate reductase, nitrite reductase, nitric oxide reductase and nitrous oxide reductase.

Few studies on the microbial diversity of seawater or saltwater denitrification systems were reported (Yoshie et al., 2001; Labbé et al., 2003a; Yoshie et al., 2004b; Cortes-Lorenzo et al., 2006; Yoshie et al., 2006). For instances, Cortés-Lorenzo et al. (2006) found that bacteria in the anoxic column of a nitrification/denitrification system for the removal of ammonia and phenol from industrial saline wastewater were related to marine Alpha-Proteobacteria, mainly grouping with the genus *Roseobacter*. Yoshie et al. (2006) observed that species affiliated with the genera *Halomonas* and *Marinobacter* were dominant in an acetate-fed denitrification process to remove nitrate under high saline conditions. However, these studies are mainly based on the analysis of the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene. Denitrification can be performed by multitude of microorganisms belonging to diverse phylogenetic groups (Shapleigh, 2006). As a result, it is not ideal to use 16S rRNA gene sequences to identify denitrifying bacteria in the environment. During the last decade, detection of the functional genes encoding for the different denitrification reductases, such as *narG*, *napA*, *nirK*, *nirS*, *cnorB*, *qnorB* and *nosZ*, were shown to be a more effective way to study the diversity of denitrifying populations (Braker et al., 1998; Scala and Kerkhof, 1998; Flanagan et al., 1999; Gregory et al., 2000; Braker and Tiedje, 2003).

In 1998, the Montreal Biodome established a methanol-fed denitrification reactor to control the concentration of nitrate in its 3 million liter seawater aquarium following an increase of the nitrate concentration to a critical level of 200 mg NO₃⁻-N/L (Parent and Morin, 2000). This

complete-mix reactor is composed of carriers on which naturally occurring microorganisms from the seawater affluent have colonized to form a denitrifying biofilm. In previous studies, we used culture-dependent and culture-independent methods to determine the composition of the microbial biota of the biofilm. We isolated four bacterial strains: the denitrifiers *Hyphomicrobium* sp. NL23 (closely related to the species *zavarzini*) and *Paracoccus* sp. NL8 (closely related to the species *denitrificans*), and the nitrate-reducing bacteria *Methylophaga* sp. JAM1, and *Nitratreductor aquibiodomus* (Labbé et al., 2003a; Labbé et al., 2004; Auclair et al., 2010). We estimated, using the 16S rRNA gene library, that the number of the most abundant bacterial species in the biofilm is between 15 and 20 (Labbé et al., 2003a), among which sequences related to *Hyphomicrobium* spp. and *Methylophaga* spp. were identified, but not to *Paracoccus* spp. and *N. aquibiodomus*. Finally, fluorescent *in situ* hybridization experiments showed that *Methylophaga* spp. and *Hyphomicrobium* spp. composed more than 50% of the biofilm (Labbé et al., 2007).

Despite the abundance of *Methylophaga* spp. and *Hyphomicrobium* spp. in the biofilm, and the presence of *Paracoccus* sp. and *N. aquibiodomus* probably in low concentration, we believed that other denitrifying bacteria and nitrate-reducing bacteria were present in the biofilm and that these bacteria may play important role in the denitrifying process. In this paper, we further characterized the bacterial composition of the biofilm by detecting functional genes encoding the different denitrification reductases and by determining whether they were expressed. Finally, we determined by real-time PCR (qPCR) the concentrations of the different *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK* sequences to assess the level of denitrifiers and nitrate-reducing bacteria in the biofilm.

4.7. Experimental procedures

4.7.1. SLM denitrification system

The denitrification system of the Montreal Biodome consisted of a 1 m³ fixed-bed deaeration tank, a 1 m³ moving bed biofilm reactor (MBBR) for denitrification and an overflow tank operated in parallel to the main life support system. The deaeration tank and denitrification reactor were both methanol-fed. The denitrification reactor were filled with 0.3 m³ of Bioflow[®] 9 mm carriers (1.020 density; Rauschert, Steinwiessen, Germany) for biofilm colonization. In the

MBBR, carriers are continuously kept in motion by hydraulic flow, assuring that the carriers in the reactor were completely mixed.

4.7.2. DNA extraction

DNA extraction from the biofilm was performed in triplicate. For each replicate, the biofilm was scraped from five carriers, pooled and rinsed with TEN (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, and 150 mM NaCl). DNA was extracted by bead beating method as previously described (Labbé et al., 2003a). Culture of *Hyphomicrobium* sp. NL23 and its DNA extraction were carried out as previously described (Labbé et al., 2003a).

4.7.3. Gene libraries

A total of 100 ng of biofilm DNA or 25 ng of strain NL23 DNA was used as a template for the PCR detection of *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *qnorB* and *nosZ* using degenerate primers (Table 4.1). For *narG*, *napA*, *nirK* and *cnorB*, PCR amplifications were performed in 50 µl reaction volume with 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 µg of bovine serum albumin (BSA), 200 µM dNTP, and 2.5 U of rTaq DNA polymerase (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Amplifications were done at 94°C for 5 min, at the annealing temperature for 5 min (Table 4.1), follow by 30 cycles at 72°C for 1 min, 94°C for 1 min, at the annealing temperature for 1 min, and finally an extension period of 10 min at 72°C. Amplifications of *nirS*, *qnorB* and *nosZ* were performed as described previously (Scala and Kerkhof, 1998; Hallin and Lindgren, 1999; Braker and Tiedje, 2003). For each biofilm DNA replicate, one PCR amplification was performed. The three PCR products were then pooled. PCR products of the expected size were purified by agarose gel extraction with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada) before ligation.

PCR products were cloned in a T-vector (pGEM[®]-T Easy Vector System, Promega, Madison, WI) and transformed in DH5α[™] Chemically Competent *Escherichia coli* (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON) in accordance with manufacturer's instructions. Plasmids were isolated by the method described by Serghini et al. (1989). Between 36 and 100 clones were screened for different inserts by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the enzymes AfaI for *narG*, *napA*, *nirK* and *cnorB*, HhaI for *nirS*, and Sau3AI for *nosZ*. Inserts of representative clones were PCR amplified and sequenced in both directions using the primers SP6 and T7. For RFLP profiles represented by numerous clones, 2 or 3 clones were sequenced.

The deduced amino acid sequences of *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB* and *nosZ* were compared against the protein databases with BLASTP (at the National Center for Biotechnology Information). The most related sequences of either type-strain organisms or uncultured organisms found in marine environments were selected. The sequences were aligned with ClustalW (Thompson et al., 1994). The alignments were manually refined in BIOEDIT (Hall, 1999). Phylogenetic analysis was performed using PROTDIST (Jones-Taylor-Thornton distance method), FITCH (Fitch Margoliash method) and SEQBOOT/CONSENSE (bootstrap analysis) programs in PHYLIP 3.65 software package (Felsenstein, 1989).

Table 4.1. Degenerate oligonucleotides used as PCR primers.

Name	Sequence (5'-3')	Hybridization temperature (°C)	Primer concentration (nM)	References
<i>narG</i> ^a				
narG-A241f	TTYTAYGAYTGGTAYGCNGA	46	500	(Auclair et al., 2010)
narG-C241f	TTYTAYGAYTGGTAYTGYGA		500	
narG-631r	TTYTCYTGNCNACRTARTG		1000	
<i>napA</i> ^a				
napA-206f	GAYCCNAAAYGCNMGNCAYTGYATGGC	51	1000	(Auclair et al., 2010)
napA-F457r	TGYTGRTTAAANCCCATNGTCCA		500	
napA-M457r	TGYTGRTTNATNCCCATNGTCCA		500	
<i>nirS</i>				
primer F1acd	TAYCACCCSGARCCGC	57	1000	(Hallin and Lindgren, 1999)
primer R4cd	CGTTGAACTTRCCGGTSGG			
<i>nirK</i>				
nirK-203f	TTYGTNTAYCAYTGYGCNCC	56	8000	(Auclair et al., 2010)
nirK-326r	TCNCCRTGNCCNCCDATNARRTGNGG			
<i>cnorB</i> ^a				
cnorB-V212f	TGGGTNGARGGNGTNTGGGA	51	500	(Auclair et al., 2010)
cnorB-T212f	TGGGTNGARGGNACNTGGGA		500	
cnorB-355r	TANGCNCCRWARAANGC		1000	
<i>qnorB</i>				
qnorB2F	GGNCAYCARGGNTAYGA	Touch down PCR	1000	(Braker and Tiedje, 2003)
qnorB7R	GGNGGRTTDTACADGAANCC			
<i>nosZ</i>				
Nos661f	CGGCTGGGGGCTGACCAA	56	400	(Scala and Kerkhof, 1998)
Nos1773r	ATRTCATCARCTGBCGTT			

^aThe forward primers narG-A241f/narG-C241f were used with the reverse primer narG-631r; the forward primer napA-206f with the reverse primers napA-F457r/napA-M457r; and the forward primers cnorB V212f/cnorB-T212f with the reverse primer cnorB-355r.

4.7.4. Quantification of *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK* and *nosZ* in the biofilm

Primers specific to the different *narG*, *napA*, *nirS*, and *nirK* sequences and to the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nosZ* sequence retrieved from the gene libraries were designed for qPCR assays (Table 4.2). Primer specificity was verified by PCR with plasmids carrying the respective gene sequences. No cross-reactivity was observed.

qPCR was performed with SYBR green in 20 µl reaction volume with 10 µl of PerfeCTa™ qPCR FastMix™ (Quanta bioscience, Gaithersburg, MD), 2 µl of DNA (biofilm or standard) and the specific primers (Table 4.2). The amplifications were performed at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 sec, at the annealing temperature (Table 4.2) for 30 sec and at 72°C for 30 sec. Quantification were performed in triplicate on each biofilm DNA replicate. We used 10 ng of biofilm DNA in all qPCR assays. Reactions were performed in a Rotor-Gene 6000 real-time rotary analyser (Corbett life science, Sydney, Australia).

The PCR efficiency (*E*) for each primer pair was calculated from slope of their respective standard curve according to the following formula: $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$. PCR-amplified fragments from plasmid DNA were used as standards. Plasmids carrying *narG*, *napA*, *nirS*, or *nirK* sequences retrieved from gene libraries or the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nosZ* sequence were PCR amplified with the SP6 and T7 primers as described above. PCR products were run on 1% agarose gel, and bands of expected size were extracted and purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc.). DNA was quantified with Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen, Molecular Probe, Eugene, OR, USA) to determine the DNA copy number. Standard curves were obtained from a 10-fold dilution series of standard DNA ($10^8 - 10^1$ copies of the targeted gene).

4.7.5. Reverse transcriptase (RT)-PCR assay

Hyphomicrobium sp. NL23 was cultured in *Hyphomicrobium* 337a medium (per liter: 1.3 g KH₂PO₄, 1.13 g Na₂HPO₄, 0.50 g (NH₄)₂SO₄, 0.2 g MgSO₄ · 7H₂O, 3.09 mg CaCl₂ · 2H₂O, 2.0 mg FeSO₄ · 7H₂O, 1.0 mg Na₂MoO₄ · 2H₂O and 0.88 mg MnSO₄ · 4H₂O) supplemented with NaNO₃⁻ (400 mg-NO₃⁻/L) and 0.2% methanol under denitrifying conditions as previously described (Auclair et al., 2010) for 64 hours. The cultures were then centrifuged at 5 000 x g for 5 min and resuspended in TEN. One volume of acid phenol (pH 4.3) was added, and RNA was extracted as described below.

Bioflow[®] 9 mm carriers were taken from the denitrification reactor, frozen on dry ice and kept to -80°C until RNA extraction. Biofilm was carefully scraped from carriers in an acid phenol (pH 4.3) bath. The phenol/biofilm mix was transferred to a screw-cap microcentrifuge tube containing 250 mg of autoclaved 0.1 mm glass beads (BioSpec Products, Inc.), and 1 volume of TEN was added. The biomass was disrupted with a Fast-Prep[®]-24 homogenizer (MP Biomedicals, Solon, OH) twice for 20 sec at 4.0 m/s. The lysate was centrifuged at 14 000 x g for 15 min, and supernatant was extracted three times with acid phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and once with a chloroform/isoamyl alcohol (24:1). RNA was precipitated with ¼ volume of 10 M ammonium acetate and two volumes of 95% ethanol and then dissolved in diethyl pyrocarbonate-treated water. Total RNA (30 µg) was treated twice with 6 U of Turbo DNase (Ambion Inc., Austin, TX) in 1X Turbo DNase buffer at 37°C for 3 h in a 300 µl volume. Turbo DNase was inactivated, after each treatment, by acid phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction (25:24:1) followed by a chloroform/isoamyl alcohol (24:1) extraction and RNA precipitation. The presence of DNA in the RNA samples was evaluated by performing RT-PCR without reverse transcriptase. No DNA contamination was observed.

Reverse transcription (RT) of treated RNA (1 µg) was performed in a 50 µl reaction volume containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 200 U reverse transcriptase (SiperScript[™] II RT, Invitrogen, Carlsbad, CA) and 100 pmol of the reverse primer (Table 4.3). RT was performed at 65°C for 5 min and then at room temperature for 10 min, at 42°C for 60 min, and finally at 94°C for 5 min. Five microliters of the RT reaction was used for the PCR amplification. PCR was performed in 50 µl reaction volume as described before with the rTaq DNA polymerase. Primers are described in Table 4.3. The amplifications were performed at 94°C for 5 min, at the annealing temperature for 5 min (Table 4.3), followed by 30 cycles at 72°C for 45 sec, at 94°C for 45 sec, at the annealing temperature for 45 sec, and finally at 72°C for an extension period of 10 min. RT-PCR products were verified by sequencing.

Table 4.2. Specific primers used for qPCR.

Gene	Sequence (5'-3')	Product Length (bp)	Final primer Concentration (nM)	Annealing Temperature (°C)
<i>narG</i>				
<i>narG1</i>				
G1b_276f	ATTACCGCCACCCAGTTT	157	300	55
G1b_433r	GCTTTCGCATTCAACCTG			
<i>narG5</i>				
G5b_154f	CTAATAGCAGTGTGGCC	136	300	55
G5b_290r	GGATTGGATGGTGATTACC			
<i>narG2</i>				
G2b_331f	GTAGCAACCTGGAGAGTGC	66	300	63
G2_397r	TCCAACAGCGAAAAGTACCG			
<i>narG7</i>				
G7b_447f	GGTGCAACAAAACCTCTGAC	117	400	51
G7b_564r	GCTATGTTTCGGATCGTTGT			
<i>narG27</i>				
G27b_517f	TTGCCCTTTTTGTCTTGG	122	300	51
G27b_639r	GGAATGGAAAACCTGTTGCGG			
<i>narG29</i>				
G29b_353f	CGCCATCAAGATCAATATAC	153	300	54
G29b_506r	ACATTGCTTGGTTCGCAA			
<i>narG32</i>				
G32b_521f	CTCCTGTTTTGGAATCGG	89	300	51
G32b_610r	GCGATATCACTGTGCCGACA			
<i>nirS</i>				
<i>nirS2</i>				
nirS2b_292f	CCACCCACAGATTGTTTG	128	500	54
nirS2b_420r	TCACTCTGATCGGTACTG			
<i>nirS5</i>				
nirS5b_105f	GTGTTCCACACCGAAATC	119	300	54
nirS5b_224r	CGCACCTATGAAAGTTTTG			
<i>nirS13</i>				
nirS13c_305f	CATAGAGATGCTCCGATTC	76	300	57
nirS13c_381r	AATGGTGCAGCAGGTGTAT			
<i>nirS32</i>				
nirS32b_538f	CTTCCTTGGTGTCGATGG	136	500	57
nirS32b_674r	CGACCTGGAAAACCTTACC			
<i>nirS34</i>				
nirS34b_582f	GCGGTCAGGAAGTACCTT	169	500	57
nirS34b_751r	ATCGTCGGATCACACAAG			
<i>nirS36</i>				
nirS36b_89f	CAACGATGGCAGATTCGAGG	84	300	59
nirS36b_173r	CAACCCCGTGTGTCAAGG			
<i>nirK</i>				
nirK1b160f-NL23	GGTCTGGACCGTATCGAAAATAG	118	300	57
nirK1b278r-NL23	TTCCTTACGACCGCTCTACTA			
<i>nosZ</i>				
nosZ321f-NL23	GCTGGATCTTGTCGTTGAAG	227	300	55
nosZ548r-NL23	TCGAGGAAGCCGTCAAGAAG			
<i>napA</i>				
napA346f-NL23	GATCACACGGCGTTCTTCAA	158	300	55
napA504r-NL23	GTCCAAGGTGTACTIONCTGAT			

Table 4.3. Specific primers used for RT-PCR.

Primer	Sequence 5'-3'	Primer concentration (nM)	Annealing temperature (°C)
<i>narG</i>			
G1_180f	CCCTGTACGCTCGATACCA	200	56
G1_384r	GCCAGTACGCAAGGTTAAGC		
G5_170f	CCCATTCTTGTGCAAAGCT	200	49
G5_358r	CCGATGGTAAAACGATTACG		
G2_175f	TCACGCGCAATTTGAACCAC	200	57
G2_397r	TCCAACAGCGAAAAGTACCG		
G7_60f	AACTCATGACCTGTACGTGC	200	64
G7_285r	TGTGGCGTAATATGCCTGTG		
G27_479f	GGTCGTCAAGAATCAGACTC	200	64
G27_684r	TCGTGCGTCTGATTTCAAGG		
G29_530f	CGCTCTTAGAATCCTTAGG	200	60
G29_727r	TACGTTCCAGGTCAAATGG		
G32_182f	CGACCTGGATGACTTTATCG	200	49
G32_396r	CTGGATCGCAATATTCCGA		
<i>napA</i>			
napA136f-NL23	CTGCAAACCTTCACGAACCG	200	58
napA326r-NL23	GTCTCAGCCCGTAGCCGATA		
<i>nirS</i>			
nirS2_255f	GACTGACTGATCTCGTCTTCC	200	58
nirS2_482r	CAACTTCATCCACCCCGAGT		
nirS5_176f	GTCTTTGATGCCCGACCACT	200	53
nirS5_428r	CGAATCCCGTGGCTTTGATCG		
nirS13_358f	ATCGCATAACCTGCTGCACC	200	59
nirS13_582r	CAACAAGGTGGTGGTGAATG		
nirS32_411f	ATGAGCGCGATGGTTTCGTC	200	60
nirS32_674r	CGACCTGGAAAACCTTACCA		
nirS34_200f	GATCGGCAGGGTTTCATAGC	200	57
nirS34_377r	GTTCAAGGTGGTCAGAATCC		
nirS36_89f	CAACGATGGCAGATTTCGAGG	200	61
nirS36_335r	AAATCGCACCCGAACCTCTGC		
<i>nirK</i>			
nirK48f-NL23	GCGAATGGATGATGAGAACC	200	53
nirK223r-NL23	CGAGAAGGGCGATTACAAGA		
<i>cnorB</i>			
cnorB_40f-NL23	TTATGTCATCGTCGGCACG	300	55
cnorB234r-NL23	GCCTTGTTTCGGATGCTCA		
cnorB21_194f	GTTCCGTCTTCTACTCTG	300	55
cnorB21_293r	GCTTTGTTTGGGTGGTTCTTA		
cnorB43_99f	GTACGTATCGCCGCATT	300	60
cnorB43_249r	GGCAAAGGACATCATCGCA		
<i>nosZ</i>			
nosZ1_177f	GTCAGATCCGCCATAAGACG	200	55
nosZ1_363r	GCTGGACGCTTGTGTTGATG		
nosZ321f-NL23	GCTGGATCTTGTGCTGTAAG	200	55
nosZ548r-NL23	TCGAGGAAGCCGTCAAGAAG		
nosZ5_194f	CTGTACGGCTTTCGCAATGT	200	50
nosZ5_426r	ATGGCATTACGTTGTCATC		
nosZ8n_336f	CAGCATCCAGTTTCTCAACG	200	50
nosZ8n_525r	AACTACCAGGAGCTGAAAGG		
nosZ21_150f	GTCCACTTTATCCATGACTGG	200	51
nosZ21_349r	TCACAGACAACGCCGACGAA		
nosZ25_291f	ACCAAGTCCCAATTCAGGCTC	200	61
nosZ25_536r	CAGGTTCTCAACGGCATTC		
nosZ39_194f	GCCTTGATCGCCTTTTCGATA	200	50
nosZ39_386r	TGTTCCGGTTATCGACGTGAC		

4.8. Results

4.8.1. Diversity of denitrification genes in the biofilm

Degenerate primers targeting consensus sequences of *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *qnorB* and *nosZ* were used to PCR-amplify these sequences from the biofilm, and to generate gene libraries. Overall, twenty-five different sequences with more than 75% similarity to the different denitrification reductases were retrieved (Figure 4.1). Seven different sequences related to *narG*, one related to *napA*, six related to *nirS*, one related to *nirK*, three related to *cnorB*, and seven related to *nosZ* were found.

The *narG1* and *narG2* sequences were identical to the corresponding two *narG* sequences found in *Methylophaga* sp. JAM1 (also named *narG1* and *narG2*; Auclair et al. 2010). Deduced amino acid sequences of the five other *narG* sequences (Figure 4.1A) were related to NarG sequences found in bacterial species affiliated with different sub-divisions of Proteobacteria. *napA1* was related to NapA sequences found in bacterial species affiliated with Alpha-Proteobacteria (Figure 4.1B). The deduced amino acid sequences of *nirS2* and *nirS34* were related to NirS sequences found in the Gamma-Proteobacterium *Kangiella koreensis*. This bacterial species is a moderate halophilic bacterium and can perform denitrification (Yoon et al., 2004). NirS13 and NirS36 were related to NirS found in the denitrifying bacterium *Roseobacter denitrificans* and with NirS sequences retrieved from sediments in a mariculture environment (GenBank annotation). NirS5 and NirS32 were related to NirS found in a marine environment (GenBank annotation). NirK1 was related to NirK sequences found in bacterial species affiliated with Alpha-Proteobacteria, including *Hyphomicrobium zavarinii*. The three cNorB identified in the biofilm were related to cNorB sequences found in bacterial species affiliated with Alpha-Proteobacteria. cNorB21 was nearly identical (99%) to the corresponding sequence in *Pseudovibrio* sp. JE062, a bacterium retrieved from a marine sponge (Enticknap et al., 2006). No PCR amplification products were obtained from the biofilm DNA with primers used to amplify *qnorB*. NosZ3 was related to the *Hyphomicrobium denitrificans* NosZ. The six others (NosZ1, NosZ5, NosZ8, NosZ21, NosZ25 and NosZ39) were related to NosZ sequences retrieved from marine environments (GenBank annotations and (Scala and Kerkhof, 1999).

As deduced amino acid sequences of *nirK1* and *nosZ3* were closely related to the corresponding sequences found in *Hyphomicrobium* species, we performed PCR assays with the degenerate primers on *Hyphomicrobium* sp. NL23. Sequences similar to *napA*, *nirK*, *cnorB* and

nosZ were retrieved. The strain NL23 *napA*, *cnorB* and *nosZ* were identical to the ones found in the biofilm (*napA1*, *cnorB9* and *nosZ3*). There was only one nucleotide difference between the NL23 *nirK* and the one retrieved from the biofilm (*nirK1*). This difference could be an artefact introduced by PCR.

4.8.2. Quantification of the nitrate-reducing bacteria and denitrifiers

Using qPCR, we established that the *Methylophaga* sp. JAM1 *narG1* and *narG2* were dominant among all the *narG* genes found in the biofilm with 1.0×10^4 and 1.6×10^4 copies/ng biofilm DNA, respectively (Table 4.4). The other *narG* genes were approximately 4 to 500 times less abundant. The levels of the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *napA*, *nirK* and *nosZ* were similar with 4.5 , 8.4 and 5.4×10^4 copies/ng biofilm DNA. The abundance of the different *nirS* ranges from 8.9×10^0 to 4.4×10^2 copies/ng biofilm DNA. The *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nirK* was at least 100 times more abundant than the *nirS* sequences.

4.8.3. Transcription of denitrification genes in the bacterial strains and in the biofilm

The four denitrification genes carried by *Hyphomicrobium* sp. NL23 were transcribed in pure cultures (Table 4.5). However, in the biofilm *napA* transcripts were not detected, but the other three were detected. The two *Methylophaga* sp. JAM1 *narG* were transcribed in pure cultures, but only *narG1* transcripts were detected in the biofilm (Table 4.5). Among the 19 denitrification-related gene sequences associated with the uncultured bacteria in the biofilm, only the *narG7* and *cnorB21* transcripts were found in the biofilm (Table 4.5).

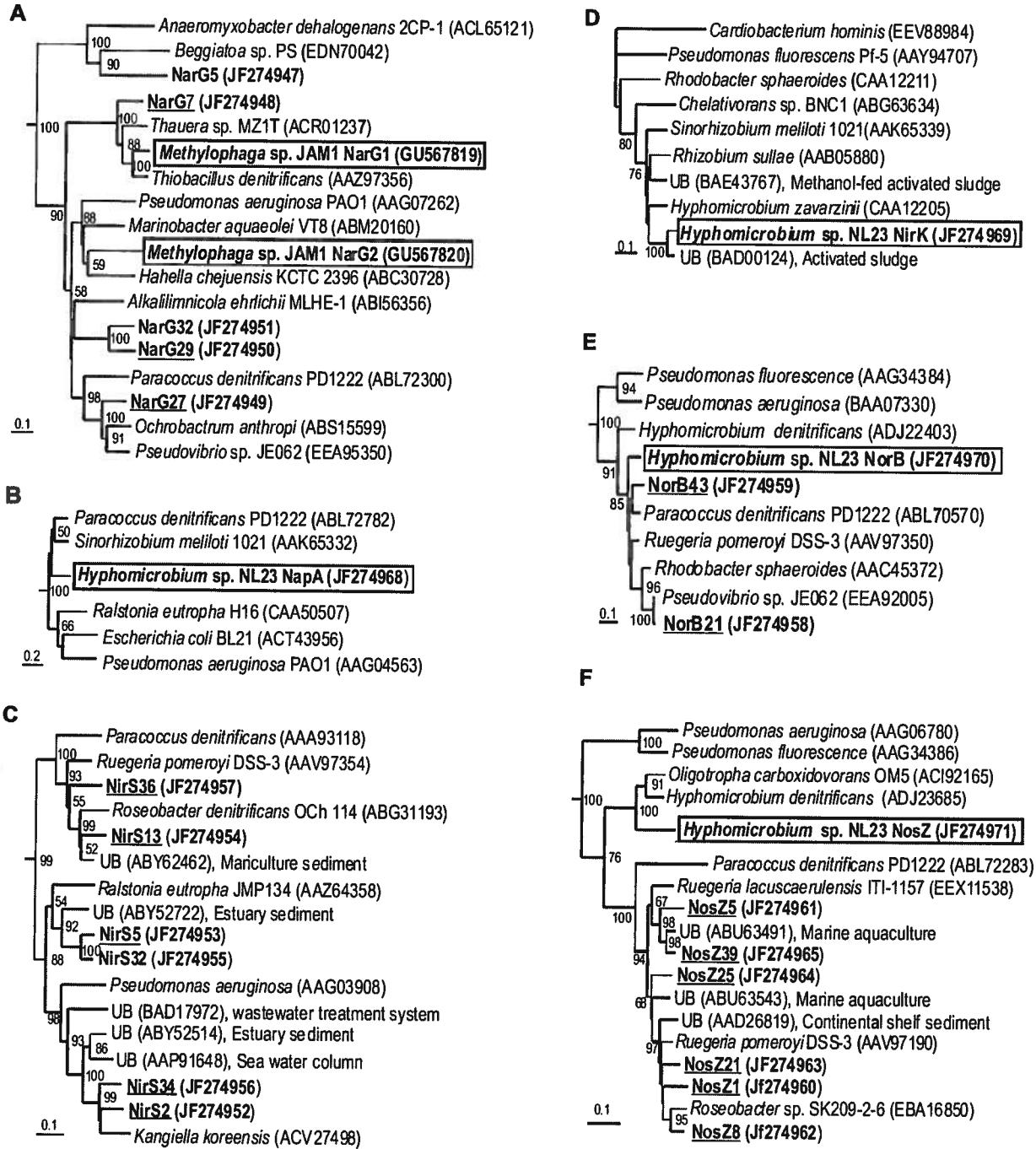


Figure 4.1. Phylogenetic analysis of the reductase deduced amino acid sequences retrieved from the denitrifying biofilm and the isolated strains. Unrooted phylogenetic tree showed the evolutionary relationship of NarG (A), NapA (B), NirS (C), NirK (D), cNorB (E) and NosZ (F) sequences obtained in this study and representative reductase sequences affiliated with Proteobacteria. The scale bar represents amino acid substitutions per position. Bootstrap values above 50% are indicated at the branches. GenBank accession numbers are indicated beside species name in parentheses. Trees were inferred from a matrix of pairwise distance using aligned sequences containing 332, 129, 261, 109, 116 and 382 positions for NarG, NapA, NirS, NirK, cNorB and NosZ, respectively. Underlined sequences are from the biofilm, and boxed sequences are from the isolated strains.

Table 4.4. Quantification of the denitrification gene sequences in the biofilm by qPCR.

Gene	Gene copies ^a	SD ^b
<i>Methylophaga</i> sp. JAM1		
<i>narG1</i>	1.0 x 10 ⁴	0.14 x 10 ⁴
<i>narG2</i>	1.6 x 10 ⁴	0.25 x 10 ⁴
<i>Hyphomicrobium</i> sp. NL23		
<i>napA</i>	4.5 x 10 ⁴	0.24 x 10 ⁴
<i>nirK</i>	8.4 x 10 ⁴	1.6 x 10 ⁴
<i>nosZ</i>	5.4 x 10 ⁴	0.65 x 10 ⁴
Uncultured bacteria		
nitrate reductase		
<i>narG5</i>	4.5 x 10 ³	1.2 x 10 ³
<i>narG7</i>	1.0 x 10 ³	0.12 x 10 ³
<i>narG27</i>	4.7 x 10 ¹	0.58 x 10 ¹
<i>narG29</i>	3.0 x 10 ¹	1.6 x 10 ¹
<i>narG32</i>	1.2 x 10 ³	0.20 x 10 ³
nitrite reductase		
<i>nirS2</i>	4.4 x 10 ²	0.85 x 10 ²
<i>nirS5</i>	3.6 x 10 ²	0.48 x 10 ²
<i>nirS13</i>	1.6 x 10 ²	0.21 x 10 ²
<i>nirS32</i>	4.4 x 10 ²	0.59 x 10 ²
<i>nirS34</i>	3.6 x 10 ²	1.0 x 10 ²
<i>nirS36</i>	8.9 x 10 ⁰	4.2 x 10 ⁰

^a per ng of biofilm DNA

^b Standard deviation corresponded to quantification on three DNA extractions in triplicate.

All pairs of specific primers showed a linear response of the Ct versus the copy numbers of added standard DNA ($R^2 > 0.99$), and also showed PCR efficiency ranging between 0.89 and 1.06.

Table 4.5. Detection of denitrification gene transcripts in the bacterial strains and in the biofilm by RT-PCR.

	<i>Hyphomicrobium</i> sp. NL23		<i>Methylophaga</i> sp. JAM1		<u>Uncultured</u> ^b
	Pure culture	Biofilm	Pure culture ^a	Biofilm	Biofilm
<i>narG</i>	NA	NA	<i>narG1</i> <i>narG2</i>	<i>narG1</i> -	<i>narG7</i>
<i>napA</i>	+	-	NA	NA	NA
<i>nirK</i>	+	+	NA	NA	NA
<i>nirS</i>	NA	NA	NA	NA	none
<i>cnorB</i>	+	+	NA	NA	<i>cnorB21</i>
<i>nosZ</i>	+	+	NA	NA	none

NA: not applicable

^a from Auclair et al. (2010)

^b Only the *narG* and *cnorB*-related sequences with positive RT-PCR signal were put in this column. No RT-PCR signal was obtained with the other ones.

4.9. Discussion

Twenty-five putative denitrification gene sequences originating from the methanol-fed biofilm were retrieved. All these genes were more closely related with corresponding genes found in bacteria affiliated with Proteobacteria. Also, most if not all these sequences were related to corresponding reductases retrieved from marine environments. It is very possible that other denitrifying genes were not detected. At the time the degenerate PCR primers were designed, sequences available in the gene databases would have not necessary generated consensus sequences representative of all respective denitrifying genes.

Seven sequences related to *narG* and one related to *napA* were detected in the biofilm. This suggests the presence of 8 different nitrate-reducers or denitrifiers. This could however be an overestimation of the diversity as multiple copies of distantly related *narG* can be present in a bacterial strain (Palmer et al., 2009). Indeed, two *narG* sequences retrieved from the biofilm are identical to the two *narG* found in *Methylophaga* sp. JAM1. Only one *napA* was found in the biofilm which corresponded to *napA* of *Hyphomicrobium* sp. NL23. As mentioned before, *napA* sequences available to design the degenerate primers may not allow the detection of all *napA* sequences.

Sequences related to nitrite reductases, key enzymes of the denitrification pathway, were detected in the biofilm DNA, of which six sequences were related to *nirS* and one to *nirK*. By

compiling data of diversity studies in which genes encoding the nitrite reductases were used as functional markers of denitrification, Jones and Hallin (2010) demonstrated that most *nirK* sequences in database were derived from soil but that *nirS* sequences were prominently derived from marine and estuarine environments. Moreover, Hallin et al. (2006) observed that the addition of methanol to a pilot-scale plant treating wastewater resulted in an increase of the *nirS*-type denitrifiers diversity. Yoshie et al. (2004b) observed that the diversity of *nirS* was higher than the diversity of *nirK* in two acetate-fed anaerobic reactors for removing nitrate from metallurgic saline wastewater. Our results are consistent with these observations, as higher diversity of *nirS* than *nirK* were found in our marine methanol-fed denitrifying biofilm. *nirS13* and *nirS36* were related to *nirS* belonging to the *Roseobacter* clade, which is prominent in coastal waters and in surface waters of the open ocean (Moran et al., 2007) and was associated with an industrial saline wastewater denitrification system (Cortes-Lorenzo et al., 2006). With our degenerate primers, only the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nirK* was found in the biofilm. *Hyphomicrobium* spp. has been associated with marine methanol-fed denitrification systems (Sperl and Hoare, 1971; Neef et al., 1996; Ginige et al., 2004).

Three sequences related to *cnorB* were retrieved from the biofilm. Among retrieved sequences is the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *cnorB*. Finally, seven sequences related to *nosZ* were retrieved from the biofilm, among them the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nosZ*. The six other sequences grouped with *nosZ* found in the CLEM group of sequences retrieved from Pacific Ocean sediment (Scala and Kerkhof, 1999).

4.9.1. Transcriptional expression of the denitrification genes

napA, *nirK*, *cnorB* and *nosZ* of *Hyphomicrobium* sp. NL23 were transcribed in pure cultures under denitrifying conditions, which suggests its capacity to reduce nitrate into N₂. However, only the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nirK*, *cnorB* and *nosZ* transcripts were detected in the biofilm. Contrary to pure cultures, the *napA* transcripts were not observed in the biofilm, suggesting that strain NL23 used directly the nitrite produced by the nitrate reducers present in the biofilm to support its metabolism.

Methylophaga sp. JAM1 has been shown to reduce nitrate into nitrite in denitrifying conditions, and this activity was related with the presence of the two *narG* (Auclair et al., 2010). We previously showed that the two genes were transcribed in pure cultures regardless of the incubation conditions (anoxic or aerobic), suggesting the constitutive expression of these genes

(Auclair et al., 2010). Surprisingly, only *narG1* transcripts were detected in the denitrifying biofilm, suggesting that both genes were differently regulated. *Escherichia coli* has two homologous membrane-bound nitrate reductases, NRA and NRZ, which are encoded by *narGHJI* and *narZYWV*, respectively (Blasco et al., 1990). Both enzymes are expressed at basal levels, with higher expression observed at stationary growth phase but are regulated differently. The expression of NRA is stimulated by anaerobiosis and nitrate under the control of oxygen-responsive regulator FNR and the nitrate/nitrite-responsive regulator NarXL, respectively. NRZ expression is rather dependant of the stationary phase regulatory factor RpoS and is not influenced by anaerobiosis and nitrate (Chang et al., 1999). RpoS is a stress response regulator, associated with the stationary phase and is responsible for the expression of numerous genes conferring more resistance to bacteria under environmental stress conditions (Lange and Hengge-Aronis, 1991). *narG1* gene product is 88% identical to NarG of the obligate chemolithoautotrophic, sulfur-compound-oxidizing Beta-Proteobacterium *Thiobacillus denitrificans*, one of the rare bacteria species known to couple denitrification and sulfur-compound oxidation. It has been proposed that *Methylophaga* sp. JAM1 acquired *narG1* by horizontal gene transfer (Auclair et al., 2010). The "recent" acquisition of *narG1* could have allowed *Methylophaga* sp. JAM1 to adapt to the Biodome denitrification system.

Among the 19 putative denitrification genes associated with the uncultured bacteria, only the *narG7* and *cnorB21* transcripts were detected by RT-PCR. The level of transcripts for the other genes could have been below the detection limit. It is also possible that others denitrifying bacteria rely on alternative anaerobic metabolisms. Indeed, denitrifying bacteria can also use oxidized iron as terminal electron acceptor (Ottow and Glathe, 1971; Jones et al., 1984). We have previously shown that iron added as trace metal to the denitrification system at 150 µg/L (2.68 µM) enhanced its activity (Labbé et al., 2003b). Iron reduction is widespread in marine environment where dissolved iron concentrations range generally from 0.03 to 2 nM (Achterberg et al., 2001; Jickells et al., 2005).

4.9.2. Abundance of nitrate reducers and denitrifiers

Absolute quantification using qPCR has been performed to evaluate the concentration of diverse functional communities in the denitrifying biofilm. Most quantification studies performed to date have used universal primers to quantify the entire denitrifying population and then compare the sampling sites (Neufeld et al., 2001; Henry et al., 2004; Kandeler et al., 2006; Bru et

al., 2007; Levy-Booth and Winder, 2010). Here, we performed a quantification of specific genes in an attempt to establish the contribution of each genes to the overall functional population of the biofilm. Assays have targeted *narG* and *napA*, which can represent either nitrate-reducing or denitrifying bacteria, *nirS* and *nirK*, which were used as markers of denitrifying populations. The *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nosZ* was assayed to confirm the results obtained with *napA* and *nirK*. The most abundant genes in the biofilm were associated with the genes found in *Methylophaga* sp. JAM1 (*narG1* and *narG2*) and in *Hyphomicrobium* sp. NL23 (*napA*, *nirK* and *nosZ*). The other genes from the uncultured bacteria were 10 to 10 000 less abundant than both strains, suggesting minor involvement of these bacteria in the denitrification process.

Overall, our results confirmed that *Methylophaga* sp. JAM1 and *Hyphomicrobium* sp. NL23 are predominant in the biofilm, with strain JAM1 expressing *narG1* and strain NL23 expressing *nirK*, *cnorB* and *nosZ*. Bacteria only able to reduce nitrate to nitrite are widespread in many environments and are abundant in wastewater treatment plants (Drysdale et al., 2001; Gentile et al., 2007). The absence of *napA* transcripts of *Hyphomicrobium* sp. NL23 suggested that this strain directly used the nitrite present in the biofilm, generated by nitrate respirers such as *Methylophaga* sp. JAM1. Other sequences related to denitrification genes from uncultured bacteria were found in the biofilm. Although present in low amounts, bacteria carrying these genes could play an important role in the denitrification process of the biosystem, thus allowing the biofilm to adapt quickly upon changing conditions. Novel denitrifying bacteria not detected by degenerate primers could also play a role in the denitrification activity of the biofilm.

4.10. Acknowledgments

This research was supported by the Montreal Biodome as well as by a grant to RV from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. JA held scholarships from the Fondation Armand-Frappier and the Fonds de recherche sur la nature et les technologies du Québec. We are grateful to Maxime Hémond and the engineering staff of the Biodome for their technical support. We also thank Nathalie Arbour for revising the English.

5. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 3

5.1. Mise en contexte de l'article 3

La technique du DNA-stable isotope probing est largement employée depuis les dernières années pour établir le lien entre fonction et identité dans divers environnements. Le DNA-SIP repose sur l'incorporation d'isotopes dans l'ADN des populations microbiennes actives pour l'assimilation d'un substrat marqué. La validité d'une expérience de SIP impose de s'assurer que l'ADN analysé est effectivement marqué. Cette vérification peut être réalisée par l'utilisation d'un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS) qui permet de mesurer l'enrichissement isotopique dans l'ADN. Cependant, l'IRMS est un instrument complexe et dispendieux disponible seulement dans quelques laboratoires spécialisés.

Lors des expériences de SIP (article 1) une méthode de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (HPLC-MS) a été mise au point comme une alternative plus simple à l'IRMS pour confirmer le marquage isotopique de l'ADN. L'article 3 présente la validation de cette méthode. L'article a été soumis à *Journal of Microbiological methods*.

5.2. Contribution de l'étudiante à l'article 3

Comme mentionné précédemment, la méthode de mesure de l'incorporation isotopique dans l'ADN a été élaborée par François Lépine (Ph.D.) avec contribution de l'étudiante. L'ensemble des manipulations et le traitement des données ont été effectués par l'étudiante. L'article a été écrit par l'étudiante avec Richard Villemur (Ph.D) et François Lépine (Ph.D.).

5.3. Article 3: Liquid chromatography-mass spectrometry method to measure isotope incorporation for DNA-stable isotope probing.

Julie Auclair, François Lépine and Richard Villemur*

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

***Corresponding author's address:**

Richard Villemur

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

richard.villemur@iaf.inrs.ca

Tel: 1 450 687 5010 ext 4611

Fax: 1 450 686 5501

5.4. Résumé

La détermination de la fonction des microorganismes, soit qui fait quoi, constitue un des grands défis rencontrés lors de l'étude des communautés microbiennes dans leurs habitats naturels. Parmi les techniques développées permettant cette détermination il y a le DNA-SIP. Dans cette technique, l'ADN est marqué suite à l'assimilation, par les microorganismes, d'un substrat de croissance marqué d'un isotope stable. L'ADN marqué est ensuite utilisé pour identifier les microorganismes impliqués dans l'assimilation du substrat. Afin de valider une expérience de SIP, il est nécessaire de confirmer le marquage isotopique de l'ADN. Ceci est habituellement réalisé à l'aide de la spectrométrie de masse à ratio isotopique. Dans cette étude, nous avons développé une méthode de chromatographie liquide (HPLC) couplée à un spectromètre de masse quadripolaire (MS) afin d'évaluer l'enrichissement isotopique (^{13}C) au niveau de la thymine issue de l'hydrolyse de l'ADN, extrait de cultures bactériennes alimentées avec différentes sources de carbone marquées au ^{13}C . Cette méthode HPLC/MS a ainsi été employée pour mesurer et confirmer l'enrichissement isotopique des acides nucléiques lors d'une expérience de SIP à partir d'aussi peu que 1 μg d'ADN. Nous croyons que cette méthode constitue une alternative simple à la spectrométrie de masse à ratio isotopique.

Mots-clés: Spectromètre de masse quadripolaire, ratio isotopique, *stable isotope probing*, ADN.

5.5. Abstract

One important challenge in the study of microbial biota in their natural habitats is to determine "who is doing what". Among techniques allowing this determination is the DNA-stable isotope probing (DNA-SIP). In DNA-SIP, DNA is labeled via the assimilation of a labeled growth substrate that is subsequently used to identify microorganisms involved assimilation of the substrate. The validity of a SIP experiment imposed to make sure that the DNA is isotopically labeled. Typically, this validation is achieved using an isotope ratio mass spectrometer. In this study, we describe the development of a method using liquid chromatography (HPLC) coupled to a quadrupole mass spectrometer (MS) to measure the ^{13}C enrichment of thymine obtained from the hydrolysis of DNA extracted from cultures fed with various ^{13}C enriched carbon sources. This HPLC/MS method was then used to measure and confirm the isotopic enrichment into labeled nucleic acids in a SIP experiment for an amount of DNA as low as 1 μg . We believe that this method is a simpler alternative to the isotope ratio mass spectrometry.

Keywords: Quadrupole mass spectrometry, isotopic ratio, stable isotope probing, DNA.

5.6. Introduction

In the last two decades, various molecular biology methods have been developed to analyze the composition of microbial biota in a wide range of environments, including pristine and contaminated soils, sediments and biofilms. However, determining the composition of a biota provides limited information on the functionality of the population, leaving unanswered the question of "who is doing what?". For instance, in the case of biotreatment of a contaminated soil, specialized microorganisms can catabolize toxic compounds, allowing other microorganisms to feed on their metabolites. Different techniques are now available to identify these specialized microorganisms in a microbial biota. One such techniques is stable-isotope probing (SIP) (Boschker et al., 1998; Radajewski et al., 2000; Manefield et al., 2002).

In SIP experiments, a microbial community is fed with a substrate labeled with a stable isotope (usually ^{13}C , the heavy isotope of ^{12}C) as a carbon source for the community's its growth. Assimilation of the labeled substrate results in the incorporation of the isotope into cellular components, such as the DNA (Kreuzer-Martin, 2007). In SIP involving DNA (DNA-SIP), the isotopically-enriched DNA (heavy) can be separated from the DNA that did not incorporate the isotope (light) by density gradient ultracentrifugation. The heavy DNA is subsequently used to generate a 16S ribosomal RNA (rRNA) gene library for the identification of microorganisms involved in assimilation of the carbon source. This procedure could lead to the identification of genes involved in this metabolic pathway (Morris et al., 2002).

Successful DNA-SIP experiments depend on efficient and selective recovery of the heavy DNA. The efficiency of this separation relies on the isotopic enrichment of the heavy DNA. To allow efficient separation of the heavy and light DNA, Radajewski et al. (2000) suggested a 20% incorporation of ^{13}C into DNA. One problem with SIP is allowing sufficient cultivation time in order to get enough labeling of the DNA of the microorganisms responsible for the initial degradation of the substrate, while avoiding cross-feeding of these metabolites to other microorganisms. The shorter is the incubation time, smaller are the chances that cross-feeding could occur. On the other hand, short incubation time will generate smaller amounts of labeled DNA. It has been shown that small amounts of unlabeled DNA generally disseminate throughout the buoyant density gradient and end up in the heavier fractions, and could then be misinterpreted as isotopically-labeled DNA (Lueders et al., 2004; Neufeld et al., 2007a). Also, the GC content of DNA can affect its migration in a CsCl gradient, GC-rich DNA has a tendency to migrate to the

high-density fractions (Schildkraut et al., 1962; Lueders et al., 2004). Thus for these reasons, it is important to confirm that the DNA in the high density fractions is indeed labeled.

Isotope ratio mass spectrometry (IRMS) has been used to measure the isotopic enrichment in DNA. This approach generally entails the oxidation of the organic carbon into CO₂ through combustion or chemical oxidation. The IRMS instrument then determines the relative abundance of ¹²CO₂ and ¹³CO₂ with very high accuracy. This instrumentation is ideally suited for the determination of the minute ¹³C enrichment that can be produced by various physical factors or through the metabolism of various organisms. IRMS can be performed on complex mixtures of compounds using gas chromatography to separate the various components prior to combustion, but this approach requires chemical derivatization to make the analytes more volatile. Alternatively, liquid chromatography can also be used for separation, but then a chemical reactor is needed to chemically oxidize the compounds. In both cases, the approach is relatively complex and requires specialized equipments.

An alternative for determining isotope ratio is to use a quadrupole mass spectrometer (QMS). Due to its lower accuracy compare with IRMS, QMS is not recognized for measuring isotope ratios to study the minute variations in the natural abundance of the isotopes of different atoms in a variety of compounds (Kreuzer-Martin, 2007). However, the use of QMS constitutes an interesting alternative to IRMS to measure isotope ratio of samples in which relatively high ¹³C enrichment can be achieved (Godin et al., 2007). These conditions are encountered in DNA-SIP experiments where relatively high enrichment can be obtained, and the amount of material is not limiting.

In this report, we describe the development of a HPLC/MS method with QMS to measure the isotopic ratio of thymine in ¹³C-labeled DNA. Our approach involves a simple acid hydrolysis of the labeled DNA to release the bases, and, after a simple HPLC separation, ¹³C enrichment is directly obtained using QMS. This method has been developed as an alternative to IRMS to measure isotopic labeling of DNA during SIP experiments

5.7. Materials and methods

5.7.1. ¹³C-labeling

Escherichia coli BL21 and *Pseudomonas aeruginosa* PA14 were obtained from GE Healthcare Life Science (Baie d'Urfé, QC, Canada) and Éric Déziel's laboratory, respectively. *Nitratireductor aquibiodomus* NL21, *Paracoccus* sp., *Methylophaga* sp. and *Mesorhizobium* sp. were from our laboratory culture collection. *E. coli* BL21 (for unlabeled DNA) and *P. aeruginosa* PA14 were cultured in Miller's *LB broth* medium (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). *N. aquibiodomus* NL21, *Paracoccus* sp., and *Mesorhizobium* sp. were grown in R2A broth medium (Becton Dickinson Co., Cockeysville, MD, USA). *Methylophaga* sp. was cultured as described previously (Janvier et al., 1985).

To generate ¹³C-enriched DNA, *E. coli* BL21 was grown to a OD_{600nm} of 1.0 in 20 mL mineral medium supplemented with 22 mM sodium acetate bearing a ¹³C at position 2 [2-¹³C, 99%] (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) as sole carbon source as described by Hoffman et al. (Hoffman and Holland, 1995).

Biofilm was taken from the methanol-fed denitrification system of the Montreal Biodome. It was incubated under denitrifying conditions in artificial seawater in the presence of 21.4 mM nitrate and 37.5 mM ¹²C- or ¹³C-methanol (¹³C, 99%) as described previously (Auclair et al., 2010).

5.7.2. DNA extraction

Bacterial cultures (2 mL) or biofilm cultures (1 mL) were centrifuged, washed once with 500 µL TEN (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 150 mM NaCl), and dispersed in 500 µL TEN. The suspension was transferred to a 1.5 mL tube containing 250 mg glass beads (0.25-0.50 mm) and 500 µL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1). The biomass was disrupted with the FastPrep-24 homogenizer (MP Biomedicals, Solon, OH, USA; homogenized twice for 20 sec at speed 4.0) and placed on ice. The homogenate was centrifuged for 15 min at 13,000 x g, and the aqueous phase was extracted with 500 µL of chloroform-isoamyl alcohol (24:1). DNA was precipitated by adding ammonium acetate (2 M final concentration) and 1 mL of 100% ethanol for 15 min at -20°C. After centrifugation at 13,000 x g for 15 min, the DNA pellet was washed with 70% ethanol and was dissolved in water. The DNA concentration was determined by OD_{260nm} with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA).

5.7.3. DNA mix

Twenty-eight micrograms of DNA extracted individually from *P. aeruginosa* PA14, *N. aquibiodomus* NL21, *Paracoccus* sp., *Mesorhizobium* sp. and *Methylophaga* sp. were mixed. Sixty micrograms of labeled or unlabeled DNA extracted from *E. coli* BL21 was added to obtain a concentration equivalent to 30% of the total DNA mix.

5.7.4. Density gradient ultracentrifugation

Cesium chloride (CsCl) (1 g/mL) was dissolved in TE buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM), and 0.8 mL ethidium bromide (10 mg/mL) was added per 10 mL of CsCl-TE solution. Ethidium bromide was used to visualize the efficiency of the separation. The final density of the solution was 1.55 g/mL. The CsCl solution was distributed in a 3.9 mL quick-seal centrifuge tube (Beckman Coulter Canada Inc., Mississauga, ON, Canada), into which 10 µg of unlabeled or labeled DNA mix was added. Ultracentrifugation was performed at 20°C for 24 h at 200 000 x g. Each CsCl gradient was fractionated from bottom to top with a needle. The density of each fraction was determined by measuring the refractive index using a refractometer (Abbe refractometer A300A, Fisher Scientific). The fractions were extracted with isopropanol saturated with NaCl, diluted four times, and the DNA was precipitated with two volumes of ethanol, washed with 70% ethanol and dissolved in water.

5.7.5. PCR-DGGE

PCR primers and conditions, and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were performed as described by Lafortune et al. (2009). Two microliters of DNA from each SIP fraction were used as template for polymerase chain reaction (PCR).

5.7.6. DNA hydrolysis

DNA (2.5 µg) was hydrolyzed with 0.5 mL of 88% formic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) at 140°C for 45 min. The sample was flushed with nitrogen prior to hydrolysis, and after hydrolysis, the acid was evaporated under a stream of nitrogen. The hydrolyzed DNA was then suspended in 60 µL water containing 1% acetic acid.

5.7.7. Analysis of ^{13}C incorporation in DNA by HPLC/MS

Thymine ($\geq 99\%$) was purchased from Sigma-Aldrich. The separation of the thymine was performed with an HP 1100 HPLC (Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON, Canada) equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C₈, 5 μm , 4.6 x 150 mm column (Agilent Technologies Canada). Separation was achieved by isocratic elution with 1% acetic acid (Fisher Scientific) in water at a flow rate of 0.4 mL/min. Five microliters of the standards (50 mg/L) or 20 μL of the DNA samples were injected. The HPLC was coupled with a Quattro II triple quadrupole MS (Waters, Mississauga, ON, Canada) through a Valco Tee splitting the flow to 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mass spectrometer was operated in positive electrospray ionization mode. The capillary and the cone voltages were 3.5 kV and 40 V, respectively. The source temperature was 120°C. Nitrogen was used as nebulization and drying gas at a flow of 15 mL/min and 100 mL/min, respectively.

The isotopic ratios were calculated as the abundance of the isotopic ions divided by the sum of the abundances of the isotopic ions plus the abundance of the pseudomolecular ion. This ratio is expressed as a percentage. The ions used for the determination of the isotopic ratio of a commercial sample of thymine was calculated using the ions at m/z 127 and 128 while in the ^{13}C -labeled DNA experiments, the ions monitored were at m/z 127, 128, 129, 130, 131 and 132. The enrichments reported are the difference between the observed isotopic ratios in the ^{13}C supplemented culture versus the observed isotopic ratios in the corresponding experiment fed with an unlabeled carbon source.

5.8. Results and discussion

5.8.1. Development of LC-MS method

In the present study, thymine was chosen to monitor the isotopic incorporation into DNA by HPLC/MS. A chromatographic separation was developed using a reverse-phase C₈ column using 1% acetic acid in water. Pietraszkiwicz et al. (1999) obtained a good separation of uracil, thymine and cytosine on a reverse-phase C₁₈ column using acidified water (pH 2) as the eluent. Under positive ion electrospray, the pseudomolecular ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ of thymine is observed at m/z 127.

In order to assess the precision of this method, the isotopic ratio of a standard solution (50 mg/l) of thymine was measured seven times. To evaluate the accuracy, this ratio was compared with the theoretical isotopic ratio of thymine considering the natural abundance of ^{13}C and the

other isotopes of O, N and H. To increase the sensitivity of the method, thymine was analyzed in Selective Ion Monitoring mode. The observed value of the isotopic ratio was 5.88 with 0.07 standard deviation (SD), which was close to the theoretical value (6.07), demonstrating both the accuracy and the precision of the measurement. The SD value was comparable to those observed by Goshe et al. (1995) when they analyzed isotopic ratio of amino acids using QMS. The difference between the observed and theoretical values probably reflects the accuracy of the measurement with QMS, although some studies have shown that the isotopic composition of an organic compound can vary slightly in function of its origin (DeNiro and Epstein, 1978; Kelly, 2000; Kreuzer-Martin and Jarman, 2007).

The isotopic ratio of thymine was measured with various amounts of unlabeled DNA extracted from *E. coli* after acid hydrolysis of the DNA. The measured isotopic ratio was close to the observed value for the thymine standard for a concentration of 41.6 ng/μL (Table 5.1), equivalent to 833 ng of DNA (20 μL sample). SD similar to the ones obtained with the standard solution was obtained at this concentration. However, SD increased with lower amounts of DNA. Therefore, this HPLC/MS method is comparable to EA-IRMS in terms of the amount of sample needed for accurate measurements, since 1 to 10 μg are needed with EA-IRMS for accurate isotope ratio measurement (Meyer et al., 2006; Miyatake et al., 2009).

Table 5.1. Isotopic ratio for thymine from hydrolyzed unlabeled *E. coli* DNA.

<i>E. coli</i> DNA (ng/μl)	Isotopic ratio
8.3	5.33 (0.25)
12.5	5.25 (0.12)
16.7	5.27 (0.11)
41.6	5.59 (0.02)

Measurements were performed in triplicate (three independent DNA hydrolyses). Number in parenthesis is the standard deviation.

5.8.2. Estimation of ^{13}C incorporation in DNA- SIP experiment

A ^{13}C -labeled *E. coli* DNA was obtained by growing *E. coli* on a mineral medium supplemented with [2- ^{13}C] sodium acetate. After hydrolysis, thymine was found to be extensively labeled as shown by the intensity of the ions at m/z 127, 128, 129, 130, 131 and 132. Although only half of the carbon in the acetate was labeled, thymine enrichment was 75.15% compared with the unlabeled *E. coli* DNA. This probably indicates the preferential utilization of the methyl carbon of acetate in the biosynthesis of thymine. Such preferential utilization of the methyl carbon of acetate in the biosynthesis of the base of ribonucleotides has been reported in the biosynthesis of RNA in *E. coli* (Hoffman and Holland, 1995).

In order to verify that our method can be applied to a DNA-SIP experiment, an artificial DNA mix was made using the ^{13}C -labeled *E. coli* DNA mixed with unlabeled DNA extracted from *P. aeruginosa* PA14, *N. aquibiodomus* NL21, and 3 strains affiliated with the genera *Paracoccus*, *Mesorhizobium* and *Methylophaga* to obtain a quantity of *E. coli* DNA equivalent to 30% of the total DNA. In parallel, a similar DNA mix was made using unlabeled *E. coli* DNA (unlabeled DNA mix). Isotopic ratios of both the unlabeled and the ^{13}C -labeled DNA mixes were determined by HPLC/MS, and representative chromatograms are shown in figure 5.1. The ions at m/z 127, 128, 129, 130, 131, 132 for thymine in the ^{13}C -labeled DNA mix were clearly detected. A mean enrichment of 28.67% was measured for the ^{13}C -labeled DNA mix compared to the unlabeled DNA mix. The isotopic enrichment observed for the ^{13}C -labeled DNA mix was consistent with the dilution factor of the ^{13}C -labeled *E. coli* DNA.

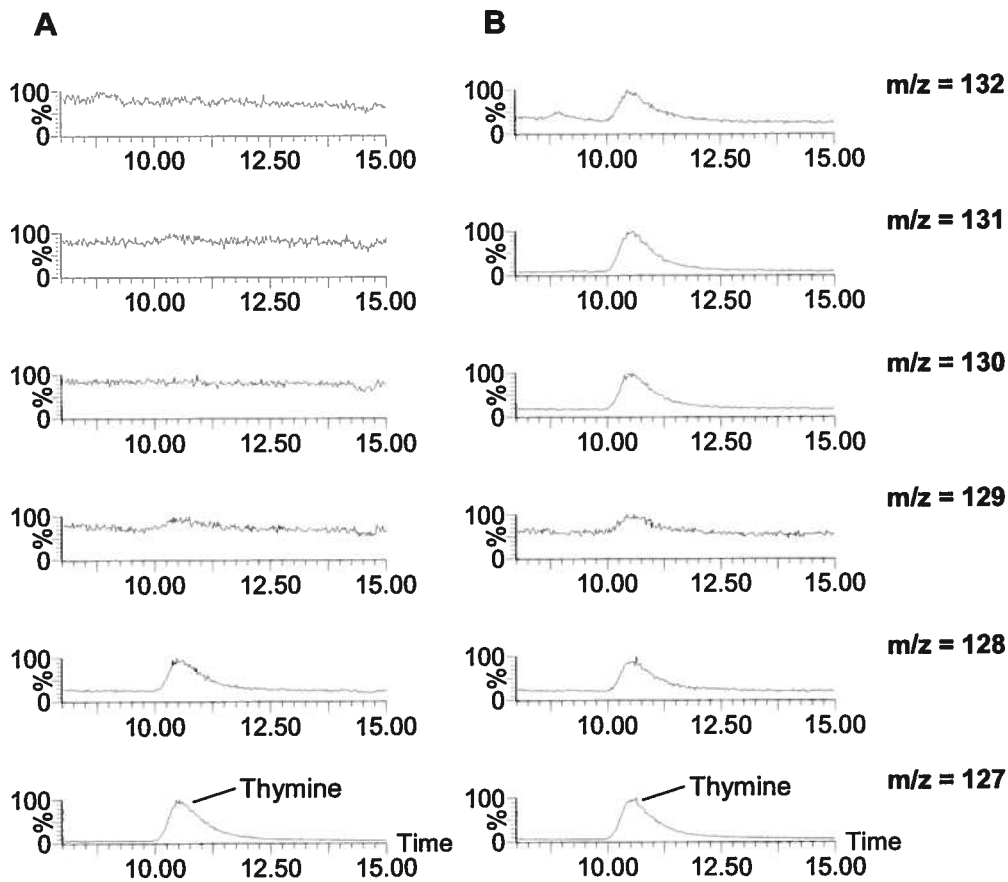


Figure 5.1. Selected ion monitoring chromatograms of thymine from DNA mixes. The ions at m/z 127, 128, 129, 130, 131, 132 for thymine were monitored for both the unlabeled (A) and the ^{13}C -labeled DNA (B) mixes.

CsCl gradient ultracentrifugation was carried out to separate the ^{13}C -labeled DNA from the unlabeled DNA in the artificial DNA mix (Figure 5.2). DNA derived from the ^{13}C -labeled DNA mix was present in the heavy fractions (fractions 4 and 5), while very little DNA could be detected in these fractions in the unlabeled DNA mix, an indication that separation of the ^{13}C -labeled DNA from unlabeled DNA was achieved.

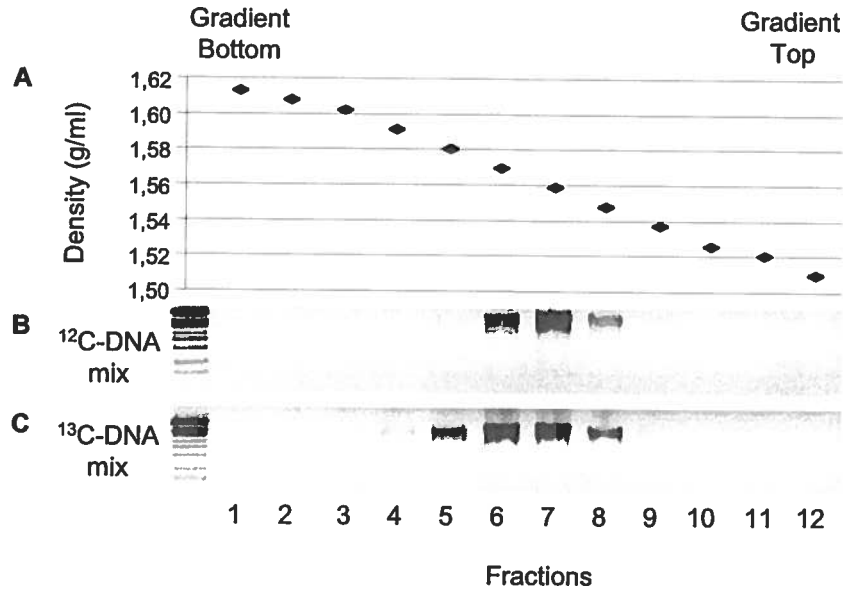


Figure 5.2. Separation of heavy and light DNA. DNA mixes were subjected to a CsCl density gradient ultracentrifugation. Gradients were fractionated from bottom to top, and the recovered DNA was analyzed on a 1% agarose gel electrophoresis (panels B and C). (A) Density measurement of each fraction. (B) Unlabeled DNA mix. (C) ^{13}C -labeled DNA mix.

PCR-DGGE was performed to derive bacterial diversity profiles for all of the density gradients fractions of the unlabeled and ^{13}C -labeled DNA mixes (Figure 5.3). The DGGE profiles of the unlabeled DNA showed bands from all of the species in each fraction with stronger signals occurring in the light fractions as expected. This result was consistent with the previously reported distribution of unlabeled DNA throughout the entire density gradient (Lueders et al., 2004; Neufeld et al., 2007a). A clear difference was observed between the light and heavy fractions of the ^{13}C -labeled DNA mix, as a major DNA band dominated the profile of fractions 4 and 5. Comigration experiments showed that this band corresponded to *E. coli* (data not shown). This band was largely shifted from the low-density fractions in the unlabeled DNA mix to higher density fractions in the ^{13}C -labeled DNA mix, confirming that the DNA enrichment observed came from *E. coli* DNA.

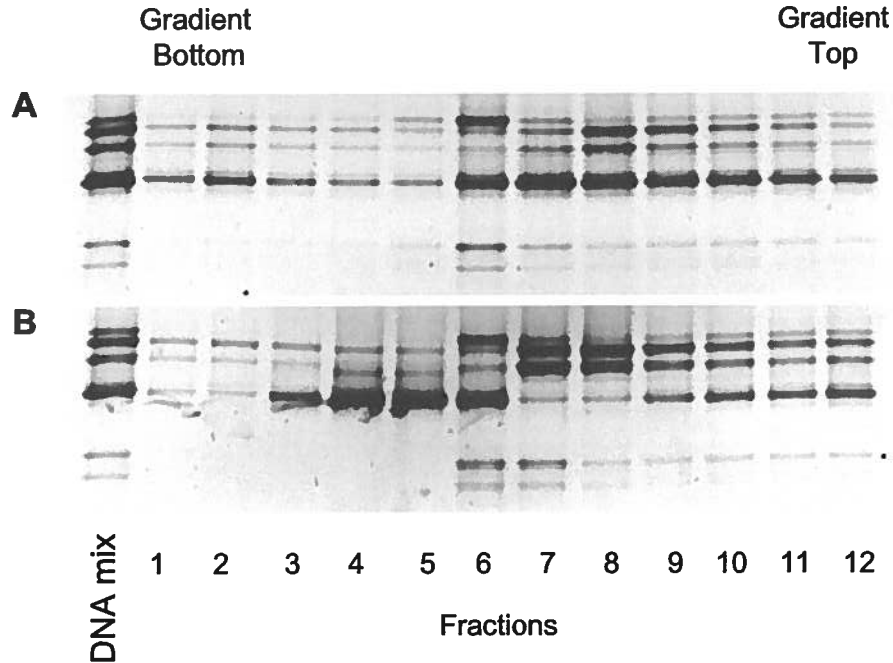


Figure 5.3. DGGE DNA fingerprints of the CsCl gradient fractions. A part of the 16S rRNA gene sequence was PCR amplified on DNA recovery from each fraction, and the resulting amplicons were separated by 20-70% DGGE. (A) Unlabeled DNA mix. (B) ^{13}C -labeled DNA mix.

To confirm the ^{13}C incorporation in DNA of the high-density fractions, the isotopic ratios in fractions 4 to 7 of the ^{13}C -labeled DNA mix gradient were determined (Figure 5.4). The isotopic ratio of fraction 4 was 100%, indicating complete labeling, while fraction 5 only had 10% unlabeled thymine. In contrast, for fraction 6 and 7, the isotopic ratios decreased to reach nearly the theoretical value for unlabeled thymine in fraction 7. These results are in agreement with those presented in figure 5.3 and definitively prove that our method can be used to confirm that the DNA present in the high density fractions 4 and 5 was indeed due to ^{13}C -labeled DNA.

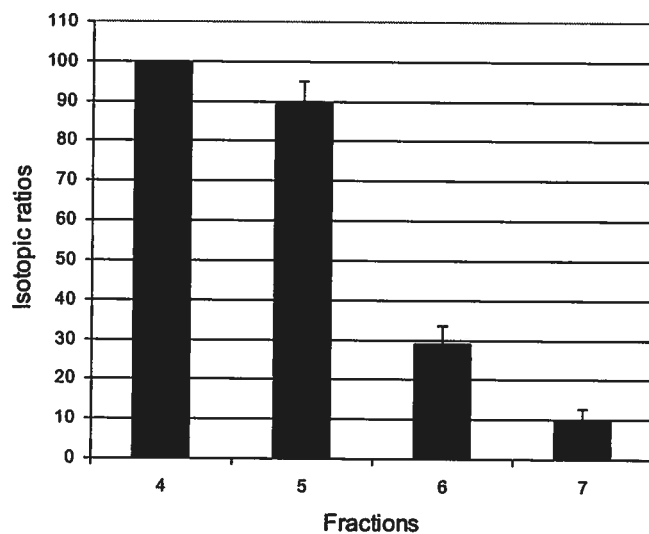


Figure 5.4. Thymine isotopic ratios in the DNA of CsCl gradient fractions determined by HPLC/MS. The corresponding DNA fractions recovered from 6 independent CsCl gradients of ^{13}C -enriched DNA mix were pooled and analyzed by HPLC/MS. Error bars represent standard deviation of three independent experiments.

5.8.3. ^{13}C incorporation in a biofilm

The HPLC/MS method was applied to measure isotope ratio in DNA of a ^{13}C -labeled environmental sample. A biofilm taken from a methanol-fed fluidized denitrifying bioreactor treating a seawater aquarium tank was fed with ^{13}C -methanol under denitrifying conditions for 3 days. A parallel incubation of the biofilm with ^{12}C -methanol was also performed. A mean isotopic enrichment of 23.29% for the ^{13}C -labeled biofilm DNA compared to the unlabeled biofilm DNA was obtained, confirming the incorporation of ^{13}C into biomass fed with ^{13}C -methanol. PCR-DGGE analysis showed a clear difference in the profiles of heavy fractions (fraction 4) of both unlabeled biofilm DNA and ^{13}C -labeled biofilm DNA (Figure 5.5). The enrichment of some DGGE bands (arrows) were observed in the heavy fractions of the ^{13}C -labeled biofilm DNA compared with the unlabeled biofilm DNA. These bands would represent methylotrophic bacteria capable of growing under denitrifying conditions. The sequence of some of these bands showed affiliation of the genus *Methylophaga*. *Methylophaga* species are methylotrophic bacteria found mostly in marine environments (Janvier et al., 1985; Neufeld et al., 2007b). This information allowed us to focus on the isolation, by culture methods, of one *Methylophaga* sp. strain thus showing its involvement in the reduction of nitrate into nitrite (Auclair et al., 2010).

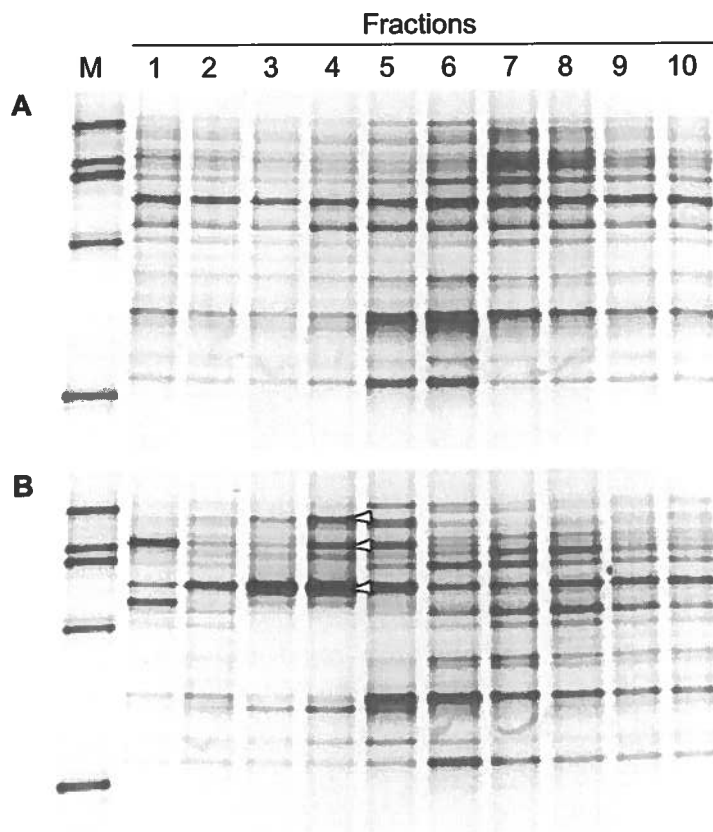


Figure 5.5. DGGE DNA fingerprints of the CsCl gradient fractions of biofilm DNA. A part of the 16S rRNA gene sequence was PCR amplified on DNA recovery from each fraction, and the resulting amplicons were separated by 20-70% DGGE. (A) Unlabeled biofilm DNA. (B) ^{13}C -labeled biofilm DNA. Arrows: bands demonstrating enrichment compare to the unlabeled biofilm DNA. M: DGGE marker.

In conclusion, the HPLC/MS method developed here, using a simple QMS, can be used to confirm the presence of ^{13}C -labeled DNA in a DNA-SIP experiment for an amount of DNA as low as 1 μg , which is comparable to the amount required for traditional EA-IRMS. This method is simple, requiring only an acid hydrolysis of the DNA, and standard chromatographic equipment, such as an ordinary C_8 reverse phase column operated under isocratic conditions. Our method can be an alternative to the IRMS, and can be applied in SIP experiments.

5.9. Acknowledgments

This research was supported by two scholarships to JA from the Fondation Armand-Frappier and the Fonds de recherche sur la nature et les technologies du Québec, as well as by a grant to RV from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We are grateful to Sylvain Milot for his technical support.

6. DISCUSSION

Ce projet de recherche avait pour objectif de caractériser la fonction des microorganismes présents dans le biofilm du dénitrificateur du Biodôme de Montréal pour l'élimination du nitrate en eau salée. Ce projet a mené à la rédaction de deux articles traitant des résultats obtenus au cours de ce doctorat ainsi que d'un article de méthode. Cette section présente une discussion complémentaire des résultats discutés dans les sections précédentes. De plus, des perspectives au projet de recherche y sont proposées.

6.1. Identification des microorganismes méthylophages

Dans un premier temps, les microorganismes responsables de l'utilisation du méthanol dans le biofilm du réacteur de dénitrification du Biodôme de Montréal ont été identifiés. Dans la dénitrification hétérotrophe, les bactéries ont besoin d'une source de carbone, donneur d'électrons, pour soutenir l'activité de dénitrification. En raison des standards imposés au traitement des eaux usées, dont l'élimination des matières organiques, l'affluent des systèmes de dénitrification est souvent pauvre en carbone. Ceci nécessite l'ajout d'une source externe de carbone. Au Biodôme de Montréal, du méthanol est ajouté au système de dénitrification pour favoriser l'élimination du nitrate. Certains microorganismes assimilant cette source de carbone peuvent être directement impliqués dans la dénitrification, d'autres peuvent entrer en compétition avec les bactéries dénitrifiantes ce qui pourrait résulter en une diminution des performances de dénitrification.

Une étude utilisant la technique de MAR-FISH pour l'identification des méthylophages dans le biofilm dénitrifiant avait été réalisée précédemment par Labbé et al. (2007). Cette étude a mis en évidence l'assimilation du méthanol par les Alpha-Protéobactéries sans toutefois y démontrer un rôle pour les bactéries affiliées au genre *Hyphomicrobium*. Les *Hyphomicrobium* sp. sont des bactéries dénitrifiantes méthylophages facultatives (Urakami et al., 1995; McDonald et al., 2001). Elles sont retrouvées de manière abondante dans le biofilm dénitrifiant (Labbé et al., 2007). De plus, les résultats de cette étude suggèrent que les bactéries affiliées au genre *Methylophaga* n'assimilent pas le méthanol sous conditions dénitrifiantes. Les *Methylophaga* sp. sont des méthylophages, utilisant la voie du ribulose monophosphate pour l'assimilation du formaldéhyde, qui ont été décrites comme étant aérobies strictes (Janvier et al., 1985; Janvier and Grimont, 1995; Doronina et al., 2003a; Doronina et al., 2003b). De ce fait, leur présence dans le réacteur de dénitrification était plutôt surprenante.

En raison de la faible résolution phylogénétique obtenue avec le MAR-FISH, qui a permis l'identification de bactéries méthylophages seulement au niveau de la classe bactérienne, une étude complémentaire employant la technique du SIP a été réalisée au cours de ce projet de recherche. Les résultats de cette étude ont permis de fournir une explication quant à la présence de bactéries affiliées au genre *Methylophaga* dans le biofilm. En effet, l'utilisation de la technique du SIP a mis en évidence l'assimilation du méthanol, sous conditions dénitrifiantes, par des bactéries du genre *Methylophaga*. De plus, ces résultats ont été supportés par l'isolement d'une souche, nommée JAM1, affiliée au *Methylophaga* qui est capable de réduire le NO_3^- en NO_2^- en culture pure, pouvant ainsi expliquer leur présence dans un système de dénitrification. Bien qu'ayant déjà été associées à des systèmes de dénitrification alimentés au méthanol (Osaka et al., 2008b) ou à des environnements marins anoxiques (Schwermer et al., 2008), notre étude présente les premières évidences directes de l'adaptation de bactéries du genre *Methylophaga* à des conditions dénitrifiantes.

L'essai de SIP suggère que les *Methylophaga* sp. sont majoritairement responsables de la consommation du méthanol. En effet, près de 90% des clones de la fraction lourde issue de l'ADN extrait de la biomasse de la culture ^{13}C -méthanol sont affiliés, à 93% ou plus, au genre *Methylophaga*. Le clone IAFJAsip1, correspondant à *Methylophaga* sp. JAM1, compte pour plus de 60% des clones de la fraction lourde. Bien que capable de réduire le NO_3^- en NO_2^- , JAM1 ne semble pas en mesure d'effectuer la réaction complète jusqu'au N_2 . D'ailleurs à l'exception de *Sedimenticola selenatireducens* (clone IAFJAsip25; environ 1% des clones), aucune bactérie connue pour respirer le NO_3^- en N_2 n'a été détectée lors du SIP. Il a été démontré précédemment que des bactéries du genre *Hyphomicrobium* sont présentes dans le biofilm dénitrifiant (Labbé et al., 2003a; Labbé et al., 2007). Les *Hyphomicrobium* sp. sont des méthylophages dénitrifiants qui utilisent la voie de la sérine pour l'assimilation du méthanol (Harder et al., 1973).

Comme mentionné dans la section 2.4.1, l'assimilation du méthanol par les bactéries méthylophages est d'abord initiée par l'oxydation du méthanol en formaldéhyde. Le formaldéhyde est ensuite assimilé soit par le cycle de la sérine, comme observé chez les *Hyphomicrobium* sp., soit par la voie du ribulose monophosphate, voie d'assimilation rencontrée chez les bactéries du genre *Methylophaga* (figure 2.8). Ces voies d'assimilation du formaldéhyde mènent à la production de composés C3 tels que le pyruvate, le 3-phosphoglycérate et le glycéraldéhyde-3-P qui permettront la biosynthèse des constituants cellulaires. Une portion du méthanol est également utilisée comme source d'énergie, servant de donneur d'électrons lors de la respiration et menant à la production de CO_2 .

Essentiellement, dans la voie du ribulose monophosphate (figure 6.1) le formaldéhyde est condensé avec le ribulose monophosphate sous l'action de l'hexulose phosphate synthase formant ainsi l'hexulose phosphate. L'hexulose phosphate est ensuite converti en fructose 6-phosphate grâce à l'enzyme phosphohexulose isomerase. Le fructose 6-phosphate est ultimement transformé, par une série de réactions en glycéraldéhyde-3-P ou en son isomère le dihydroxyacétone phosphate, permettant la synthèse des constituants cellulaires. Dans cette voie d'assimilation du carbone, la condensation de trois molécules de formaldéhyde résulte en la production nette d'une molécule de glycéraldéhyde-3-P.

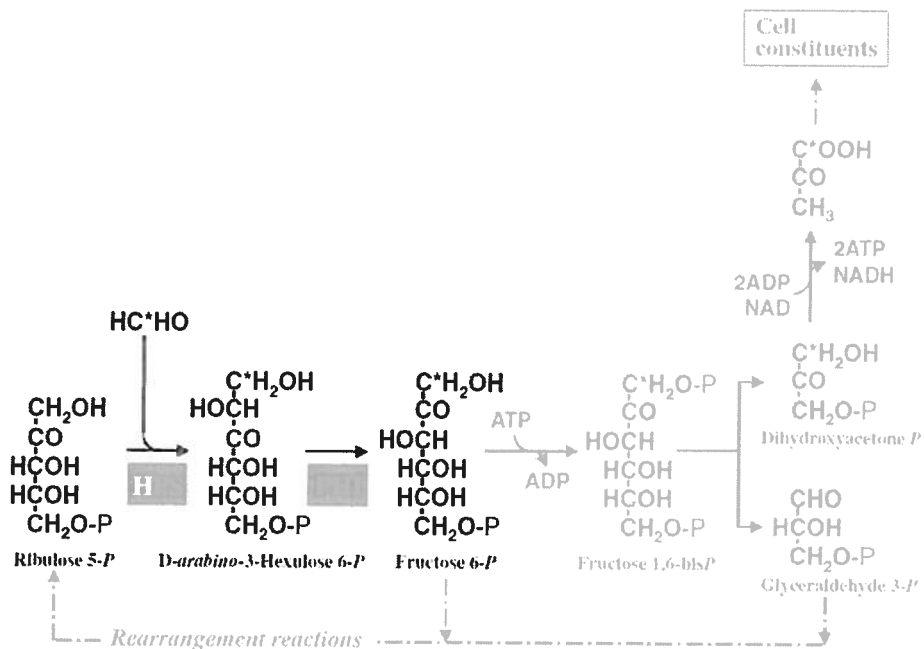


Figure 6.1. Voie du ribulose monophosphate pour l'assimilation du formaldéhyde. HPS : Hexulose phosphate synthase; PHI : Phosphohexulose isomerase. Tirée de Kato et al. (2006).

Dans le cycle de la sérine (figure 6.2), le formaldéhyde est transformé en méthylène tetrahydrofolate qui est condensé avec la glycine pour produire la sérine. La sérine subit ensuite une série de transformations résultant en la formation de phosphoénolpyruvate. Ce dernier est converti en oxaloacétate par l'ajout d'une molécule de CO₂ puis en malate par isomérisation. Le malate est ultimement transformé en glycine complétant ainsi le cycle de la sérine. Pour chaque composé C3 généré lors du cycle de la sérine, deux atomes de carbone sont issus du formaldéhyde et un atome de carbone du CO₂.

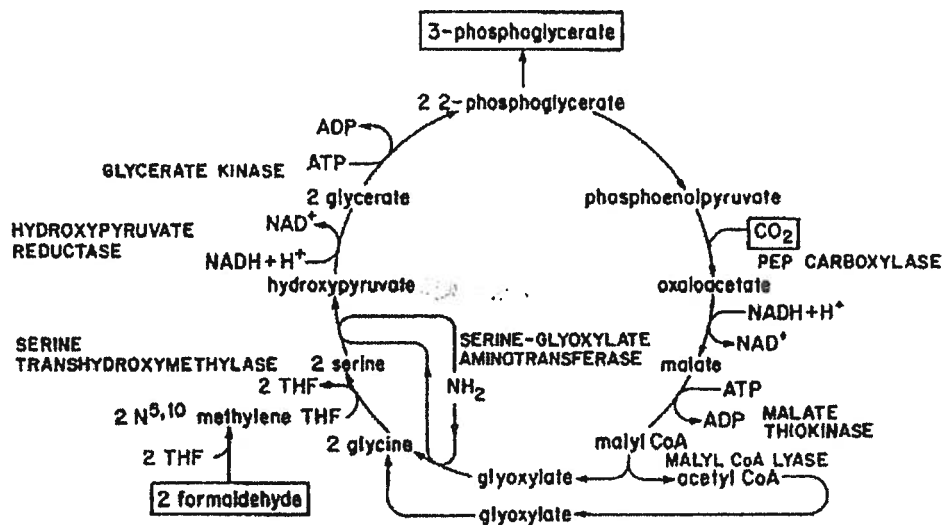


Figure 6.2. Cycle de la sérine pour l'assimilation du formaldéhyde. THF : Tetrahydrofolate; PEP : Phosphoénolpyruvate; CO₂ : Dioxyde de carbone. Le formaldéhyde, le 3-phosphoglycérate et le CO₂ sont présentés en encadré. Tirée de Lidstrom (2006).

Aucune bactérie affiliée aux *Hyphomicrobium* sp. n'a été détectée lors du SIP (article 1) ni lors des expériences de MAR-FISH (Labbé et al., 2007). Lors des essais de SIP et de MAR-FISH, le biofilm a été incubé dans de l'eau de mer artificielle supplémentée avec du nitrate et du ¹³C-méthanol sous conditions dénitrifiantes. Une trappe à CO₂, consistant en du KOH 1M, a été intégrée dans les cultures dans le but de limiter l'anormalité engendrée par l'assimilation du CO₂ par les bactéries autotrophes qui pourraient être présentes. Comme mentionné plus haut, contrairement à la voie du ribulose monophosphate, la voie de la sérine nécessite du CO₂ en plus du formaldéhyde pour la production de biomasse (Peyraud et al., 2009). Il a été démontré que le CO₂ est nécessaire au développement d'une communauté hétérotrophe-méthanotrophe du sol, l'absence de CO₂ résultant en une absence de la croissance des bactéries méthanotrophes. Cette communauté était principalement composée de méthanotrophes de type II qui utilisent la voie de la sérine pour l'assimilation du méthane (Acha et al., 2002). En se basant sur l'étude de Acha et al. (2002), il est donc possible qu'en voulant réduire l'assimilation du CO₂ par les bactéries autotrophes, en utilisant une trappe à CO₂, que nous ayons également limité l'assimilation du méthanol par les bactéries méthylophiles utilisant la voie de la sérine. Conséquemment, ceci aurait eu pour effet de limiter la croissance des *Hyphomicrobium* sp. dans les essais de SIP qui normalement, tel qu'observé en culture pure, ont la capacité de croître en présence de méthanol comme seule source de carbone et d'énergie. Baytshtok et al. (2009) ont réalisé une étude sur l'impact de la source d'électrons sur les populations dénitrifiantes méthylophiles dans un réacteur biologique séquentielle de dénitrification. Par SIP, ils ont mis en évidence l'implication de

bactéries affiliées au genre *Hyphomicrobium* dans la consommation du méthanol. Ginige et al. (2009) ont utilisé le SIP pour identifier les microorganismes responsables de l'utilisation du méthanol dans un réacteur de dénitrification pour le traitement des eaux usées domestiques. Ils ont observé que 8% des séquences provenant d'une génothèque d'ARNr 16S, réalisée à partir d'ADN ^{13}C , étaient affiliées au genre *Hyphomicrobium*. Les *Hyphomicrobium* sp. ont également une croissance lente ce qui pourrait expliquer notre incapacité à les détecter lors du SIP. Il est également possible que d'autres microorganismes méthylophages dénitrifiants à croissance lente n'aient pu être détectés. En conséquence, d'autres microorganismes non identifiés lors du SIP pourraient jouer un rôle dans l'assimilation du méthanol dans le biofilm dénitrifiant.

Suite à l'étalement du biofilm sur différents milieux gélosés propices à la croissance des *Methylophaga* sp., deux isolats, JAM1 et JAM7, affiliés au *Methylophaga* sp. ont été obtenus. Un de ces isolats, JAM1, réduit le NO_3^- en NO_2^- sous conditions dénitrifiantes. La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche JAM1 est de plus presque identique (1 nucléotide de différent) à la séquence du clone IAFDn39 (Labbé et al., 2003a) qui représenterait, selon la génothèques 16S, la population dominante du biofilm. Cette capacité de réduction du NO_3^- en NO_2^- a été appuyée par la détection de deux gènes *narG* (*narG1* et *narG2*) chez *Methylophaga* sp. JAM1 (Gamma-Protéobactérie), dont *narG1* est affilié aux Bêta-Protéobactéries menant à l'hypothèse du transfert horizontal de gènes. Cette hypothèse est supportée par un pourcentage d'identité de 61% entre *narG1* et *narG2* inférieur au seuil de 67% proposé par Palmer et al. (2009) indiquant que deux gènes *narG* proviennent d'espèces différentes. L'acquisition de ces gènes pourrait être à l'origine de l'adaptation de *Methylophaga* sp. JAM1 aux environnements pauvres en oxygène. Jusqu'à présent, les diverses études portant sur le transfert horizontal des gènes de dénitrification sont plutôt en désaccord avec la possibilité de récents événements de transfert horizontal de gènes chez les bactéries dénitrifiantes (Jones et al., 2008; Palmer et al., 2009). Le séquençage du génome de *Methylophaga* sp. JAM1 pourrait donc permettre d'infirmier ou de confirmer cette hypothèse par l'analyse du pourcentage en GC et de l'usage des codons. De plus, l'étude des distances entre les gènes *narG1* et *narG2* pourrait fournir des indices quant aux possibilités de duplication d'un gène ou d'intégration d'un gène d'origine exogène au génome de *Methylophaga* sp. JAM1. Un projet ayant pour objectif la caractérisation de cette souche est actuellement en cours et le séquençage du génome de *Methylophaga* sp. JAM1 devrait d'ailleurs être réalisé prochainement.

Les gènes *narG1* et *narG2* sont exprimés indépendamment des conditions d'incubation de *Methylophaga* sp. JAM1 en culture pure, que ce soit en anoxie, en aérobie/ NO_3^- ou en aérobie, suggérant une expression constitutive de ces gènes (article 1). Cependant, lors de l'étude de

l'expression des gènes de dénitrification dans le biofilm (article 2) seule l'expression de *narG1* a été détectée laissant supposer que *narG1* et *narG2* sont régulés de manières différentes. Tel que mentionné dans l'article 2, *E. coli* possède deux nitrate réductases membranaires distinctes dont les gènes codants sont régulés différemment bien que toujours exprimés à un niveau basal. L'expression d'une des enzymes est stimulée sous conditions dénitrifiantes alors que l'autre enzyme, dépendante de RpoS, pourrait plutôt être impliquée dans la réponse d'*E. coli* à des stress environnementaux (Chang et al., 1999). Jusqu'à maintenant les résultats obtenus n'ont pas permis de déterminer si l'expression de *narG1* et *narG2* procure un avantage sélectif à *Methylophaga* sp. JAM1 lui permettant de s'adapter rapidement aux fluctuations du milieu. Il serait intéressant d'évaluer l'effet de l'expression de ces deux gènes sur la croissance de *Methylophaga* sp. JAM1. L'étude de souches JAM1 mutées au niveau du gène *narG1* et/ou du gène *narG2* comparativement à la souche sauvage pourrait permettre de déterminer si l'expression de ces gènes lui procure un avantage expliquant son abondance dans le réacteur de dénitrification malgré sa capacité à réduire le NO_3^- en NO_2^- seulement.

Le méthanol est un composé organique volatile d'importance au niveau de la chimie atmosphérique puisqu'il réagit avec les radicaux hydroxyles pour former du formaldéhyde, des radicaux hydrogènes et de l'ozone. De plus, il contribue, par la formation d'acide formique, à renforcer l'acidité des pluies. Diverses études ont démontré l'implication, au niveau des océans, de bactéries du genre *Methylophaga* dans le cycle biogéochimique du méthanol (Neufeld et al., 2007b; Neufeld et al., 2008a; Neufeld et al., 2008b). La démonstration dans notre étude que les *Methylophaga* peuvent réduire le nitrate en nitrite en absence d'oxygène suggère qu'elles pourraient participer également à la biogéochimie des composés C1 dans les zones faibles en oxygène de l'océan. De plus, elles pourraient contribuer à la dissimilation de l'azote de par sa production de nitrite, lequel peut être utilisé par des bactéries dénitrifiantes ou par des bactéries anammox.

6.2. Étude de la diversité dénitrifiante

Une approche indépendante de la culture ciblant les gènes *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *qnorB* et *nosZ* codant pour les différentes réductases de la dénitrification a été employée dans le but d'évaluer la diversité des populations dénitrifiantes du biofilm. L'ensemble des résultats de ces travaux sont importants du fait qu'ils nous fournissent un portrait plus approfondi de la dynamique fonctionnelle du biofilm dénitrifiant. En effet, la combinaison de différentes techniques de biologie moléculaire nous a permis d'identifier les différentes populations dénitrifiantes qui composent le biofilm, d'évaluer leurs abondances et de déterminer si ces populations sont actives sous les

conditions d'opération du réacteur. À ma connaissance, ceci consiste en la première étude fournissant une vision globale de la fonctionnalité d'un biofilm pour l'élimination du nitrate en eau salée.

Cette étude a permis, dans un premier temps, de mettre en évidence une diversité dénitrifiante non révélée par l'utilisation des méthodes dépendantes de la culture. En effet, parmi les microorganismes pouvant être impliqués dans la dénitrification, seules les bactéries dénitrifiantes *Hyphomicrobium* sp. NL23 et *Paracoccus* sp. NL8 ainsi que les bactéries réductrices de nitrate *Methylophaga* sp. JAM1 et *Nitratireductor aquibiodomus* ont été isolées à partir du biofilm (Labbé et al., 2003a; Labbé et al., 2004; Auclair et al., 2010). Comme mentionné dans l'article 2, sept séquences codant pour *narG*, une pour *napA*, six pour *nirS*, une pour *nirK*, trois pour *cnorB* et 7 pour *nosZ* ont été détectées par PCR. Parmi ces gènes, les gènes *napA*, *nirK*, *cnorB* et *nosZ* d'*Hyphomicrobium* sp. NL23 ainsi que les gènes *narG1* et *narG2* de *Methylophaga* sp. JAM1 ont été retrouvés. Ces résultats suggèrent la présence de plusieurs populations dénitrifiantes pouvant jouer un rôle dans l'activité de dénitrification du biofilm. Ces gènes peuvent appartenir à différentes populations dont des bactéries réductrices de nitrate ou des bactéries dénitrifiantes. D'autre part, certains de ces gènes peuvent appartenir à une même population possédant soit l'ensemble des gènes de la réaction de dénitrification comme *Hyphomicrobium* sp. NL23, soit des copies multiples d'un même gène comme pour *Methylophaga* sp. JAM1. De ce fait, il est difficile d'évaluer la diversité réelle des populations dénitrifiantes qui composent le biofilm. De plus, il est possible que certaines espèces, non ciblées par les amorces dégénérées, n'aient pas été détectées.

En raison de certaines divergences phylogénétiques observées entre les gènes de dénitrification et les gènes de l'ARNr 16S, les informations phylogénétiques issues de cette étude ne peuvent être utilisées avec certitude pour établir l'identification taxonomique des populations dénitrifiantes (Delorme et al., 2003; Heylen et al., 2006; Dandie et al., 2007a; Heylen et al., 2007; Jones et al., 2008). Les séquences *napA*, *nirK*, *cnorB* et *nosZ* d'*Hyphomicrobium* sp. NL23, appartenant à la sous-classe des Alpha-Protéobactéries, sont bel et bien affiliées à des séquences retrouvées chez les Alpha-Protéobactéries. Par contre, *narG1* et *narG2* de *Methylophaga* sp. JAM1 sont affiliés à des séquences *narG* retrouvées chez les Bêta-Protéobactéries et les Gamma-Protéobactéries, respectivement. De ce fait, les gènes de dénitrification détectés chez les bactéries non cultivées dressent plutôt un portrait de la diversité fonctionnelle du biofilm. La technique d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) simultanée de l'ARNm et de l'ARNr pourrait être employée afin d'établir *in situ* un lien entre les gènes trouvés lors de la réalisation des différentes génothèques et l'identité taxonomique.

Suite à l'évaluation de la diversité fonctionnelle, des essais de qPCR ont été réalisés afin de déterminer l'abondance des différentes populations dénitrifiantes dans le biofilm. Les résultats de ces travaux ont démontré qu'*Hyphomicrobium* sp. NL23 et *Methylophaga* sp. JAM1 sont les espèces dénitrifiantes dominantes du biofilm, les autres populations dénitrifiantes étant de 10 à 10 000 fois moins abondantes. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes démontrant l'abondance des *Methylophaga* sp. dans le biofilm dénitrifiant (Labbé et al., 2003a; Labbé et al., 2007). De manière plus surprenante, les essais de qPCR indiquent qu'*Hyphomicrobium* sp. NL23 est aussi abondant que *Methylophaga* sp. JAM1 (même ordre de grandeur obtenu lors de la quantification des gènes). Lors d'une étude précédente réalisée par Labbé et al. (2007), la quantification par FISH a révélée que les *Methylophaga* sp. et les *Hyphomicrobium* sp. représentent, respectivement, de 36 à 79 % et de 7 à 8% de la population totale du biofilm. Cependant, cette quantification avait été réalisée lors du suivi, sur 37 jours, de la colonisation de lames microscopiques placées dans la partie supérieure du réacteur de dénitrification. Au cours de ce suivi, les *Hyphomicrobium* sp. ont été observées qu'après 22 jours suivant l'incubation des lames dans le réacteur. La période de temps allouée au suivi de la colonisation n'était peut-être pas suffisante pour permettre l'établissement d'un biofilm représentatif, au niveau de l'abondance des populations, du biofilm présent sur les supports. La quantification effectuée au cours de ce projet est plus représentative du fait qu'elle a été réalisée à partir de l'ADN extrait de la biomasse sur les supports directement prélevés du réacteur.

Parallèlement à ces travaux, des essais de RT-PCR ont été réalisés afin d'identifier les populations actives dans le biofilm. Les résultats démontrent que seulement quelques-uns des gènes détectés sont exprimés dans le biofilm, dont le gène *narG1* de la souche JAM1 ainsi que les gènes *nirK*, *cnorB* et *nosZ* de la souche NL23. L'expression des gènes *narG7* et *cnorB21* a également été observée. Bien qu'il soit possible que la majorité des gènes détectés par PCR n'aient pas été exprimés dans les conditions d'opération du réacteur lors du prélèvement de la biomasse, il est également possible que la sensibilité du RT-PCR n'ait pas permis de détecter les transcrits moins abondants présents dans l'ARN total du biofilm. Nogales et al. (2002) ont évalué par RT-PCR l'expression des gènes *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK* et *nosZ* dans des sédiments de l'estuaire de la rivière Colne. Bien que la présence des cinq gènes ait été détectée par PCR, uniquement l'expression de *nirS* a été observée directement par RT-PCR. Wertz et al. (2009) ont constaté que seule une portion des bactéries dénitrifiantes de type *nirK*, présentes dans des échantillons de sols prélevés dans un champ dédié à la culture de la pomme de terre, étaient effectivement actives. De plus, celles-ci correspondaient aux populations dénitrifiantes retrouvées de manière abondante et ubiquitaire parmi les différents échantillons.

Lors de la réalisation de ce projet, nous avons opté pour une approche plus conventionnelle utilisant la PCR. Avec l'avènement et l'accessibilité de plus en plus grandissante des techniques de séquençage à haut débit, une approche métagénomique pourrait sans doute dresser un portrait plus complet de la diversité fonctionnelle du biofilm dénitrifiant. En effet, il a été démontré que les techniques de séquençage à haut débit offrent une couverture élevée de la diversité génétique permettant la détection des microorganismes rares (Sogin et al., 2006). De ce fait, l'emploi de ces techniques pourrait permettre d'identifier des séquences génomiques rares non détectées lors de la réalisation des génothèques.

6.3. Dynamique du biofilm dénitrifiant

Dans le domaine du traitement des eaux usées, la biomasse sous forme de biofilm est largement utilisée. Les biofilms sont des environnements dynamiques où les différents microorganismes qui le composent peuvent adopter des comportements de compétition ou de collaboration afin d'assurer leur survie (Nadell et al., 2009). Dans les systèmes de dénitrification, ces différentes interactions à l'intérieur même du biofilm peuvent favoriser ou au contraire nuire au développement des microorganismes dénitrifiants et donc à la dissimilation de l'azote.

Le biofilm du dénitrificateur du Biodôme de Montréal est une communauté microbienne complexe. Une quinzaine d'espèces bactériennes, correspondant aux espèces dominantes du biofilm, y ont été détectées par PCR (Labbé et al., 2003a). Jusqu'à maintenant, les résultats obtenus suggèrent que *Methylophaga* sp. JAM1 et *Hyphomicrobium* sp. NL23 sont les acteurs principaux de la dénitrification dans le biofilm du réacteur du Biodôme de Montréal. En effet, ces microorganismes sont retrouvés de manière abondante dans le biofilm et semblent être actifs dans le réacteur tel que démontré par l'étude de l'expression des gènes de dénitrification. De plus, nos résultats montrent que *Methylophaga* sp. JAM1 est directement impliqué dans l'assimilation du méthanol sous conditions dénitrifiantes. Cependant, nous ne savons pas si la relation qui existe entre *Hyphomicrobium* sp. NL23 et *Methylophaga* sp. JAM1 est basée sur la coopération ou sur la compétition.

L'étude de l'expression des gènes de dénitrification dans le biofilm a démontré l'expression du gène *narG1* de *Methylophaga* sp. JAM1 ainsi que l'expression des gènes *nirK*, *cnorB* et *nosZ* d'*Hyphomicrobium* sp. NL23. En culture pure, la souche NL23 exprime sous conditions dénitrifiantes *napA* en plus de *nirK*, *cnorB* et *nosZ*. L'absence de l'expression de *napA* dans le biofilm suggère qu'*Hyphomicrobium* sp. NL23 utilisent directement le nitrite présent dans le biofilm pour supporter sa croissance. Ceci pourrait d'ailleurs être bénéfique pour la souche JAM1 en prévenant l'effet toxique

d'une accumulation de nitrite. Dans les essais de SIP (article 1) aucune accumulation de nitrite n'a été observée supportant l'idée que le nitrite produit par les bactéries réductrices de nitrate, telles la souche JAM1, est réduit par les bactéries dénitrifiantes présentes dans le biofilm. Cependant, la raison pouvant expliquer l'absence d'expression de *napA* dans le biofilm demeure obscure.

Notre étude est la première à mettre en évidence la présence du gène *napA* chez une bactérie du genre *Hyphomicrobium*. En effet, jusqu'à maintenant seul le gène *narG* avait été détecté chez l'ensemble des souches étudiées (Kloos et al., 1995; Fesefeldt et al., 1998) ainsi que chez les deux génomes d'*Hyphomicrobium* séquencés actuellement, soit celui d'*Hyphomicrobium denitrificans* et celui d'*Hyphomicrobium* sp. MC1. Différentes fonctions, présentées à la section 2.3.3.1, ont été attribuées à la nitrate réductase périplasmique (Bell et al., 1990; Bedzyk et al., 1999; Gavira et al., 2002; Delgado et al., 2003). L'expression du gène *napA* d'*Hyphomicrobium* sp. NL23 en culture pure (article 2) et l'observation d'une activité de dénitrification lorsqu'incubé sous conditions dénitrifiantes (Labbé et al., 2003a) sont en faveur d'un rôle de *napA* de la souche NL23 dans la dénitrification. Cependant, très peu d'informations ont été rapportées quant à la régulation des gènes *nap* lors de la respiration anaérobie (Stewart et al., 2002; Tabata et al., 2005). De plus, le mécanisme énergétique derrière la réduction du NO_3^- en NO_2^- par *napA* lors de la dénitrification demeure inconnu et nous ne savons pas si cette réaction est énergétiquement favorable.

Différents exemples démontrant des phénomènes d'alimentation croisée entre microorganismes ont été présentés dans la littérature (Helling et al., 1987; Stams, 1994; Turner et al., 1996; Dejonghe et al., 2003). Un des plus remarquables est sans aucun doute la nitrification dont les deux réactions menant à la transformation de l'ammonium en nitrate sont réalisées par des microorganismes distincts. Une explication basée sur la théorie cinétique, indiquant que les voies métaboliques plus courtes résultent en un plus haut taux de production d'ATP, a été proposée par Pfeiffer et Bonhoeffer (2004) afin d'expliquer que de telles relations d'alimentation croisée peuvent se développer entre les microorganismes. Cette théorie est basée sur les principes d'optimisation suivants : la vitesse de production d'ATP est maximisée, la concentration des enzymes de la voie métabolique est minimisée et la concentration des intermédiaires de la voie est également minimisée. La production des enzymes et la gestion des intermédiaires entraînant des coûts énergétiques pour la cellule.

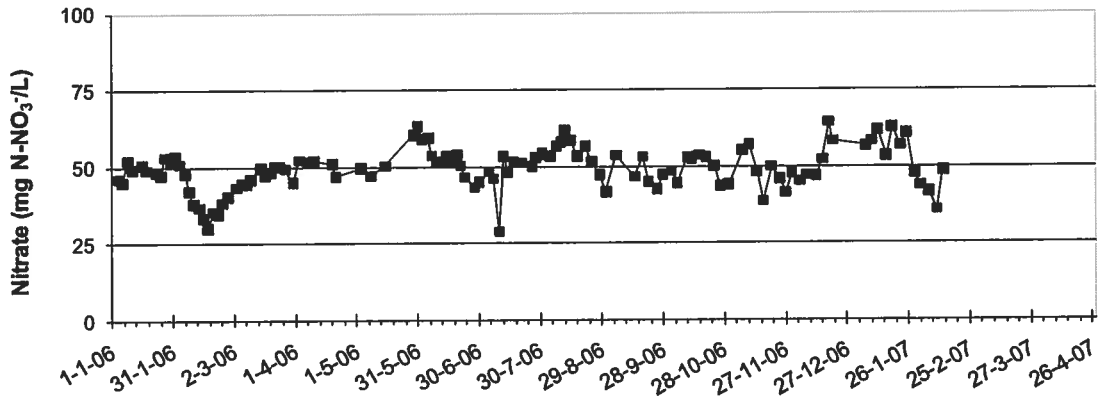
D'autres phénomènes de partage des ressources entre les microorganismes pourraient également avoir lieu à l'intérieur même du biofilm. En effet, il est possible que certaines bactéries dénitrifiantes reposent sur les sous-produits issus du métabolisme des méthylotrophes pour soutenir l'activité de dénitrification. Le fait que l'assimilation des composés C1 par *Hyphomicrobium* nécessite la présence de CO_2 laisse supposer que la production et l'accumulation de CO_2 à l'intérieur du biofilm, par les

autres microorganismes méthylophages dont *Methylophaga*, peuvent favoriser le développement des *Hyphomicrobium* sp. Ceci pourrait d'ailleurs être en lien avec la détection d'*Hyphomicrobium* sp. par PCR qui survient seulement 22 jours après le début de la colonisation de lames de microscopie placées dans le réacteur de dénitrification (Labbé et al., 2007).

Un autre scénario possible pouvant survenir dans les biofilms est celui d'une compétition, entre les différentes populations microbiennes, pour les ressources disponibles. Différentes études ont évaluées l'effet de la présence de populations réductrices de nitrate sur les performances globales de dénitrification. Gentile et al. (2007) ont étudié le lien entre l'évolution des communautés microbiennes et l'instabilité de l'activité de dénitrification lors du suivi de deux réacteurs de dénitrification. Une corrélation positive entre l'abondance de souches réductrices de nitrate, affiliées à *Delftia acidovorans* et *Achromobacter xylosoxidans*, et l'accumulation de nitrite était observée. D'autre part, une corrélation négative était observée entre l'abondance d'une souche dénitrifiante affiliée à *Acidovorax* et la concentration de nitrite. Ces résultats suggèrent une compétition entre les bactéries dénitrifiantes et les bactéries réductrices de nitrate pour l'accepteur d'électrons.

Un suivi, sur une période d'environ un an, des concentrations de nitrate et de nitrite dans l'effluent du réacteur de dénitrification du Biodôme de Montréal est présenté à la figure 6.3. Nous pouvons y observer des accumulations de nitrite qui semblent être corrélées à une meilleure élimination du nitrate suggérant des taux de réduction de nitrate supérieurs aux taux de dénitrification. La toxicité du nitrite étant supérieure à celle du nitrate de telles accumulations de nitrite ne sont pas désirées et de plus démontrent l'instabilité de la dénitrification. Une prochaine étape logique serait donc d'évaluer l'effet de l'abondance des différentes populations dont *Methylophaga* sp. JAM1 et *Hyphomicrobium* sp. NL23 sur les fluctuations de l'activité de dénitrification. Au cours de ce projet de recherche nous avons développé des outils permettant de quantifier, par qPCR, les gènes de dénitrification détectés dans le biofilm. Ces outils pourraient être employés pour suivre la dynamique des différentes populations dénitrifiantes ou réductrices de nitrate en corrélation avec les performances du réacteur.

A



B

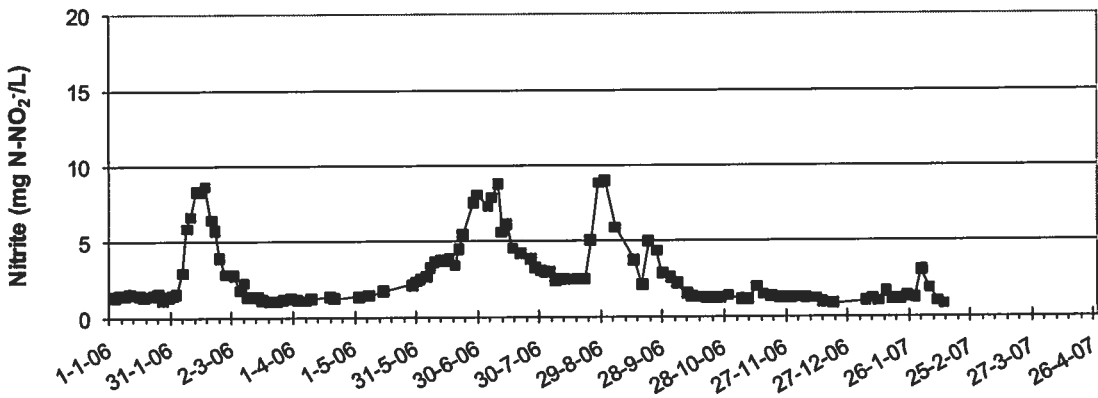


Figure 6.3. Suivi des concentrations de nitrate et de nitrite dans l'effluent du réacteur de dénitrification sur une période d'environ 1 an. Données du Biodôme de Montréal.

7. CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce projet de recherche nous a permis d'approfondir nos connaissances sur la diversité fonctionnelle du biofilm dénitrifiant du Biodôme de Montréal. Cependant, les informations issues de cette étude ne nous permettent pas de proposer des solutions permettant dans l'immédiat d'améliorer les performances du réacteur de dénitrification. Ces travaux ouvrent donc la voie à des projets de recherche futurs qui permettront de comprendre davantage les communautés microbiennes du biofilm et leurs impacts sur les performances de dénitrification.

Bien que nous ayons obtenu plusieurs indices quant aux rôles des deux populations bactériennes majoritaires du biofilm et identifié les populations dénitrifiantes qui le composent, la suite logique serait de déterminer l'impact de ces souches sur les performances de dénitrification. L'utilisation d'une approche génomique permettrait d'en apprendre davantage sur l'origine des gènes *narG* chez *Methylophaga* sp. JAM1. De plus, l'analyse des génomes et des essais en cultures pures pourraient apporter des indices quant à la régulation des gènes de dénitrification chez la souche JAM1 et *Hyphomicrobium* sp. NL23. Déterminer comment ces gènes sont régulés est nécessaire afin de comprendre la relation qui existe entre les souches JAM1 et NL23 dans le biofilm. De plus, des essais en bioréacteurs à l'échelle du laboratoire pourraient permettre de déterminer si cette relation est favorable ou plutôt défavorable à l'activité de réduction du NO_3^- en N_2 en corrélant la dynamique des différentes populations dénitrifiantes ou réductrices de nitrate avec les performances du réacteur sur une longue période.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Acha, V., Alba, J. et Thalasso, F. (2002) The absolute requirement for carbon dioxide for aerobic methane oxidation by a methanotrophic-heterotrophic soil community of bacteria. Biotechnology Letters, vol. 24, p. 675-679.
- Achterberg, E.P., Holland, T.W., Bowie, A.R., Fauzi, R., Mantoura, C. et Worsfold, P.J. (2001) Determination of iron in seawater. Analytica Chimica Acta, vol. 442, p. 1-14.
- Agrawal, G.D., Lunkad, S.K. et Malkhed, T. (1999) Diffuse agricultural nitrate pollution of groundwaters in India. Water Science and Technology, vol. 39, p. 67-75.
- Alabdula'aly, A.I., Al-Rehaili, A.M., Al-Zarah, A.I. et Khan, M.A. (2010) Assessment of nitrate concentration in groundwater in Saudi Arabia. Environmental Monitoring and Assessment, vol. 161, p. 1-9.
- Alvarez, L., Bricio, C., Gomez, M.J. et Berenguer, J. (2011) Lateral transfer of the denitrification pathway genes among *Thermus thermophilus* strains. Applied and Environmental Microbiology, vol. 77, p. 1352-1358.
- Amann, R.I., Ludwig, W. et Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, vol. 59, p. 143-169.
- Anthony, C. (1982) *The biochemistry of methylotrophs*. London, Academic Press Inc., 447 p.
- Arai, H., Sanbongi, Y., Igarashi, Y. et Kodama, T. (1990) Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome c-551 from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Letters, vol. 261, p. 196-198.
- Arai, H., Igarashi, Y. et Kodama, T. (1995) Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. FEBS Letters, vol. 371, p. 73-76.
- Aravinthan, V., Mino, T., Takizawa, S., Satoh, H. et Matsuo, T. (2001) Sludge hydrolysate as a carbon source for denitrification. Water Science and Technology, vol. 43, p. 191-199.
- Aslan, S. et Turkman, A. (2003) Biological denitrification of drinking water using various natural organic solid substrates. Water Science and Technology, vol. 48, p. 489-495.
- Auclair, J., Lépine, F., Parent, S. et Villemur, R. (2010) Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a *Methylophaga* strain containing two highly divergent *narG* sequences. ISME Journal, vol. 4, p. 1302-1313.
- Babiker, I.S., Mohamed, M.A.A., Terao, H., Kato, K. et Ohta, K. (2004) Assessment of groundwater contamination by nitrate leaching from intensive vegetable cultivation using geographical information system. Environment International, vol. 29, p. 1009-1017.

- Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Richter, O.M.H. et van Spanning, R.J.M. (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: Metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 62, p. 1046-1078.
- Balderston, W.L. et Sieburth, J.M. (1976) Nitrate removal in closed-system aquaculture by columnar denitrification. Applied and Environmental Microbiology, vol. 32, p. 808-818.
- Baliga, N.S., Bonneau, R., Facciotti, M.T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E.W., Shannon, P., Chiu, Y., Weng, R.S., Gan, R.R., Hung, P., Date, S.V., Marcotte, E., Hood, L. et Ng, W.V. (2004) Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: A halophilic archaeon from the Dead Sea. Genome Research, vol. 14, p. 2221-2234.
- Bartnikas, T.B., Tosques, I.E., Laratta, W.P., Shi, J.R. et Shapleigh, J.P. (1997) Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. Journal of Bacteriology, vol. 179, p. 3534-3540.
- Basaglia, M., Toffanin, A., Baldan, E., Bottegal, M., Shapleigh, J.P. et Casella, S. (2007) Selenite-reducing capacity of the copper-containing nitrite reductase of *Rhizobium sllae*. FEMS microbiology letters, vol. 269, p. 124-130.
- Baumann, B., Snozzi, M., Zehnder, A.J.B. et vanderMeer, J.R. (1996) Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. Journal of Bacteriology, vol. 178, p. 4367-4374.
- Baytshtok, V., Lu, H., Park, H., Kim, S., Yu, R. et Chandran, K. (2009) Impact of varying electron donors on the molecular microbial ecology and biokinetics of methylotrophic denitrifying bacteria. Biotechnology and Bioengineering, vol. 102, p. 1527-1536.
- Bedzyk, L., Wang, T. et Ye, R.W. (1999) The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. Journal of Bacteriology, vol. 181, p. 2802-2806.
- Bell, L.C., Richardson, D.J. et Ferguson, S.J. (1990) Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*: The periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification. FEBS Letters, vol. 265, p. 85-87.
- Beller, H.R., Chain, P.S., Letain, T.E., Chakicherla, A., Larimer, F.W., Richardson, P.M., Coleman, M.A., Wood, A.P. et Kelly, D.P. (2006) The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. Journal of Bacteriology, vol. 188, p. 1473-1488.

- Berks, B.C., Richardson, D.J., Reilly, A., Willis, A.C. et Ferguson, S.J. (1995) The *napEDABC* gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. Biochemical Journal, vol. 309, p. 983-992.
- Biddle, J.F., Fitz-Gibbon, S., Schuster, S.C., Brenchley, J.E. et House, C.H. (2008) Metagenomic signatures of the Peru Margin seafloor biosphere show a genetically distinct environment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 105, p. 10583-10588.
- Blasco, F., Iobbi, C., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V. et Chippaux, M. (1990) Nitrate reductases of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJI* operon. Molecular and General Genetics, vol. 222, p. 104-111.
- Bonin, P. (1996) Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: A dissimilatory pathway. FEMS Microbiology Ecology, vol. 19, p. 27-38.
- Borodina, E., Cox, M.J., McDonald, I.R. et Murrell, J.C. (2005) Use of DNA-stable isotope probing and functional gene probes to investigate the diversity of methyl chloride-utilizing bacteria in soil. Environmental Microbiology, vol. 7, p. 1318-1328.
- Boschker, H.T.S., Nold, S.C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R.J. et Cappenberg, T.E. (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers. Nature, vol. 392, p. 801-805.
- Bowen, J.L., Ward, B.B., Morrison, H.G., Hobbie, J.E., Valiela, I., Deegan, L.A. et Sogin, M.L. (2011) Microbial community composition in sediments resists perturbation by nutrient enrichment. ISME Journal, vol. 5.
- Braker, G., Fesefeldt, A. et Witzel, K.P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 3769-3775.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H. et Tiedje, J.M. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, p. 2096-2104.
- Braker, G. et Tiedje, J.M. (2003) Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, vol. 69, p. 3476-3483.
- Brandes, J.A., Devol, A.H. et Deutsch, C. (2007) New developments in the marine nitrogen cycle. Chemical Reviews, vol. 107, p. 577-589.

- Brandt, U. et Trumpower, B. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 29, p. 165-197.
- Braun, C. et Zumft, W.G. (1991) Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide. Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 22785-22788.
- Braun, C. et Zumft, W.G. (1992) The structural genes of the nitric oxide reductase complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kilobase gene cluster for denitrification. Journal of Bacteriology, vol. 174, p. 2394-2397.
- Brauner, C.J., Val, A.L. et Randall, D.J. (1993) The effect of graded methemoglobin levels on the swimming performance of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Journal of Experimental Biology, vol. 185, p. 121-135.
- Brettar, I., Labrenz, M., Flavier, S., Botel, J., Kuosa, H., Christen, R. et Hofle, M.G. (2006) Identification of a *Thiomicrospira denitrificans*-like epsilonproteobacterium as a catalyst for autotrophic denitrification in the central Baltic Sea. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, p. 1364-1372.
- Brondijk, T.H.C., Nilavongse, A., Filenko, N., Richardson, D.J. et Cole, J.A. (2004) NapGH components of the periplasmic nitrate reductase of *Escherichia coli* K-12: location, topology and physiological roles in quinol oxidation and redox balancing. Biochemical Journal, vol. 379, p. 47-55.
- Bru, D., Sarr, A. et Philippot, L. (2007) Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, p. 5971-5974.
- Büsch, A., Friedrich, B. et Cramm, R. (2002) Characterization of the *norB* gene, encoding nitric oxide reductase, in the nondenitrifying cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 668-672.
- Camargo, J.A., Alonso, A. et Salamanca, A. (2005) Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. Chemosphere, vol. 58, p. 1255-1267.
- Camargo, J.A. et Alonso, A. (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. Environment International, vol. 32, p. 831-849.
- Carter, J.P., Hsaio, Y.H., Spiro, S. et Richardson, D.J. (1995) Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, p. 2852-2858.

- Casella, S., Shapleigh, J.P., Toffanin, A. et Basaglia, M. (2006) Investigation into the role of the truncated denitrification chain in *Rhizobium sultae* strain HCNT1. Biochemical Society Transactions, vol. 34, p. 130-132.
- Castro, H., Reddy, K.R. et Ogram, A. (2002) Composition and function of sulfate-reducing prokaryotes in eutrophic and pristine areas of the Florida Everglades. Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 6129-6137.
- Cebron, A., Bodrossy, L., Chen, Y., Singer, A.C., Thompson, I.P., Prosser, J.I. et Murrell, J.C. (2007) Identity of active methanotrophs in landfill cover soil as revealed by DNA-stable isotope probing. FEMS Microbiology Ecology, vol. 62, p. 12-23.
- Chan, Y.K. et McCormick, W.A. (2004) Experimental evidence for plasmid-borne *nor-nir* genes in *Sinorhizobium meliloti* JJ1c10. Canadian Journal of Microbiology, vol. 50, p. 657-667.
- Chang, L., Wei, L.L.C., Audia, J.P., Morton, R.A. et Schellhorn, H.E. (1999) Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. Molecular Microbiology vol. 34, p. 756-766.
- Cheng, S.Y. et Chen, J.C. (2002) Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. Aquatic Toxicology, vol. 61, p. 181-193.
- Choi, P.S., Naal, Z., Moore, C., Casado-Rivera, E., Abruna, H.D., Helmann, J.D. et Shapleigh, J.P. (2006) Assessing the impact of denitrifier-produced nitric oxide on other bacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, p. 2200-2205.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. et Franson, M.A.H. (éd.) (1998) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, DC, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, 1220 p.
- Cole, J.A. et Brown, C.M. (1980) Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. FEMS Microbiology Letters, vol. 7, p. 65-72.
- Cortes-Lorenzo, C., Molina-Munoz, M.L., Gomez-Villalba, B., Vilchez, R., Ramos, A., Rodelas, B., Hontoria, E. et Gonzalez-Lopez, J. (2006) Analysis of community composition of biofilms in a submerged filter system for the removal of ammonia and phenol from industrial wastewater. Biochemical Society Transactions, vol. 34, p. 165-168.
- Cox, R.B. et Quayle, J.R. (1975) The autotrophic growth of *Micrococcus denitrificans* on methanol. Biochemical Journal, vol. 150, p. 569-571.

- Coyne, M.S., Arunakumari, A., Averill, B.A. et Tiedje, J.M. (1989) Immunological identification and distribution of dissimilatory heme *cdl* and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol. 55, p. 2924-2931.
- Coyne, M.S., Arunakumari, A., Pankratz, H.S. et Tiedje, J.M. (1990) Localization of the cytochrome *cdl* and copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. Journal of Bacteriology, vol. 172, p. 2558-2562.
- Cramm, R., Siddiqui, R.A. et Friedrich, B. (1997) Two isofunctional nitric oxide reductases in *Alcaligenes eutrophus* H16. Journal of Bacteriology, vol. 179, p. 6769-6777.
- Cruz-Garcia, C., Murray, A.E., Klappenbach, J.A., Stewart, V. et Tiedje, J.M. (2007) Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. Journal of Bacteriology, vol. 189, p. 656-662.
- Dandie, C.E., Burton, D.L., Zebarth, B.J., Trevors, J.T. et Goyer, C. (2007a) Analysis of denitrification genes and comparison of *nosZ*, *cnorB* and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. Systematic and Applied Microbiology, vol. 30, p. 128-138.
- Dandie, C.E., Miller, M.N., Burton, D.L., Zebarth, B.J., Trevors, J.T. et Goyer, C. (2007b) Nitric oxide reductase-targeted real-time PCR quantification of denitrifier populations in soil. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, p. 4250-4258.
- Davies, K.J., Lloyd, D. et Boddy, L. (1989) The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of General Microbiology, vol. 135, p. 2445-2451.
- DeBoer, A.P.N., VanderOost, J., Reijnders, W.N.M., Westerhoff, H.V., Stouthamer, A.H. et VanSpanning, R.J.M. (1996) Mutational analysis of the *nor* gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. European Journal of Biochemistry, vol. 242, p. 592-600.
- Dedysh, S.N., Knief, C. et Dunfield, P.F. (2005) *Methylocella* species are facultatively methanotrophic. Journal of Bacteriology, vol. 187, p. 4665-4670.
- Dejonghe, W., Berteloot, E., Goris, J., Boon, N., Crul, K., Maertens, S., Hofte, M., De Vos, P., Verstraete, W. et Top, E.M. (2003) Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. Applied and Environmental Microbiology, vol. 69, p. 1532-1541.

- Delgado, M.J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E.J. et Muller, P. (2003) The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. Microbiology, vol. 149, p. 3395-3403.
- Delorme, S., Philippot, L., Edel-Hermann, V., Deulvot, C., Mougel, C. et Lemanceau, P. (2003) Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ*, and 16S rRNA genes in fluorescent pseudomonads. Applied and Environmental Microbiology, vol. 69, p. 1004-1012.
- DeMoss, J.A. et Hsu, P.Y. (1991) NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, vol. 173, p. 3303-3310.
- DeNiro, M.J. et Epstein, S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica et Cosmochimica Acta, vol. 42, p. 495-506.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases, vol. 8, p. 881-890.
- Doronina, N., Darmaeva, T. et 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. Systematic and Applied Microbiology, vol. 26, p. 382-389.
- Doronina, N.V., Darmaeva, T.D. et Trotsenko, Y.A. (2003b) *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 53, p. 223-229.
- Doronina, N.V., Li Ts, D., Ivanova, E.G. et Trotsenko Iu, A. (2005) *Methylophaga murata* sp. nov.: a haloalkaliphilic aerobic methylotroph from deteriorating marble. Mikrobiologiya, vol. 74, p. 511-519.
- Drysdale, G.D., Kasan, H.C. et Bux, F. (2001) Assessment of denitrification by the ordinary heterotrophic organisms in an NDBEPR activated sludge system. Water science and technology, vol. 43, p. 147-154.
- Dubourdieu, M. et Demoss, J.A. (1992) The *narJ* gene product is required for biogenesis of respiratory nitrate reductase in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, vol. 174, p. 867-872.
- Dumont, M.G., Pommerenke, B., Casper, P. et Conrad, R. (2011) DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. Environmental Microbiology, vol., Doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02415.x.

- Dunfield, P.F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A.V., Stott, M.B., Hou, S., Ly, B., Saw, J.H., Zhou, Z., Ren, Y., Wang, J., Mountain, B.W., Crowe, M.A., Weatherby, T.M., Bodelier, P.L., Liesack, W., Feng, L., Wang, L. et Alam, M. (2007) Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. Nature, vol. 450, p. 879-882.
- Edwards, R.A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D.M., Saar, M.O., Alexander, S., Alexander, E.C. et Rohwer, F. (2006) Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. BMC Genomics, vol. 7, Doi: 10.1186/1471-2164-7-57.
- Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R. et Kroneck, P.M. (1999) Structure of cytochrome *c* nitrite reductase. Nature, vol. 400, p. 476-480.
- Enticknap, J.J., Kelly, M., Peraud, O. et Hill, R.T. (2006) Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, p. 3724-3732.
- Eschbach, M., Möbitz, H., Rompf, A. et Jahn, D. (2003) Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. FEMS Microbiology Letters, vol. 223, p. 227-230.
- Etchebehere, C. et Tiedje, J. (2005) Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. from a high-nitrate-removal-rate reactor. Applied and Environmental Microbiology, vol. 71, p. 5642-5645.
- Ettwig, K.F., Shima, S., van de Pas-Schoonen, K.T., Kahnt, J., Medema, M.H., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S. et Strous, M. (2008) Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. Environmental Microbiology, vol. 10, p. 3164-3173.
- Ettwig, K.F., van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K.T., Jetten, M.S. et Strous, M. (2009) Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. Applied and Environmental Microbiology, vol. 75, p. 3656-3662.
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Op den Camp, H.J., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S. et Strous, M. (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. Nature, vol. 464, p. 543-548.
- Euzéby, J.P. (1998-2011) List of prokaryotic names with standing in nomenclature URL: <http://www.bacterio.cict.fr/>.
- Felsenstein, J. (1989) PHYLIP- phylogeny inference package. Cladistics, vol. 5, p. 164-166.

- Feng, L., Wang, W., Cheng, J.S., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C.X., Tang, Y., Liu, X.Q., Han, W.Q., Peng, X., Liu, R.L. et Wang, L. (2007) Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 104, p. 5602-5607.
- Fernandes, S.O., Bharathi, P.A.L., Bonin, P.C. et Michotey, V.D. (2010) Denitrification: An important pathway for nitrous oxide production in tropical mangrove sediments (Goa, India). Journal of Environmental Quality, vol. 39, p. 1507-1516.
- Fernandez-Nava, Y., Maranon, E., Soons, J. et Castrillon, L. (2010) Denitrification of high nitrate concentration wastewater using alternative carbon sources. Journal of Hazardous Materials, vol. 173, p. 682-688.
- Fesefeldt, A., Kloos, K., Bothe, H., Lemmer, H. et Gliesche, C.G. (1998) Distribution of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium* spp. and other budding bacteria. Canadian journal of microbiology, vol. 44, p. 181-186.
- Flanagan, D.A., Gregory, L.G., Carter, J.P., Karakas-Sen, A., Richardson, D.J. et Spiro, S. (1999) Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. FEMS Microbiology Letters, vol. 177, p. 263-270.
- Flores, G.E., Campbell, J.H., Kirshtein, J.D., Meneghin, J., Podar, M., Steinberg, J.I., Seewald, J.S., Tivey, M.K., Voytek, M.A., Yang, Z.K. et Reysenbach, A.L. (2011) Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. Environmental Microbiology, vol., Doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02463.x.
- Folland, C.K., Karl, T.R., Christy, J.R., Clarke, R.A., Gruza, G.V., Jouzel, J., Mann, M.E., Oerlemans, J., Salinger, M.J. et Wang, S.-W. (2001) Technical summary of the working group I report. In: *Climate change 2001: The scientific basis Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Houghton, J.T., Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C.A. Johnson (ed). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, Cambridge University Press, p. 21-84.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D.W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M. et Van Dorland, R. (2007) Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: *Climate change 2007: The physical science basis Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M.

- Marquis, K.B. Averyt, M.Tignor and H.L. Miller (ed). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, Cambridge University Press, p. 131-234.
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E. et Oakley, B.B. (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, p. 14683-14688.
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A. et Olsen, G.J. (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology, vol. 74, p. 2461-2470.
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R. et Vorosmarty, C.J. (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. Biogeochemistry, vol. 70, p. 153-226.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P. et Sutton, M.A. (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. Science, vol. 320, p. 889-892.
- Gao, H., Schreiber, F., Collins, G., Jensen, M.M., Kostka, J.E., Lavik, G., de Beer, D., Zhou, H.Y. et Kuypers, M.M.M. (2010) Aerobic denitrification in permeable Wadden Sea sediments. ISME Journal, vol. 4, p. 417-426.
- Gavira, M., Roldan, M.D., Castillo, F. et Moreno-Vivian, C. (2002) Regulation of *nap* gene expression and periplasmic nitrate reductase activity in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM158. Journal of Bacteriology, vol. 184, p. 1693-1702.
- Geets, J., de Cooman, M., Wittebolle, L., Heylen, K., Vanparys, B., De Vos, P., Verstraete, W. et Boon, N. (2007) Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 75, p. 211-221.
- Gentile, M.E., Jessup, C.M., Nyman, J.L. et Criddle, C.S. (2007) Correlation of functional instability and community dynamics in denitrifying dispersed-growth reactors. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, p. 680-906.
- Ginige, M.P., Hugenholtz, P., Daims, H., Wagner, M., Keller, J. et Blackall, L.L. (2004) Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, p. 588-596.

- Ginige, M.P., Bowyer, J.C., Foley, L., Keller, J. et Yuan, Z. (2009) A comparative study of methanol as a supplementary carbon source for enhancing denitrification in primary and secondary anoxic zones. Biodegradation, vol. 20, p. 221-234.
- Glockner, A.B., Jungst, A. et Zumft, W.G. (1993) Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome *cd1*-free background (NirS⁻) of *Pseudomonas stutzeri*. Archives of Microbiology, vol. 160, p. 18-26.
- Godin, J.P., Fay, L.B. et Hopfgartner, G. (2007) Liquid chromatography combined with mass spectrometry for ¹³C isotopic analysis in life science research. Mass Spectrometry Reviews, vol. 26, p. 751-774.
- Gomez, M.A., Gonzalez-Lopez, J. et Hontoria-Garcia, E. (2000) Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. Journal of Hazardous Materials, vol. 80, p. 69-80.
- Gomez, M.A., Hontoria, E. et Gonzalez-Lopez, J. (2002) Effect of dissolved oxygen concentration on nitrate removal from groundwater using a denitrifying submerged filter. Journal of Hazardous Materials, vol. 90, p. 267-278.
- Gonzalez, P.J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C.D. et Moura, J.J. (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. Journal of Inorganic Biochemistry, vol. 100, p. 1015-1023.
- Goshe, M.B. et Anderson, V.E. (1995) Determination of amino acid isotope ratios by electrospray ionization-mass spectrometry. Analytical Biochemistry, vol. 231, p. 387-392.
- Greer, F.R. et Shannon, M. (2005) Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. Pediatrics, vol. 116, p. 784-776.
- Gregory, L.G., Karakas-Sen, A., Richardson, D.J. et Spiro, S. (2000) Detection of genes for membrane-bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA. FEMS Microbiology Letters, vol. 183, p. 275-279.
- Grguric, G., Wetmore, S.S. et Fournier, R.W. (2000) Biological denitrification in a closed seawater system. Chemosphere, vol. 40, p. 549-555.
- Groupe scientifique sur l'eau (2003) Nitrates/Nitrites. In: *Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine*. Institut national de santé publique du Québec, 12 p.
- Gugliandolo, C., Lentini, V. et Maugeri, T.L. (2011) Distribution and diversity of bacteria in a saline meromictic lake as determined by PCR-DGGE of 16S rRNA gene fragments. Current Microbiology, vol. 62, p. 159-166.

- Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M.C., Maas, B., van de Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M. et Schmidt, I. (2005) Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol. 71, p. 1066-1071.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, vol. 41, p. 95-98.
- Hallin, S. et Lindgren, P.E. (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 1652-1657.
- Hallin, S., Throback, I.N., Dicksved, J. et Pell, M. (2006) Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, p. 5445-5452.
- Hamersley, M.R., Lavik, G., Woebken, D., Rattray, J.E., Lam, P., Hopmans, E.C., Damste, J.S.S., Kruger, S., Graco, M., Gutierrez, D. et Kuypers, M.M.M. (2007) Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. Limnology and Oceanography, vol. 52, p. 923-933.
- Hamlin, H.J., Michaels, J.T., Beaulaton, C.M., Graham, W.F., Dutt, W., Steinbach, P., Losordo, T.M., Schrader, K.K. et Main, K.L. (2008a) Comparing denitrification rates and carbon sources in commercial scale upflow denitrification biological filters in aquaculture. Aquacultural Engineering, vol. 38, p. 79-92.
- Hamlin, H.J., Moore, B.C., Edwards, T.M., Larkin, I.L.V., Boggs, A., High, W.J., Main, K.L. et Guillette, L.J. (2008b) Nitrate-induced elevations in circulating sex steroid concentrations in female Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) in commercial aquaculture. Aquaculture, vol. 281, p. 118-125.
- Harder, W., Attwood, M. et Quayle, J. (1973) Methanol assimilation by *Hyphomicrobium* sp. Journal of General Microbiology, vol. 78, p. 155-163.
- Harms, H., Koops, H.P. et Wehrmann, H. (1976) An ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosovibrio tenuis* nov. gen. nov. sp. Archives of Microbiology vol. 108, p. 105-111.
- Hartig, E., Schiek, U., Vollack, K.U. et Zumft, W.G. (1999) Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, vol. 181, p. 3658-3665.
- Heering, S.H.A. et de Vries, S. (2004) NO reductase from *Bacillus azotoformans* is a bifunctional enzyme accepting electrons from menaquinol and a specific endogenous membrane-bound cytochrome *c₅₅₁*. Biochemistry, vol. 43, p. 13487-13495.

- Helling, R.B., Vargas, C.N. et Adams, J. (1987) Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment. Genetics, vol. 116, p. 349-358.
- Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S. et Saraste, M. (2000) Nitric oxide reductases in bacteria. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, vol. 1459, p. 266-273.
- Henry, S., Baudoin, E., Lopez-Gutierrez, J.C., Martin-Laurent, F., Baumann, A. et Philippot, L. (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, vol. 59, p. 327-335.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S. et Philippot, L. (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, p. 5181-5189.
- Her, J.-J. et Huang, J.-S. (1995) Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough Bioresource Technology, vol. 54, p. 45-51.
- Heylen, K., Gevers, D., Vanparys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N. et De Vos, P. (2006) The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. Environmental Microbiology, vol. 8, p. 2012-2021.
- Heylen, K., Vanparys, B., Gevers, D., Wittebolle, L., Boon, N. et De Vos, P. (2007) Nitric oxide reductase (*norB*) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (*nir*) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. Environmental Microbiology, vol. 9, p. 1072-1077.
- Hoffman, D.W. et Holland, J.A. (1995) Preparation of carbon-13 labeled ribonucleotides using acetate as an isotope source. Nucleic Acids Research, vol. 23, p. 3361-3362.
- Hoffmann, T., Frankenberg, N., Marino, M. et Jahn, D. (1998) Ammonification in *Bacillus subtilis* utilizing dissimilatory nitrite reductase is dependent on *resDE*. Journal of Bacteriology, vol. 180, p. 186-189.
- Hole, U.H., Vollack, K.U., Zumft, W.G., Eisenmann, E., Siddiqui, R.A., Friedrich, B. et Kroneck, P.M. (1996) Characterization of the membranous denitrification enzymes nitrite reductase (cytochrome *cdI*) and copper-containing nitrous oxide reductase from *Thiobacillus denitrificans*. Archives of Microbiology, vol. 165, p. 55-61.
- Honisch, U. et Zumft, W.G. (2003) Operon structure and regulation of the *nos* gene region of *Pseudomonas stutzeri*, encoding an ABC-Type ATPase for maturation of nitrous oxide reductase. Journal of Bacteriology, vol. 185, p. 1895-1902.

- Howarth, R.W. et Marino, R. (2006) Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: Evolving views over three decades. Limnology and Oceanography, vol. 51, p. 364-376.
- Hoyle, B.D., Alcantara, J. et Costerton, J.W. (1992) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 36, p. 2054-2056.
- Huber, T., Faulkner, G. et Hugenholtz, P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. Bioinformatics, vol. 20, p. 2317-2319.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M. et Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. Journal of Bacteriology, vol. 180, p. 4765-4774.
- Jain, R. et Shapleigh, J.P. (2001) Characterization of *nirV* and a gene encoding a novel pseudoazurin in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. Microbiology, vol. 147, p. 2505-2515.
- Janvier, M., Frehel, C., Grimont, F. et Gasser, F. (1985) *Methylophaga marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., marine methylotrophs. International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 35, p. 131-139.
- Janvier, M. et Grimont, P.A.D. (1995) The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch gamma of Proteobacteria. Research in Microbiology, vol. 146, p. 543-550.
- Jetten, M.S. (2008) The microbial nitrogen cycle. Environmental Microbiology, vol. 10, p. 2903-2909.
- Jiang, Q.Q. et Bakken, L.R. (1999) Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 2679-2684.
- Jickells, T.D., An, Z.S., Andersen, K.K., Baker, A.R., Bergametti, G., Brooks, N., Cao, J.J., Boyd, P.W., Duce, R.A., Hunter, K.A., Kawahata, H., Kubilay, N., laRoche, J., Liss, P.S., Mahowald, N., Prospero, J.M., Ridgwell, A.J., Tegen, I. et Torres, R. (2005) Global iron connections between desert dust, ocean biogeochemistry, and climate. Science, vol. 308, p. 67-71.
- Jones, C.M., Stres, B., Rosenquist, M. et Hallin, S. (2008) Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. Molecular Biology and Evolution, vol. 25, p. 1955-1966.
- Jones, C.M. et Hallin, S. (2010) Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. ISME Journal, vol. 4, p. 633-641.
- Jones, J.G., Davison, W. et Gardener, S. (1984) Iron reduction by bacteria: range of organisms involved and metals reduced. FEMS Microbiology Letters, vol. 21, p. 133-136.

- Kampschreur, M.J., Temmink, H., Kleerebezem, R., Jetten, M.S. et van Loosdrecht, M.C. (2009) Nitrous oxide emission during wastewater treatment. Water Research, vol. 43, p. 4093-4103.
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschirko, D., Bru, D. et Philippot, L. (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, p. 5957-5962.
- Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L.A., van de Vossenberg, J., Schmid, M.C., Webb, R.I., Schouten, S., Fuerst, J.A., Damste, J.S.S., Jetten, M.S.M. et Strous, M. (2007) *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Systematic and Applied Microbiology, vol. 30, p. 39-49.
- Kato, N., Yurimoto, H. et Thauer, R.K. (2006) The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, vol. 70, p. 10-21.
- Kawasaki, S., Arai, H., Kodama, T. et Igarashi, Y. (1997) Gene cluster for dissimilatory nitrite reductase (*nir*) from *Pseudomonas aeruginosa*: sequencing and identification of a locus for heme *d₁* biosynthesis. Journal of Bacteriology, vol. 179, p. 235-242.
- Kelly, D.P., Euzeby, J.P., Goodhew, C.F. et Wood, A.P. (2006) Redefining *Paracoccus denitrificans* and *Paracoccus pantotrophus* and the case for a reassessment of the strains held by international culture collections. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 56, p. 2495-2500.
- Kelly, J.F. (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. Canadian Journal of Zoology, vol. 78, p. 1-27.
- Kern, M. et Simon, J. (2009) Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, vol. 1787, p. 646-656.
- Kim, H.G., Doronina, N.V., Trotsenko, Y.A. et Kim, S.W. (2007) *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 57, p. 2096-2101.
- Kim, S.W., Fushinobu, S., Zhou, S., Wakagi, T. et Shoun, H. (2009) Eukaryotic *nirK* genes encoding copper-containing nitrite reductase: originating from the protomitochondrion? Applied and Environmental Microbiology, vol. 75, p. 2652-2658.
- Kloos, K., Fesefeldt, A., Gliesche, C.G. et Bothe, H. (1995) DNA-probing indicates the occurrence of denitrification and nitrogen fixation genes in Hyphomicrobium. Distribution of denitrifying and

- nitrogen fixing isolates of *Hyphomicrobium* in a sewage treatment plant. FEMS Microbiology Ecology, vol. 18, p. 205-213.
- Knowles, R. (1982) Denitrification. Microbiological Reviews, vol. 46, p. 43-70.
- Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F. et Shoun, H. (1996) Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 16263-16267.
- Konneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B. et Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature, vol. 437, p. 543-546.
- Kopp, R., Palikova, M., Mares, J., Navratil, S., Kubicek, Z. et Zikova, A. (2011) Haematological indices are modulated in juvenile carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins produced by cyanobacterial water bloom. Journal of Fish Diseases, vol. 34, p. 103-114.
- Koppenhofer, A., Little, R.H., Lowe, D.J., Ferguson, S.J. et Watmough, N.J. (2000) Oxidase reaction of cytochrome *cd₁* from *Paracoccus pantotrophus*. Biochemistry, vol. 39, p. 4028-4036.
- Korner, H. et Zumft, W.G. (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 55, p. 1670-1676.
- Kowalchuk, G.A. et Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. Annual Review of Microbiology, vol. 55, p. 485-529.
- Kreuzer-Martin, H.W. (2007) Stable isotope probing: Linking functional activity to specific members of microbial communities. Soil Science Society of America journal, vol. 71, p. 611-619.
- Kreuzer-Martin, H.W. et Jarman, K.H. (2007) Stable isotope ratios and forensic analysis of microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, p. 3896-3908.
- Labbé, N., Juteau, P., Parent, S. et Villemur, R. (2003a) Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the montreal biodome, Canada. Microbial Ecology, vol. 46, p. 12-21.
- Labbé, N., Parent, S. et Villemur, R. (2003b) Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. Water Research, vol. 37, p. 914-920.
- Labbé, N., Parent, S. et Villemur, R. (2004) *Nitratreductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov., a novel alpha-proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 54, p. 269-273.

- Labbé, N., Laurin, V., Juteau, P., Parent, S. et Villemur, R. (2007) Microbiological community structure of the biofilm of a methanol-fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms. Microbial Ecology, vol. 53, p. 621-630.
- Lafortune, I., Juteau, P., Deziel, E., Lepine, F., Beaudet, R. et Villemur, R. (2009) Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid phase biosystem. Microbial Ecology, vol. 57, p. 455-468.
- Lam, P., Lavik, G., Jensen, M.M., van de Vossenberg, J., Schmid, M., Woebken, D., Gutierrez, D., Amann, R., Jetten, M.S. et Kuypers, M.M. (2009) Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 106, p. 4752-4757.
- Lange, R. et Hengge-Aronis, R. (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. Molecular microbiology, vol. 5, p. 49-59.
- Laurin, V. (2005) Caractérisation microbiologique et optimisation de la dénitrification en milieu marin au Biodôme de Montréal. Mémoire de Maîtrise en microbiologie appliquée Institut National de la Recherche Scientifique-Centre Institut Armand-Frappier, Laval, 127 p.
- Lee, N.M. et Welander, T. (1996) The effect of different carbon sources on respiratory denitrification in biological wastewater treatment. Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 82, p. 277-285.
- Leigh, M.B., Pellizari, V.H., Uhlik, O., Sutka, R., Rodrigues, J., Ostrom, N.E., Zhou, J.H. et Tiedje, J.M. (2007) Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs). ISME Journal, vol. 1, p. 134-148.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C. et Schleper, C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature, vol. 442, p. 806-809.
- Levy-Booth, D.J. et Winder, R.S. (2010) Quantification of nitrogen reductase and nitrite reductase genes in soil of thinned and clear-cut Douglas-fir stands by using real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology, vol. 76, p. 7116-7125.
- Lidstrom, M.E. (2006) Aerobic methylotrophic prokaryotes. In *The prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. et Stackebrandt, E. (eds). New York: Springer, pp. 618-634.
- Liu, Y.J., Liu, S.J., Drake, H.L. et Horn, M.A. (2011) *Alphaproteobacteria* dominate active 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid herbicide degraders in agricultural soil and drilosphere. Environmental Microbiology, vol. 13, p. 991-1009.

- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. et Schleifer, K.H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Research, vol. 32, p. 1363-1371.
- Lueders, T., Manefield, M. et Friedrich, M.W. (2004) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. Environmental Microbiology, vol. 6, p. 73-78.
- Lurling, M., Faassen, E.J. et Van Eenennaam, J.S. (2011) Effects of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) on the survival, mobility and reproduction of *Daphnia magna*. Journal of Plankton Research, vol. 33, p. 333-342.
- Manefield, M., Whiteley, A.S., Griffiths, R.I. et Bailey, M.J. (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 5367-5373.
- Matchova, I. et Kucera, I. (1991) Evidence for the role of soluble cytochrome *c* in the dissimilatory reduction of nitrite and nitrous oxide by cells of *Paracoccus denitrificans*. Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1058, p. 256-260.
- Mateju, V., Cizinska, S., Krejci, J. et Janoch, T. (1992) Biological water denitrification: A review. Enzyme and Microbial Technology, vol. 14, p. 170-183.
- Matz, C., McDougald, D., Moreno, A.M., Yung, P.Y., Yildiz, F.H. et Kjelleberg, S. (2005) Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, p. 16819-16824.
- Matzen, N. et Hirsch, P. (1982) Improved growth conditions for *Hyphomicrobium* sp. B-522 and two additional strains Archives of Microbiology vol. 131, p. 32-35.
- McDonald, I.R., Doronina, N.V., Trotsenko, Y.A., McAnulla, C. et Murrell, J.C. (2001) *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp. nov. and *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane-utilizing bacteria isolated from a polluted environment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 51, p. 119-122.

- McGuirl, M.A., Bollinger, J.A., Cosper, N., Scott, R.A. et Dooley, D.M. (2001) Expression, purification, and characterization of NosL, a novel Cu(I) protein of the nitrous oxide reductase (*nos*) gene cluster. Journal of Biological Inorganic Chemistry, vol. 6, p. 189-195.
- Mergaert, J., Boley, A., Cnockaert, M.C., Muller, W.R. et Swings, J. (2001) Identity and potential functions of heterotrophic bacterial isolates from a continuous-upflow fixed-bed reactor for denitrification of drinking water with bacterial polyester as source of carbon and electron donor. Systematic and Applied Microbiology, vol. 24, p. 303-310.
- Mesa, S., Gottfert, M. et Bedmar, E.J. (2001) The *nir*, *nor*, and *nos* denitrification genes are dispersed over the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. Archives of Microbiology, vol. 176, p. 136-142.
- Meyer, R.L., Saunders, A.M. et Blackall, L.L. (2006) Putative glycogen-accumulating organisms belonging to the *Alphaproteobacteria* identified through rRNA-based stable isotope probing. Microbiology, vol. 152, p. 419-429.
- Michotey, V., Mejean, V. et Bonin, P. (2000) Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd₁*-denitrifying bacteria in environmental marine samples. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, p. 1564-1571.
- Min, K.S., Park, K.S., Jung, Y.J., Khan, A.R. et Kim, Y.J. (2002) Acidogenic fermentation: Utilization of wasted sludge as a carbon source in the denitrification process. Environmental Technology, vol. 23, p. 293-302.
- Miyatake, T., MacGregor, B.J. et Boschker, H.T. (2009) Linking microbial community function to phylogeny of sulfate-reducing *Deltaproteobacteria* in marine sediments by combining stable isotope probing with magnetic-bead capture hybridization of 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, vol. 75, p. 4927-4935.
- Moran, M.A., Belas, R., Schell, M.A., Gonzalez, J.M., Sun, F., Sun, S., Binder, B.J., Edmonds, J., Ye, W., Orcutt, B., Howard, E.C., Meile, C., Palefsky, W., Goesmann, A., Ren, Q., Paulsen, I., Ulrich, L.E., Thompson, L.S., Saunders, E. et Buchan, A. (2007) Ecological genomics of marine Roseobacters. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, p. 4559-4569.
- Morris, S.A., Radajewski, S., Willison, T.W. et Murrell, J.C. (2002) Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 1446-1453.
- Muir, P.R., Sutton, D.C. et Owens, L. (1991) Nitrate toxicity to *Penaeus monodon* protozoa. Marine Biology, vol. 108, p. 67-71.

- Mulvaney, R.L. (1996) Nitrogen - inorganic forms. In: *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods*. Madison, WI, SSSA, p. 1123-1184.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. et Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, p. 695-700.
- Nacke, H., Thurmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., Schoning, I., Schrupf, M. et Daniel, R. (2011) Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS One*, vol. 6, Doi: 10.1371/journal.pone.0017000.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B. et Foster, K.R. (2009) The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, p. 206-224.
- Nakanishi, Y., Zhou, S., Kim, S.W., Fushinobu, S., Maruyama, J., Kitamoto, K., Wakagi, T. et Shoun, H. (2010) A eukaryotic copper-containing nitrite reductase derived from a NirK homolog gene of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 74, p. 984-991.
- Narasimharao, P. et Haggblom, M.M. (2006) *Sedimenticola selenatireducens*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic selenate-respiring bacterium isolated from estuarine sediment. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 29, p. 382-388.
- Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H. et Schleifer, K.H. (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter: Conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, p. 4329-4339.
- Neufeld, J.D., Driscoll, B.T., Knowles, R. et Archibald, F.S. (2001) Quantifying functional gene populations: comparing gene abundance and corresponding enzymatic activity using denitrification and nitrogen fixation in pulp and paper mill effluent treatment systems. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 47, p. 925-934.
- Neufeld, J.D., Dumont, M.G., Vohra, J. et Murrell, J.C. (2007a) Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology* vol. 53, p. 435-442.
- Neufeld, J.D., Schafer, H., Cox, M.J., Boden, R., McDonald, I.R. et Murrell, J.C. (2007b) Stable-isotope probing implicates *Methylophaga* spp and novel *Gammaproteobacteria* in marine methanol and methylamine metabolism. *ISME Journal*, vol. 1, p. 480-491.
- Neufeld, J.D., Boden, R., Moussard, H., Schafer, H. et Murrell, J.C. (2008a) Substrate-specific clades of active marine methylotrophs associated with a phytoplankton bloom in a temperate coastal environment. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, p. 7321-7328.

- Neufeld, J.D., Chen, Y., Dumont, M.G. et Murrell, J.C. (2008b) Marine methylotrophs revealed by stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomics. Environmental Microbiology, vol. 10, p. 1526-1535.
- Nogales, B., Timmis, K.N., Nedwell, D.B. et Osborn, A.M. (2002) Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 5017-5025.
- Nohno, T., Noji, S., Taniguchi, S. et Saito, T. (1989) The *narX* and *narL* genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes. Nucleic acids research, vol. 17, p. 2947-2957.
- Nübel, U., GarciaPichel, F. et Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 3327-3332.
- Oakley, B.B., Francis, C.A., Roberts, K.J., Fuchsman, C.A., Srinivasan, S. et Staley, J.T. (2007) Analysis of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxic zone. Environmental Microbiology, vol. 9, p. 118-130.
- Olmo-Mira, M.F., Gavira, M., Richardson, D.J., Castillo, F., Moreno-Vivian, C. et Roldan, M.D. (2004) NapF is a cytoplasmic iron-sulfur protein required for Fe-S cluster assembly in the periplasmic nitrate reductase. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 49727-49735.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R. et Stahl, D.A. (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annual Review of Microbiology, vol. 40, p. 337-365.
- Osaka, T., Yoshie, S., Tsuneda, S., Hirata, A., Iwami, N. et Inamori, Y. (2006) Identification of acetate- or methanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. Microbial Ecology, vol. 52, p. 253-266.
- Osaka, T., Ebie, Y., Tsuneda, S. et Inamori, Y. (2008a) Identification of the bacterial community involved in methane-dependent denitrification in activated sludge using DNA stable-isotope probing. FEMS Microbiology Ecology, vol. 64, p. 494-506.
- Osaka, T., Shirohani, K., Yoshie, S. et Tsuneda, S. (2008b) Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process. Water research, vol. 42, p. 3709-3718.
- Ottow, J.C.G. et Glathe, H. (1971) Isolation and identification of iron-reducing bacteria from gley soils. Soil Biology and Biochemistry, vol. 3, p. 43-55.

- Palmer, K., Drake, H.L. et Horn, M.A. (2009) Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers. Applied and Environmental Microbiology, vol. 75, p. 5170-5174.
- Parent, S. et Morin, A. (2000) N budget as water quality management tool in closed aquatic mesocosms. Water Research, vol. 34, p. 1846-1856.
- Parsonage, D. et Ferguson, S.J. (1983) Reassessment of pathways of electron flow to nitrate reductase that are coupled to energy conservation in *Paracoccus denitrificans*. FEBS letters, vol. 153, p. 108-112.
- Patureau, D., Godon, J.J., Dabert, P., Bouchez, T., Bernet, N., Delgenes, J.P. et Moletta, R. (1998) *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new Gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions. International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 48, p. 775-782.
- Payne, W.J. (1981) *Denitrification*. New York, Wiley-Interscience, 214 p.
- Payne, W.J. (2001) Anaerobic Respiration. Encyclopedia of Life Sciences, vol., Doi: 10.1038/npg.els.0001414.
- Peyraud, R., Kiefer, P., Christen, P., Massou, S., Portais, J.C. et Vorholt, J.A. (2009) Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway by using ¹³C metabolomics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 106, p. 4846-4851.
- Pfeiffer, T. et Bonhoeffer, S. (2004) Evolution of cross-feeding in microbial populations. The American Naturalist, vol. 163, p. E126-135.
- Philippot, L. (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Gene Structure and Expression, vol. 1577, p. 355-376.
- Philippot, L. (2005) Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. Biochemical Society Transactions, vol. 33, p. 200-204.
- Pietraszkiewicz, O. et Pietraszkiewicz, M. (1999) Separation of pyrimidine bases on a HPLC stationary RP-18 phase coated with calix[4]resorcinarene. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, vol. 35, p. 261-270.
- Pol, A., Heijmans, K., Harhangi, H.R., Tedesco, D., Jetten, M.S. et Op den Camp, H.J. (2007) Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobia species. Nature, vol. 450, p. 874-878.
- Pothier, J.F., Prigent-Combaret, C., Haurat, J., Moenne-Loccoz, Y. et Wisniewski-Dye, F. (2008) Duplication of plasmid-borne nitrite reductase gene *nirK* in the wheat-associated plant growth-

- promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. Molecular Plant-Microbe Interactions, vol. 21, p. 831-842.
- Pratscher, J., Dumont, M.G. et Conrad, R. (2011) Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 108, p. 4170-4175.
- Prosser, J.I. (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. Advances in Microbial Physiology, vol. 30, p. 125-181.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. et Glockner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Research, vol. 35, p. 7188-7196.
- Puckett, L.J., Tesoriero, A.J. et Dubrovsky, N.M. (2011) Nitrogen contamination of surficial aquifers- a growing legacy. Environmental Science and Technology, vol. 45, p. 839-844.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R. et Murrell, J.C. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature, vol. 403, p. 646-649.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I., Schouten, S., Damste, J.S., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S. et Strous, M. (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. Nature, vol. 440, p. 918-921.
- Rainey, F.A., Kelly, D.P., Stackebrandt, E., Burghardt, J., Hiraishi, A., Katayama, Y. et Wood, A.P. (1999) A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 49, p. 645-651.
- Rasmussen, T., Brittain, T., Berks, B.C., Watmough, N.J. et Thomson, A.J. (2005) Formation of a cytochrome c-nitrous oxide reductase complex is obligatory for N₂O reduction by *Paracoccus pantotrophus*. Dalton Transactions, vol., p. 3501-3506.
- Reese, B.K., Andersorr, M.A. et Amrhein, C. (2008) Hydrogen sulfide production and volatilization in a polymictic eutrophic saline lake, Salton Sea, California. Science of the Total Environment, vol. 406, p. 205-218.
- Reimann, J., Flock, U., Lepp, H., Honigmann, A. et Adelroth, P. (2007) A pathway for protons in nitric oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, vol. 1767, p. 362-373.

- Reyes, F., Gavira, M., Castillo, F. et Moreno-Vivian, C. (1998) Periplasmic nitrate-reducing system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158: transcriptional and mutational analysis of the *napKEFDABC* gene cluster. Biochemical Journal, vol. 331, p. 897-904.
- Rich, J.J., Dale, O.R., Song, B. et Ward, B.B. (2008) Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in Chesapeake Bay sediments. Microbial Ecology, vol. 55, p. 311-320.
- Richardson, D.J. et Ferguson, S.J. (1992) The influence of carbon substrate on the activity of the periplasmic nitrate reductase in aerobically grown *Thiosphaera pantotropha*. Archives of Microbiology, vol. 157, p. 535-537.
- Richardson, D.J. et Watmough, N.J. (1999) Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. Current Opinion in Chemical Biology, vol. 3, p. 207-219.
- Richardson, D.J. (2000) Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. Microbiology, vol. 146, p. 551-571.
- Richardson, D.J., Berks, B.C., Russell, D.A., Spiro, S. et Taylor, C.J. (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. Cellular and Molecular Life Sciences vol. 58, p. 165-178.
- Robertson, L. et Kuenen, J. (1984) Aerobic denitrification : a controversy revived. Archives of Microbiology vol. 139, p. 351-354.
- Robertson, L.A., Cornelisse, R., De Vos, P., Hadjioetomo, R. et Kuenen, J.G. (1989) Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 56, p. 289-299.
- Rodgers, M. et Zhan, X.-M. (2003) Moving-medium biofilm reactors. Reviews in Environmental Science and BioTechnology vol. 2, p. 213-224.
- Rodgers, M. et Zhan, X.M. (2004) Biological nitrogen removal using a vertically moving biofilm system. Bioresource Technology, vol. 93, p. 313-319.
- Ryther, J.H. et Dunstan, W.M. (1971) Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. Science, vol. 171, p. 1008-1013.
- Sage, M., Daufin, G. et Gesan-Guiziu, G. (2006) Denitrification potential and rates of complex carbon source from dairy effluents in activated sludge system. Water Research, vol. 40, p. 2747-2755.
- Satoh, H., Nakamura, Y., Ono, H. et Okabe, S. (2003) Effect of oxygen concentration on nitrification and denitrification in single activated sludge flocs. Biotechnology and Bioengineering, vol. 83, p. 604-607.
- Sauthier, N., Grasmick, A. et Blancheton, J.P. (1998) Biological denitrification applied to a marine closed aquaculture system. Water Research, vol. 32, p. 1932-1938.

- Scala, D.J. et Kerkhof, L.J. (1998) Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. FEMS Microbiology Letters, vol. 162, p. 61-68.
- Scala, D.J. et Kerkhof, L.J. (1999) Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 1681-1687.
- Schäfer, H. (2007) Isolation of *Methylophaga* spp. from marine dimethylsulfide-degrading enrichment cultures and identification of polypeptides induced during growth on dimethylsulfide. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, p. 2580-2591.
- Schäfer, J., Jackel, U. et Kampfer, P. (2010) Development of a new PCR primer system for selective amplification of *Actinobacteria*. FEMS Microbiology Letters, vol. 311, p. 103-112.
- Schalk, J., Oustad, H., Kuenen, J.G. et Jetten, M.S.M. (1998) The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. FEMS Microbiology Letters, vol. 158, p. 61-67.
- Schildkraut, C.L., Marmur, J. et Doty, P. (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. Journal of Molecular Biology, vol. 4, p. 430-443.
- Schindler, D.W. (1974) Eutrophication and recovery in experimental lakes: implications for lake management. Science, vol. 184, p. 897-899.
- Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W.I.C., van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Damste, J.S.S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M. et Strous, M. (2003) *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Systematic and Applied Microbiology, vol. 26, p. 529-538.
- Schmidt, I. et Bock, E. (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. Archives of Microbiology, vol. 167, p. 106-111.
- Schwartz, E., Henne, A., Cramm, R., Eitinger, T., Friedrich, B. et Gottschalk, G. (2003) Complete nucleotide sequence of pHG1: A *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H₂-based lithoautotrophy and anaerobiosis. Journal of Molecular Biology, vol. 332, p. 369-383.
- Schwermer, C.U., Lavik, G., Abed, R.M., Dunsmore, B., Ferdelman, T.G., Stoodley, P., Gieseke, A. et de Beer, D. (2008) Impact of nitrate on the structure and function of bacterial biofilm communities in pipelines used for injection of seawater into oil fields. Applied and Environmental Microbiology, vol. 74, p. 2841-2851.

- Schwintner, C., Sabaty, M., Berna, B., Cahors, S. et Richaud, P. (1998) Plasmid content and localization of the genes encoding the denitrification enzymes in two strains of *Rhodobacter sphaeroides*. FEMS Microbiology Letters, vol. 165, p. 313-321.
- Serghini, M.A., Ritzenthaler, C. et Pinck, L. (1989) A rapid and efficient 'miniprep' for isolation of plasmid DNA. Nucleic Acids Research, vol. 17, p. 3604.
- Shapleigh, J. (2006) The denitrifying prokaryotes. In *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. et Stackebrandt, E. (eds): Springer, pp. 769-792.
- Shomar, B., Osenbruck, K. et Yahya, A. (2008) Elevated nitrate levels in the groundwater of the Gaza Strip: Distribution and sources. Science of the Total Environment, vol. 398, p. 164-174.
- Shoun, H., Kim, D.H., Uchiyama, H. et Sugiyama, J. (1992) Denitrification by fungi. FEMS Microbiology Letters, vol. 94, p. 277-281.
- Shoun, H., Kano, M., Baba, I., Takaya, N. et Matsuo, M. (1998) Denitrification by actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. Journal of Bacteriology, vol. 180, p. 4413-4415.
- Silvestrini, M.C., Falcinelli, S., Ciabatti, I., Cutruzzola, F. et Brunori, M. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): An overview. Biochimie, vol. 76, p. 641-654.
- Simon, J. (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. FEMS Microbiology Reviews, vol. 26, p. 285-309.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F. et Osborn, A.M. (2007) Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, p. 3612-3622.
- Smith, G.B. et Tiedje, J.M. (1992) Isolation and characterization of a nitrite reductase gene and its use as a probe for denitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol. 58, p. 376-384.
- Smith, R.A., Alexander, R.B. et Wolman, M.G. (1987) Water-quality trends in the nation's rivers. Science, vol. 235, p. 1607-1615.
- Smith, R.L., Buckwalter, S.P., Repert, D.A. et Miller, D.N. (2005) Small-scale, hydrogen-oxidizing-denitrifying bioreactor for treatment of nitrate-contaminated drinking water. Water research, vol. 39, p. 2014-2023.

- Sodergren, E.J., Hsu, P.Y. et DeMoss, J.A. (1988) Roles of the *narJ* and *narI* gene products in the expression of nitrate reductase in *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 263, p. 16156-16162.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M. et Herndl, G.J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 103, p. 12115-12120.
- Sperl, G.T. et Hoare, D.S. (1971) Denitrification with methanol: a selective enrichment for *Hyphomicrobium* species. Journal of Bacteriology, vol. 108, p. 733-736.
- Stams, A.J. (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 66, p. 271-294.
- Stams, A.J.M. et Elferink, S.J.W.H.O. (1997) Understanding and advancing wastewater treatment. Current Opinion in Biotechnology, vol. 8, p. 328-334.
- Stevanin, T.M., Moir, J.W. et Read, R.C. (2005) Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. Infection and Immunity, vol. 73, p. 3322-3329.
- Stewart, V., Lu, Y. et Darwin, A.J. (2002) Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology, vol. 184, p. 1314-1323.
- Stewart, V. (2003) Biochemical society special lecture. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. Biochemical Society Transactions, vol. 31, p. 1-10.
- Strous, M., vanGerven, E., Kuenen, J.G. et Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 2446-2448.
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G. et Jetten, M.S.M. (1999a) Missing lithotroph identified as new planctomycete. Nature, vol. 400, p. 446-449.
- Strous, M., Kuenen, J.G. et Jetten, M.S. (1999b) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 3248-3250.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Truong, C., Medigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dutilh, B.E., Op den Camp, H.J.M., van der Drift, C., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K.T., Harhangi, H.R., van Niftrik, L.,

- Schmid, M., Keltjens, J., van de Vossenberg, J., Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M.A., Mewes, H.W., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M., Wagner, M. et Le Paslier, D. (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. Nature, vol. 440, p. 790-794.
- Suharti, Strampraad, M.J.F., Schroder, I. et de Vries, S. (2001) A novel copper A containing menaquinol NO reductase from *Bacillus azotoformans*. Biochemistry, vol. 40, p. 2632-2639.
- Suharti et de Vries, S. (2005) Membrane-bound denitrification in the Gram-positive bacterium *Bacillus azotoformans*. Biochemical Society Transactions, vol. 33, p. 130-133.
- Suzuki, I., Dular, U. et Kwok, S.C. (1974) Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. Journal of Bacteriology, vol. 120, p. 556-558.
- Tabata, A., Yamamoto, I., Matsuzaki, M. et Satoh, T. (2005) Differential regulation of periplasmic nitrate reductase gene (*napKEFDABC*) expression between aerobiosis and anaerobiosis with nitrate in a denitrifying phototroph *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. denitrificans. Archives of Microbiology, vol. 184, p. 108-116.
- Tal, Y., Nussinovitch, A. et van Rijn, J. (2003) Nitrate removal in aquariums by immobilized *Pseudomonas*. Biotechnology Progress, vol. 19, p. 1019-1021.
- Tavares, P., Pereira, A.S., Moura, J.J. et Moura, I. (2006) Metalloenzymes of the denitrification pathway. Journal of Inorganic Biochemistry, vol. 100, p. 2087-2100.
- Thamdrup, B., Dalsgaard, T., Jensen, M.M., Ulloa, O., Farias, L. et Escibano, R. (2006) Anaerobic ammonium oxidation in the oxygen-deficient waters off northern Chile. Limnology and Oceanography, vol. 51, p. 2145-2156.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. et Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, vol. 22, p. 4673-4680.
- Tiedje, J.M., Sexstone, A.J., Myrold, D.D. et Robinson, J.A. (1982) Denitrification: ecological niches, competition and survival. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 48, p. 569-583.
- Turner, P.E., Souza, V. et Lenski, R.E. (1996) Tests of ecological mechanisms promoting the stable coexistence of two bacterial genotypes. Ecology vol. 77, p. 2119-2129.
- Urakami, T. et Komagata, K. (1987) Characterization of species of marine methylotrophs of the genus *Methylophaga*. International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 37, p. 402-406

- Urakami, T., Sasaki, J., Suzuki, K.I. et Komagata, K. (1995) Characterization and description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 45, p. 528-532.
- van de Graaf, A.A., Mulder, A., de bruijn, P., Jetten, M.S.M., Robertson, L.A. et Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, p. 1246-1251.
- van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. et Kuenen, J.G. (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. Microbiology, vol. 142, p. 2187-2196.
- van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. et Kuenen, J.G. (1997) Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ^{15}N studies in a fluidized bed reactor. Microbiology, vol. 143, p. 2415-2421.
- van Spanning, R.J.M., Deboer, A.P.N., Reijnders, W.N.M., Spiro, S., Westerhoff, H.V., Stouthamer, A.H. et Vanderroost, J. (1995) Nitrite and nitric oxide reduction in *Paracoccus denitrificans* is under the control of NNR, a regulatory protein that belongs to the FNR family of transcriptional activators. FEBS Letters, vol. 360, p. 151-154.
- van Spanning, R.J.M., Houben, E., Reijnders, W.N.M., Spiro, S., Westerhoff, H.V. et Saunders, N. (1999) Nitric oxide is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. Journal of Bacteriology, vol. 181, p. 4129-4132.
- Verbaendert, I., De Vos, P., Boon, N. et Heylen, K. (2011) Denitrification in Gram-positive bacteria: an underexplored trait. Biochemical Society Transactions, vol. 39, p. 254-258.
- Vijgenboom, E., Busch, J.E. et Canters, G.W. (1997) *In vivo* studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that *azu* expression is under control of RpoS and ANR. Microbiology, vol. 143, p. 2853-2863.
- Villemur, R., Constant, P., Gauthier, A., Shareck, M. et Beaudet, R. (2007) Heterogeneity between 16S ribosomal RNA gene copies borne by one *Desulfitobacterium* strain is caused by different 100-200 bp insertions in the 5' region. Canadian Journal of Microbiology, vol. 53, p. 116-128.
- Visvanathan, C., Phong, D.D. et Jegatheesan, V. (2008) Hydrogenotrophic denitrification of highly saline aquaculture wastewater using hollow fiber membrane bioreactor. Environmental Technology, vol. 29, p. 701-707.

- Volkl, P., Huber, R., Drobner, E., Rachel, R., Burggraf, S., Trincone, A. et Stetter, K.O. (1993) *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59, p. 2918-2926.
- Vollack, K.U., Xie, J., Hartig, E., Romling, U. et Zumft, W.G. (1998) Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, vol. 144, p. 441-448.
- Vollack, K.U., Hartig, E., Korner, H. et Zumft, W.G. (1999) Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four *fnr*-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. Molecular Microbiology, vol. 33, p. 442-442.
- Wan, C.Y., De Weyer, H., Diels, L., Thoeye, C., Liang, J.B. et Huang, L.N. (2011) Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. Water Research, vol. 45, p. 1129-1138.
- Ward, B.B., Devol, A.H., Rich, J.J., Chang, B.X., Bulow, S.E., Naik, H., Pratihary, A. et Jayakumar, A. (2009) Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea. Nature, vol. 461, p. 78-81.
- Weiss, J.S., Alvarez, M., Tang, C.-C., Horvath, R.W. et Stahl, J.F. (2005) Evaluation of moving bed biofilm reactor technology for enhancing nitrogen removal in a stabilization pond treatment plant. Water Environment Federation's Annual Technical Exhibition and Conference, Water Environment Federation.
- Wertz, S., Dandie, C.E., Goyer, C., Trevors, J.T. et Patten, C.L. (2009) Diversity of *nirK* denitrifying genes and transcripts in an agricultural soil. Applied and Environmental Microbiology, vol. 75, p. 7365-7377.
- Westermann, P. et Ahring, B.K. (1987) Dynamics of methane production, sulfate reduction, and denitrification in a permanently waterlogged alder swamp. Applied and Environmental Microbiology, vol. 53, p. 2554-2559.
- Wood, N.J., Alizadeh, T., Bennett, S., Pearce, J., Ferguson, S.J., Richardson, D.J. et Moir, J.W. (2001) Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-like regulator named NarR. Journal of Bacteriology, vol. 183, p. 3606-3613.
- Wood, N.J., Alizadeh, T., Richardson, D.J., Ferguson, S.J. et Moir, J.W. (2002) Two domains of a dual-function NarK protein are required for nitrate uptake, the first step of denitrification in *Paracoccus pantotrophus*. Molecular Microbiology, vol. 44, p. 157-170.

- Xie, L.Q., Xie, P., Guo, L.G., Li, L., Miyabara, Y. et Park, H.D. (2005) Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. Environmental Toxicology, vol. 20, p. 293-300.
- Ye, R.W., Haas, D., Ka, J.O., Krishnapillai, V., Zimmermann, A., Baird, C. et Tiedje, J.M. (1995) Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. Journal of Bacteriology, vol. 177, p. 3606-3609.
- Yoon, J.H., Oh, T.K. et Park, Y.H. (2004) *Kangiella koreensis* gen. nov., sp. nov. and *Kangiella aquimarina* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 54, p. 1829-1835.
- Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A. et Inamori, Y. (2001) Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 92, p. 346-353.
- Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A. et Inamori, Y. (2002) Characterization of microbial community in nitrogen removal process of metallurgic wastewater by PCR-DGGE. Water Science and Technology, vol. 46, p. 93-98.
- Yoshie, S., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A. et Inamori, Y. (2004a) Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and microbial community analysis in the denitrification process of a saline industrial wastewater treatment system. FEMS Microbiology Letters, vol. 235, p. 183-189.
- Yoshie, S., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A. et Inamori, Y. (2004b) Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems. Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, p. 3152-3157.
- Yoshie, S., Makino, H., Hirose, H., Shirogane, K., Tsuneda, S. et Hirata, A. (2006) Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 72, p. 182-189.
- Zobell, C.E. (1946) *Marine microbiology*. Waltham, MA, Chronica Botanica Company, 240 p.
- Zumft, W.G., Viebrocks, A. et Braun, C. (1990) Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins. European Journal of Biochemistry, vol. 192, p. 591-599.
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 61, p. 533-616.

Zumft, W.G. (2005) Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. Journal of Inorganic Biochemistry, vol. 99, p. 194-215.

Zumft, W.G. et Kroneck, P.M. (2007) Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by *Bacteria* and *Archaea*. Advances in Microbial Physiology, vol. 52, p. 107-227.

ANNEXE

Article accepté pour publication dans *Microbial Ecology*

Functional diversity in the denitrifying biofilm of the methanol-fed marine denitrification system at the Montreal Biodome

Julie Auclair¹, Serge Parent² and Richard Villemur^{1*}

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

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

***Corresponding author:**

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

richard.villemur@iaf.inrs.ca

Tel: 450-687-5010 #4611

Fax: 450-686-5501

Running title:

Functional diversity of a marine denitrifying biofilm

ABSTRACT

Nitrate is a serious problem in closed-circuit public aquariums because its accumulation rapidly becomes toxic to many lifeforms. A moving bed biofilm denitrification reactor was installed at the Montreal Biodome to treat its 3,250 m³ seawater system. Naturally occurring microorganisms from the seawater affluent colonized the reactor carriers to form a denitrifying biofilm. Here, we investigated the functional diversity of this biofilm by retrieving gene sequences related to *narG*, *napA*, *nirK*, *nirS*, *cnorB* and *nosZ*. A total of twenty-five sequences related to these genes were retrieved from the biofilm. Among them, the corresponding *napA1*, *nirK1*, *cnorB9* and *nosZ3* sequences were identical to the corresponding genes found in *Hyphomicrobium* sp. NL23 while the *narG1* and *narG2* sequences were identical to the two corresponding *narG* genes found in *Methylophaga* sp. JAM1. These two bacterial strains were previously isolated from the denitrifying biofilm. To assess the abundance of denitrifiers and nitrate respirers in the biofilm, the gene copy number of all the *narG*, *napA*, *nirS* and *nirK* sequences found in biofilm was determined by quantitative PCR. *napA1*, *nirK1*, *narG1* and *narG2*, which were all associated with either *Methylophaga* sp. JAM1 or *Hyphomicrobium* sp. NL23, were the most abundant genes. The other genes were 10 to 10,000 times less abundant. *nirK*, *cnorB* and *nosZ* but not *napA* transcripts from *Hyphomicrobium* sp. NL23 were detected in the biofilm, and only the *narG1* transcripts from *Methylophaga* sp. JAM1 were detected in the biofilm. Among the nineteen other genes, the transcripts of only two genes were detected in the biofilm. Our results show the predominance of *Methylophaga* sp. JAM1 and *Hyphomicrobium* sp. NL23 among the denitrifiers detected in the biofilm. The results suggest that *Hyphomicrobium* sp. NL23 could use the nitrite present in the biofilm generated by nitrate-respirers such as *Methylophaga* sp. JAM1.

INTRODUCTION

Nitrate is an anion that has proven to be toxic at high concentrations. In marine environments, the nitrate concentration should not exceed 20 mg NO₃⁻-N/L to protect fish and invertebrates from its adverse effects [7]. In closed marine facilities such as public aquariums and aquaculture farms, the nitrate concentration often exceeds this limit [18, 36]. Maintaining a nitrate concentration below 20 mg NO₃⁻-N/L currently involves frequent and expensive replacement of the seawater. Biological denitrification is a valuable alternative for removing nitrate from seawater [2, 18, 38, 44, 46]. Heterotrophic denitrification is a stepwise respiratory process in which microorganisms reduce nitrate (NO₃⁻) or nitrite (NO₂⁻) to nitric oxide (NO), nitrous oxide (N₂O) and dinitrogen (N₂) gases. The four reactions of the denitrification pathway are performed by nitrate reductase, nitrite reductase, nitric oxide reductase and nitrous oxide reductase [51].

Few studies on the microbial diversity of denitrification systems treated wastewater highly charged in salt have been reported [9, 26, 48-50]. However, these studies were mainly based on the analysis of the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene. Heterotrophic denitrification is performed by a multitude of microorganisms belonging to diverse phylogenetic groups [42]. As a result, it is not ideal to use 16S rRNA gene sequences to identify denitrifying bacteria in the environment. During the last decade, detection of the functional genes encoding the different denitrification reductases, such as *narG*, *napA*, *nirK*, *nirS*, *cnorB*, *qnorB* and *nosZ*, were shown to be a more effective way to study the diversity of denitrifying populations [4-5, 14, 17, 20, 39].

In 1998, the Montreal Biodome established a methanol-fed denitrification reactor to control the concentration of nitrate in its 3 million liter seawater system following an increase of the nitrate concentration to a critical level of 200 mg NO₃⁻-N/L [36]. This completely mixed reactor contains a fluidized bed of plastic carriers that were colonized by naturally occurring microorganisms from the seawater affluent to form a denitrifying biofilm. In previous studies, we used culture-dependent and culture-independent methods to determine the composition of the microbial biota of this 47 biofilm. Using the 16S rRNA gene library, the number of the most abundant bacterial species present in the biofilm was estimated to be between 15 and 20 [26], among which sequences related to *Hyphomicrobium* spp. and *Methylophaga* spp. were identified. Fluorescent *in situ* hybridization experiments confirmed that *Methylophaga* spp. and *Hyphomicrobium* spp. made up more than 50% of the biofilm microbiota [27]. Finally, the denitrifiers *Hyphomicrobium* sp. NL23 and the nitrate-reducing bacteria *Methylophaga* sp. JAM1 were isolated from the biofilm [1, 26].

Despite the abundance of *Methylophaga* spp. and *Hyphomicrobium* spp., we believed that other denitrifying bacteria and nitrate-reducing bacteria were present in the denitrifying biofilm and that these bacteria may play an important role in the denitrification process. In this paper, we further characterized the bacterial composition of the denitrifying biofilm by detecting functional genes encoding the different denitrification reductases and by determining whether they were expressed. Finally, the concentrations of the different *narG*, *napA*, *nirS* and *nirK* sequences were determined by quantitative PCR (qPCR) to assess the level of denitrifiers and nitrate-reducing bacteria in the biofilm.

MATERIALS AND METHODS

Denitrification system

The seawater system of the Montreal Biodome contains 3,250 m³ of cold (10°C) artificial seawater (28-30 ‰). It comprises two life support systems and four pools, as described by Parent and Morin [36]. The denitrification system is operated in parallel to the main life support system. It consisted of a 1 m³ fixed-bed deaeration tank, a 1 m³ moving bed biofilm reactor (MBBR) for denitrification and an overflow tank. The deaeration tank and the denitrification reactor were both

methanol-fed. The denitrification reactor were filled with 0.3 m³ of Bioflow[®] 9 mm carriers (1.020 density; Rauschert, Steinwiessen, Germany) for biofilm colonization. In the MBBR, carriers were continuously kept in motion by hydraulic flow, assuring that the carriers in the reactor were completely mixed. The water temperature in the reactor was 16-18°C, the pH was 7.8-7.9, and the salinity was 28-29‰. Twice a day, 370 mg of FeSO₄*7H₂O, 130 mg of MnSO₄*4H₂O, and 20 mg of CuSO₄*5H₂O were added to the system to enhance the denitrification rate [28]. At the sampling time, phosphate and nitrate concentrations in the seawater system averaged 18 PO₄-P mg/L (0.6 mM) and 50 NO₃⁻-N mg/L (3.6 mM), respectively. The system's denitrification rates varied between 200 and 300 g d⁻¹ 76 NO_x-N. The dissolved oxygen concentration in the denitrification reactor was recorded below 0.5 mg/L during normal operation. All the carriers used in this study were taken at the same time and were frozen at -80°C without loss of activity [30].

DNA extraction

DNA extraction from the biofilm was performed with three subsamples of the reactor using the biofilm carriers. For each subsample, the biofilm was scraped from five randomly selected carriers (to obtain a sufficient amount of DNA), pooled and rinsed with TEN (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, and 150 mM NaCl). DNA was extracted by bead beating method, and the culture of *Hyphomicrobium* sp. NL23 and its DNA extraction were carried out as previously described [26].

Gene libraries

Deduced amino acid sequences of *narG*, *napA*, *nirK* and *cnorB* denitrification genes taken from type-strain bacteria were collected from a protein database (National Center for Biotechnology Information (NCBI) January 2006, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and were aligned with ClustalW [45]. Highly degenerate primers were designed based on amino acid consensus sequences (Table 1) and were used for PCR amplifications to capture a high diversity of denitrification gene sequences. Optimization of PCR conditions (the annealing temperature, the concentration of primers and the number of cycles) were performed with DNA extracted from *Pseudomonas aeruginosa* (kindly provided by Eric Déziel, INRS-Institut Armand-Frappier) for *narG*, *napA*, and *cnorB*, and *Hyphomicrobium* sp. NL23 for *nirK*. Further optimization was performed with the biofilm DNA. Previously published primers were used for the detection of *nirS*, *qnorB* and *nosZ* (Table 1) [5, 20, 39].

A total of 100 ng of DNA from each biofilm subsample or 25 ng of strain NL23 DNA was used as a template for the PCR detection of *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *qnorB* and *nosZ* using degenerate primers (Table 1). For *narG*, *napA*, *nirK* and *cnorB*, PCR amplifications were performed in 50 µl reaction volume with 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 µg of bovine serum albumin (BSA), 200 µM dNTP, and 2.5 U of rTaq DNA polymerase (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Amplifications were conducted as follows: 94°C for 5 min, annealing temperature for 5 min (Table 1), 30 cycles at 72°C for 1 min, 94°C for 1 min, annealing temperature for 1 min, and finally an extension period of 10 min at 72°C. Amplifications of *nirS*, *qnorB* and *nosZ* were performed as described previously [5, 20, 39]. For each gene, the three PCR products from the biofilm subsamples were pooled. PCR products of the expected size were purified by agarose gel extraction with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada) before ligation.

PCR products were ligated in a T-vector (pGEM[®]-T Easy Vector System, Promega, Madison, WI). DH5α[™] Chemically Competent *Escherichia coli* (high efficiency 10⁹ cfu/µg; Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON) were transformed with DNA in accordance with manufacturer's instructions. Plasmids were isolated by the method described by Shergini et al. [41]. *In silico* digestions of published sequences were performed to determine which restriction enzymes were optimal to screen the clones using the online program RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>). Plasmids were

screened for different inserts by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the restriction endonucleases AfaI for *narG*, *napA*, *nirK* and *cnorB*, HhaI for *nirS*, and Sau3AI for *nosZ*. Inserts of representative clones based on restriction profiles were PCR amplified and sequenced in both directions using the primers SP6 and T7. For RFLP profiles represented by numerous clones, at least 2 clones were sequenced.

The deduced amino acid sequences of *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB* and *nosZ* were compared against the protein databases with BLASTP (NCBI). The most related sequences of either type-strain organisms or uncultured organisms found in marine environments were selected. The deduced amino acid sequences were aligned with ClustalW [45]. The alignments were manually refined in BIOEDIT [19]. Phylogenetic analysis was performed using PROTDIST (Jones-Taylor-Thornton distance method), FITCH (Fitch Margoliash method) and SEQBOOT/CONSENSE (bootstrap analysis with 1000 replicates) programs in PHYLIP 3.65 software package [12].

Quantification of *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK* and *nosZ* in the biofilm

Primers specific to each of the *narG*, *napA*, *nirS*, and *nirK* sequences retrieved from the biofilm and to the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nosZ* sequence were designed for the qPCR assays (Table S1). Primer specificity was verified by PCR with plasmids carrying the respective gene sequences. No cross-reactivity was observed.

qPCR was performed with SYBR green in 20 μ l reaction volume with 10 μ l of PerfeCTa™ qPCR FastMix™ (Quanta bioscience, Gaithersburg, MD), 2 μ l of DNA (biofilm or standard) and the specific primers (Table S1). The amplifications were performed at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, at the annealing temperature (Table S1) for 30 s and at 72°C for 30 s. After PCR, specificity of the PCR products and the presence of primer dimers were verified by performing a melt curve by increasing the temperature from 65°C to 95°C by increments of 1°C per step with a pause of 5 s for each step. Specific amplifications with biofilm DNA were observed for each the primers pairs, and no primers dimers were detected. Quantification was performed on each biofilm DNA subsample. Reactions were performed in a Rotor-Gene 6000 real-time rotary analyser (Corbett life science, Sydney, Australia).

The PCR efficiency (E) for each primer pair was calculated from slope of their respective standard curve according to the following formula: $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$. PCR-amplified fragments from plasmid DNA were used as standards. Plasmids carrying *narG*, *napA*, *nirS*, or *nirK* sequences retrieved from gene libraries or the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nosZ* sequence were PCR amplified with the SP6 and T7 primers as described above. PCR products were run on 1% agarose gel, and bands of expected size were extracted and purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc.). DNA was quantified with Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen, Molecular Probe, Eugene, OR, USA) to determine the DNA copy number. Standard curves were obtained from a 10-fold dilution series of standard DNA (10^8 - 10^1 copies of the targeted gene).

The impact of the presence of co-extracted contaminants in biofilm DNA on qPCR efficiency was assessed. To avoid interference from the indigenous denitrification gene sequences, a DNA fragment not related to the denitrification genes sequences was spiked with biofilm DNA. qPCR assays were performed with a 10-fold dilution series of this DNA with 10 ng of biofilm DNA in each dilution. qPCR efficiencies ranged from 0.94 to 0.95 when 10 ng of biofilm DNA was present, with a linear range from 10^8 to 10^1 copies, and was 0.98 with no biofilm DNA added.

Reverse transcriptase (RT)-PCR assay

Hyphomicrobium sp. NL23 was cultured in *Hyphomicrobium* 337a medium (per liter: 1.3 g of KH_2PO_4 , 1.13 g of Na_2HPO_4 , 0.50 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.09 mg of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.0 mg of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mg of $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.88 mg of $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) supplemented with

NaNO₃ (400 mg of NO₃⁻/L) and 0.2% methanol under denitrifying conditions as previously described [1] for 64 h. The cultures were then centrifuged at 5,000 x g for 5 min and resuspended in TEN. One volume of acid phenol (pH 4.3) was added, and RNA was extracted as described below.

Biofilm was carefully scraped from carriers in an acid phenol (pH 4.3) bath. The phenol/biofilm mix was transferred to a screw-cap microcentrifuge tube containing 250 mg of autoclaved 0.1 mm glass beads (BioSpec Products, Inc.), and 1 volume of TEN was added. The biomass was disrupted with a Fast-Prep[®]-24 homogenizer (MP Biomedicals, Solon, OH) twice for 20 s at 4.0 m/s. The lysate was centrifuged at 14,000 x g for 15 min, and supernatant was extracted three times with acid phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and once with a chloroform/isoamyl alcohol (24:1). RNA was precipitated with ¼ volume of 10 M ammonium acetate and two volumes of 95% ethanol and then dissolved in diethyl pyrocarbonate-treated water. Total RNA (30 µg) was treated twice with 6 U of Turbo DNase (Ambion Inc., Austin, TX) in 1X Turbo DNase buffer at 37°C for 3 h in a 300 µl volume. Turbo DNase was inactivated, after each treatment, by acid phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction (25:24:1) followed by a chloroform/isoamyl alcohol (24:1) extraction and RNA precipitation. The presence of DNA in the RNA samples was evaluated by performing RT-PCR without reverse transcriptase. No DNA contamination was observed.

Primers specific to each of the *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB* and *nosZ* sequences retrieved from the biofilm were designed for RT-PCR assays (Table S2). Primer specificity was verified by PCR with plasmids carrying the respective gene sequences. No cross-reactivity was observed. All the primers showed PCR amplification of the expected size with biofilm DNA.

Reverse transcription (RT) of treated RNA (1 µg) was performed in a 50 µl reaction volume containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 200 U reverse transcriptase (SiperScript[™] II RT, Invitrogen, Carlsbad, CA) and 100 pmol of the reverse primer (Table S2). RT was performed at 65°C for 5 min and then at room temperature for 10 min, at 42°C for 60 min, and finally at 94°C for 5 min. Five microliters of the RT reaction was used for the PCR amplification. PCR was performed in 50 µl reaction volume as described before with the rTaq DNA polymerase. Primers are described in Table S2. The amplifications were performed at 94°C for 5 min, at the annealing temperature for 5 min (Table S2), followed by 30 cycles at 72°C for 45 s, at 94°C for 45 s, at the annealing temperature for 45 s, and finally at 72°C for an extension period of 10 min. RT-PCR products were verified by sequencing.

RESULTS

Diversity of denitrification genes in the denitrifying biofilm

Degenerate primers targeting consensual sequences of *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *qnorB* and *nosZ* (Table 1) were used to PCR-amplify these sequences from the denitrifying biofilm and generate gene libraries. Although PCR products with the expected length were obtained for each gene, most of the PCR amplifications also contained nonspecific amplifications, which occurs often with the use of degenerate primers [4-5, 20]. Cloning efficiency was variable from one gene to another, and a high proportion of clones with unspecific sequences was obtained for some genes (e.g., *nirS* and *cnorB*; Table S3). These problems could be related to the degenerate primers and unspecific amplifications. For instance, despite several cloning attempts, only thirty-six clones were obtained for *napA* or *nirK*, respectively. Among these clones, only one *napA*-related sequence (*napA1*, 14 clones; Table S3) and one *nirK*-related sequence (*nirK1*, 10 clones; Table S3) were obtained, which suggests very low diversity in the biofilm for these genes. Overall, twenty-five different sequences with more than 75% similarity to the different denitrification reductases were retrieved (Table S3). Seven different sequences related to *narG*, one related to *napA*, six related to *nirS*, one related to *nirK*, three related to *cnorB*, and seven related to *nosZ* were found (Fig. 1).

The *narG1* and *narG2* sequences were identical to the corresponding *narG* sequences found in *Methylophaga* sp. JAM1 (also named *narG1* and *narG2*; [1]). Deduced amino acid sequences of the five other *narG* sequences (Fig. 1A) were related to NarG sequences found in bacterial species affiliated with different sub-divisions of Proteobacteria. The *napA1* sequence was related to NapA sequences found in bacterial species affiliated with Alpha-Proteobacteria (Fig. 1B).

The deduced amino acid sequences of *nirS2* and *nirS34* were related to NirS sequences found in the Gamma-Proteobacterium *Kangiella koreensis* species. This bacterial species is a moderate halophilic bacterium known to perform denitrification [47]. NirS13 and NirS36 were related to NirS found in the denitrifying bacterium *Roseobacter denitrificans* and with NirS sequences retrieved from sediments in a mariculture environment (GenBank annotation). Finally, NirS5 and NirS32 were related to NirS sequences found in a marine environment (GenBank annotation). NirK1 was related to NirK sequences found in bacterial species affiliated with Alpha-Proteobacteria, including *Hyphomicrobium zavarinii*.

The three cNorB sequences identified in the biofilm were related to cNorB sequences found in bacterial species affiliated with Alpha-Proteobacteria. cNorB21 was nearly identical (99%) to the corresponding sequence in *Pseudovibrio* sp. JE062, a bacterium retrieved from a marine sponge [11]. No PCR amplification products were obtained from the biofilm DNA with primers used to amplify *qnorB*. NosZ3 was related to the *Hyphomicrobium denitrificans* NosZ. The six other sequences (NosZ1, NosZ5, NosZ8, NosZ21, NosZ25 and NosZ39) were related to the CLEM group of NosZ sequences retrieved from Pacific Ocean sediment (GenBank annotations and [40]).

As deduced amino acid sequences of *nirK1* and *nosZ3* were closely related to the corresponding sequences found in *Hyphomicrobium* species, we performed PCR assays with the degenerate primers on *Hyphomicrobium* sp. NL23. Sequences similar to *napA*, *nirK*, *cnorB* and *nosZ* were retrieved. The *napA*, *cnorB* and *nosZ* sequences were identical to the ones found in the biofilm (*napA1*, *cnorB9* and *nosZ3*). There was only one nucleotide difference between *nirK* from strain NL23 and the *nirK1* retrieved from the biofilm. This difference could be an artifact introduced by PCR.

Quantification of the nitrate- and nitrite-reductase genes in the biofilm

To assess the level of the denitrifying bacteria in the biofilm, the gene copy number of all the *narG*, *napA*, *nirS* and *nirK* retrieved from the biofilm was determined by qPCR. We established that the *Methylophaga* sp. JAM1 *narG1* and *narG2* were dominant among all the *narG* genes found in the biofilm, with 1.0×10^4 and 1.6×10^4 copies/ng biofilm DNA, respectively (Table 2). The other *narG* genes were approximately 4 to 500 times less abundant. The level of the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *napA* was similarly abundant of *narG1* and *narG2*, with 4.5×10^4 copies/ng biofilm DNA. The abundance of the different *nirS* ranged from 8.9×10^0 to 4.4×10^2 copies/ng biofilm DNA, which were 100 to 10,000 less abundant than the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nirK*, with 8.4×10^4 copies/ng biofilm DNA. The *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nosZ* was assayed to confirm the results obtained with *napA* and *nirK*, with 5.4×10^4 copies/ng biofilm DNA.

Transcription of denitrification genes in the bacterial strains and in the denitrifying biofilm

The four denitrification genes carried by *Hyphomicrobium* sp. NL23 were transcribed in pure cultures (Table 3). However, in the biofilm, *napA* transcripts were not detected, but the other three were detected. The two *Methylophaga* sp. JAM1 *narG* were transcribed in pure cultures [1], but only *narG1* transcripts were detected in the biofilm (Table 3). Among the nineteen denitrification-related gene sequences associated with the uncultured bacteria in the biofilm, only the *narG7* and *cnorB21* transcripts were found in the biofilm (Table 3).

DISCUSSION

Twenty-five putative denitrification gene sequences originating from the methanol-fed denitrifying biofilm were retrieved. This number of gene sequences may seem relatively low for an environmental microbiota, but it is probable that other denitrifying genes were present but not detected. At the time that the degenerate PCR primers were designed, the sequences available in the gene databases were not necessarily consensus sequences representative of all respective denitrifying genes, such as those found in Archaea. In addition, the degeneration of the primers could have affected the sensitivity of detecting such genes. On the other hand, the low number of denitrification gene sequences could reflect the level of diversity of the biofilm, which was estimated to have between 15 and 20 bacterial species. The biofilm has developed under controlled conditions (effluent from a closed-circuit aquarium made with artificial seawater, 18°C, methanol as carbon source, and denitrifying conditions), which may have limited the number of denitrifying bacterial species that could have been established. All these gene sequences are more closely related with corresponding genes found in bacteria affiliated with Proteobacteria. Moreover, most, if not all, of these sequences were related to corresponding reductases retrieved from marine environments.

Among the twenty-five gene sequences, six are identical to the corresponding genes in *Hyphomicrobium* sp. NL23 and *Methylophaga* sp. JAM1. Our study shows that *Hyphomicrobium* sp. NL23 does possess a complete set of denitrifying genes (*napA*, *nirK*, *cnorB* and *nosZ*). Very few studies have reported a complete survey of denitrifying genes in *Hyphomicrobium* spp. Kloos et al. [25] and Fesefeldt et al. [13] reported the presence of *narG*, *nirK* and *nosZ*, but not that of *nirS*, in several *Hyphomicrobium* species and strains. However, *narG* was not detected in several strains, and, as *napA* had not been discovered at the time these studies were conducted, it is possible the species contained *napA*. Recently, two complete genomes from *H. denitrificans* and *Hyphomicrobium* sp. MC1 were available in gene databases. Gene sequences related to the nitrate reductase/molybdopterin oxidoreductase *narG* and *nasA* (involved in nitrate assimilation) are present in each genome, but not *napA*. Therefore, our study shows for the first time that *napA* is associated with a *Hyphomicrobium* strain.

Seven sequences related to *narG* were retrieved from the biofilm. Some of the *narG* could come from the same microorganisms since multiple copies of distantly related *narG* have been reported for some bacterial species [35]. Indeed, the two *narG* sequences retrieved from the biofilm are identical to the two *narG* found in *Methylophaga* sp. JAM1. Furthermore, some evidence supports the coexistence of both *narG* and *napA* in the same microorganism [37]. DNA from *Hyphomicrobium* sp. NL23, which contains the only *napA* found in the biofilm, did not amplify *narG* sequences with the *narG* primers used in this study.

Sequences related to nitrite reductases, key enzymes of the denitrification pathway, were detected in the biofilm DNA, of which six sequences were related to *nirS* and one to *nirK*. By compiling data of diversity studies in which genes encoding the nitrite reductases were used as functional markers of denitrification, Jones and Hallin [23] found that most *nirK* sequences were derived from soil but that most *nirS* sequences were prominently derived from marine and estuarine environments. Moreover, Hallin et al. [21] observed that the addition of methanol to a pilot-scale plant treating wastewater resulted in an increase of the *nirS*-type denitrifiers diversity. Yoshie et al. [50] observed that the diversity of *nirS* was higher than the diversity of *nirK* in two acetate-fed anaerobic reactors used to remove nitrate from metallurgic saline wastewater. Our results are consistent with these observations, as more *nirS* than *nirK* was found in the marine methanol-fed denitrifying biofilm. *nirS13* and *nirS36* were related to *nirS* belonging to the *Roseobacter* clade, which is prominent in coastal waters and in surface waters of the open ocean [32] and was associated with an industrial saline wastewater denitrification system [9]. With our degenerate primers, only the *Hyphomicrobium* sp.

NL23 *nirK* was found in the biofilm. *Hyphomicrobium* spp. has been associated with marine methanol fed denitrification systems [16, 33, 43].

Most quantification studies performed to date have used universal primers to quantify the entire denitrifying population and then compare the sampling sites [6, 22, 24, 31, 34]. Here, we performed a quantification of specific genes in an attempt to establish the contribution of each gene to the overall functional population of the biofilm. Assays have targeted *narG* and *napA*, which can represent either nitrate-reducing or denitrifying bacteria, *nirS* and *nirK*, which were used as markers of denitrifying populations. The most abundant genes in the biofilm were associated with the genes found in *Methylophaga* sp. JAM1 (*narG1* and *narG2*) and in *Hyphomicrobium* sp. NL23 (*napA*, *nirK* and *nosZ*). The other genes from the uncultured bacteria were 10 to 10,000 less abundant than both strains. These results confirmed our previous studies [1, 26, 27] that *Methylophaga* spp. and *Hyphomicrobium* spp. are predominant in the biofilm. The low abundance of the other genes suggests minor involvement of those in the denitrification process in the biofilm at the time of the sampling.

napA, *nirK*, *cnorB* and *nosZ* of *Hyphomicrobium* sp. NL23 were transcribed in pure cultures under denitrifying conditions, which suggests its capacity to reduce nitrate into N₂. However, only the *Hyphomicrobium* sp. NL23 *nirK*, *cnorB* and *nosZ* transcripts were detected in the biofilm. Contrary to pure cultures, the *napA* transcripts were not observed in the biofilm, suggesting that strain NL23 could use the nitrite produced by the nitrate reducers present in the biofilm to support its metabolism.

Methylophaga sp. JAM1 has been shown to reduce nitrate into nitrite in denitrifying conditions, and this activity was related to the presence of both *narG* genes [1]. We previously showed that the two genes were transcribed in pure cultures regardless of the incubation conditions (denitrifying or aerobic conditions), suggesting a constitutive expression of these genes [1]. Furthermore, the *narG1* gene product is 88% identical to NarG of the obligate chemolithoautotrophic, sulfur-compound-oxidizing Beta-Proteobacterium *Thiobacillus denitrificans*, one of the rare bacteria species known to couple denitrification and sulfur-compound oxidation. It has been proposed that *Methylophaga* sp. JAM1 acquired *narG1* by horizontal gene transfer [1]. The "recent" acquisition of *narG1* could have allowed *Methylophaga* sp. JAM1 to adapt to the Biodome denitrification system. Curiously, only *narG1* transcripts were detected in the denitrifying biofilm, suggesting that it is differently regulated from *narG2*. Similarly, *Escherichia coli* has two homologous membrane-bound nitrate reductases, NRA and NRZ, which are encoded by *narGHJI* and *narZYWV*, respectively [3]. Both enzymes are expressed at basal levels, with higher expression observed at stationary growth phase, but they are regulated differently. NRA expression is stimulated by anaerobiosis and nitrate under the control of oxygen responsive regulator FNR and the nitrate/nitrite-responsive regulator NarXL, respectively. NRZ expression is rather dependent of the stationary phase regulatory factor RpoS and is not influenced by anaerobiosis and nitrate [8]. RpoS is a stress response regulator associated with the stationary phase and is responsible for the expression of numerous genes conferring more resistance to bacteria under environmental stress conditions [29].

Among the nineteen putative denitrification genes associated with the uncultured bacteria, only the *narG7* and *cnorB21* transcripts were detected by RT-PCR. The seventeen other genes were not transcribed, or the levels of their transcripts were below the detection limit. RT-PCR primers used for these genes were able to detect the corresponding sequences in the DNA biofilm, which thus excludes a problem related to the primers' sensitivity.

CONCLUSIONS

Our results confirmed that *Methylophaga* sp. JAM1 and *Hyphomicrobium* sp. NL23 are predominant in the biofilm, with strain JAM1 expressing *narG1* and strain NL23 expressing *nirK*, *cnorB* and *nosZ*. Bacteria only able to reduce nitrate to nitrite are widespread in many environments and are abundant in wastewater treatment plants [10, 15]. The low level of *napA* transcripts of *Hyphomicrobium* sp. NL23 may suggest that this strain directly used the nitrite present in the biofilm, generated by nitrate respirers such as *Methylophaga* sp. JAM1. Other sequences related to denitrification genes from uncultured bacteria were found in the biofilm. Although present in low amounts, bacteria carrying these genes could play an important role in the denitrification process of the biosystem, thus allowing the biofilm to adapt quickly upon changing conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Montreal Biodome and a grant to R.V. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. J.A. held scholarships from the Fondation Armand-Frappier and the Fonds de recherche sur la nature et les technologies du Québec. We are grateful to Maxime Hémond and the engineering staff of the Biodome for their technical support. This manuscript was revised by Elsevier Language Editing Services.

REFERENCES

1. Auclair J, Lépine F, Parent S, Villemur R (2010) Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a *Methylophaga* strain containing two highly divergent *narG* sequences. *ISME J* 4: 1302-1313
2. Balderston WL, Sieburth JM (1976) Nitrate removal in closed-system aquaculture by columnar denitrification. *Appl Environ Microbiol* 32: 808-818
3. Blasco F, Iobbi C, Ratouchniak J, Bonnefoy V, Chippaux M (1990) Nitrate reductases of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJI* operon. *Mol Gen Genet* 222: 104-111
4. Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64: 3769-3775
5. Braker G, Tiedje JM (2003) Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 69: 3476-3483
6. Bru D, Sarr A, Philippot L (2007) Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Appl Environ Microbiol* 73: 5971-5974
7. Camargo JA, Alonso A, Salamanca A (2005) Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58: 1255-1267
8. Chang L, Wei LLC, Audia JP, Morton RA, Schellhorn HE (1999) Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. *Mol Microbiol* 34: 756-766
9. Cortes-Lorenzo C, Molina-Munoz ML, Gomez-Villalba B, Vilchez R, Ramos A, Rodelas B, Hontoria E, Gonzalez-Lopez J (2006) Analysis of community composition of biofilms in a submerged filter system for the removal of ammonia and phenol from industrial wastewater. *Biochem Soc Trans* 34: 165-168
10. Drysdale GD, Kasan HC, Bux F (2001) Assessment of denitrification by the ordinary heterotrophic organisms in an NDBEPR activated sludge system. *Water Sci Technol* 43: 147-154

11. Enticknap JJ, Kelly M, Peraud O, Hill RT (2006) Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Appl Environ Microbiol* 72: 3724-3732
12. Felsenstein J (1989) PHYLIP- phylogeny inference package. *Cladistics* 5: 164-166
13. Fesefeldt A, Kloos K, Bothe H, Lemmer H, Gliesche CG (1998) Distribution of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium* spp. and other budding bacteria. *Can J Microbiol* 44: 181-186
14. Flanagan DA, Gregory LG, Carter JP, Karakas-Sen A, Richardson DJ, Spiro S (1999) Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiol Lett* 177: 263-270
15. Gentile ME, Jessup CM, Nyman JL, Criddle CS (2007) Correlation of functional instability and community dynamics in denitrifying dispersed-growth reactors. *Appl Environ Microbiol* 73: 680-690
16. Ginige MP, Hugenholtz P, Daims H, Wagner M, Keller J, Blackall LL (2004) Use of stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Appl Environ Microbiol* 70: 588-596
17. Gregory LG, Karakas-Sen A, Richardson DJ, Spiro S (2000) Detection of 412 genes for membrane bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiol Lett* 183: 275-279
18. Grguric G, Wetmore SS, Fournier RW (2000) Biological denitrification in a closed seawater system. *Chemosphere* 40: 549-555
19. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98
20. Hallin S, Lindgren PE (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65: 1652-1657
21. Hallin S, Throback IN, Dicksved J, Pell M (2006) Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol. *Appl Environ Microbiol* 72: 5445-5452
22. Henry S, Baudoin E, Lopez-Gutierrez JC, Martin-Laurent F, Brauman A, Philippot L (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *J Microbiol Methods* 59: 327-335
23. Jones CM, Hallin S (2010) Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. *ISME J* 4: 633-641
24. Kandeler E, Deiglmayr K, Tschierko D, Bru D, Philippot L (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Appl Environ Microbiol* 72: 5957-5962
25. Kloos K, Fesefeldt A, Gliesche CG, Bothe H (1995) DNA-probing indicates the occurrence of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium*. Distribution of denitrifying and nitrogen fixing isolates of *Hyphomicrobium* in a sewage treatment plant. *FEMS Microb Ecol* 205-213
26. Labbé N, Juteau P, Parent S, Villemur R (2003) Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal Biodome, Canada. *Microb Ecol* 46: 12-21
27. Labbé 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: 621-630
28. Labbé N, Parent S, Villemur R (2003) Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. *Water Res* 37: 914-920

29. Lange R, Hengge-Aronis R (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5: 49-59
30. Laurin V, Labbe N, Juteau P, Parent S, Villemur R (2006) Long-term storage conditions for carriers with denitrifying biomass of the fluidized, methanol-fed denitrification reactor of the Montreal Biodome, and the impact on denitrifying activity and bacterial population. *Water Res* 40: 1836-1840
31. Levy-Booth DJ, Winder RS (2010) Quantification of nitrogen reductase and nitrite reductase genes in soil of thinned and clear-cut Douglas-fir stands by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 76: 7116-7125
32. Moran MA, Belas R, Schell MA, Gonzalez JM, Sun F, Sun S, Binder BJ, Edmonds J, Ye W, Orcutt B, Howard EC, Meile C, Palefsky W, Goesmann A, Ren Q, Paulsen I, Ulrich LE, Thompson LS, Saunders E, Buchan A (2007) Ecological genomics of marine roseobacters. *Appl Environ Microbiol* 73: 4559-4569
33. Neef A, Zaglauer A, Meier H, Amann R, Lemmer H, Schleifer KH (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter: Conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol* 62: 4329-4339
34. Neufeld JD, Driscoll BT, Knowles R, Archibald FS (2001) Quantifying functional gene populations: comparing gene abundance and corresponding enzymatic activity using denitrification and nitrogen fixation in pulp and paper mill effluent treatment systems. *Can J Microbiol* 47: 925-934
35. Palmer K, Drake HL, Horn MA (2009) Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers. *Appl Environ Microbiol* 75: 5170-5174
36. Parent S, Morin A (2000) N budget as water quality management tool in closed aquatic mesocosms. *Water Res* 34: 1846-1856
37. Richardson DJ, Berks BC, Russell DA, Spiro S, Taylor CJ (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci* 58: 165-178
38. Sauthier N, Grasmick A, Blancheton JP (1998) Biological denitrification applied to a marine closed aquaculture system. *Water Res* 32: 1932-1938
39. Scala DJ, Kerkhof LJ (1998) Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiol Lett* 162: 61-68
40. Scala DJ, Kerkhof LJ (1999) Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Appl Environ Microbiol* 65: 1681-1687
41. Serghini MA, Ritzenthaler C, Pinck L (1989) A rapid and efficient miniprep for isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 17: 3604-3604
42. Shapleigh J (2006) The Denitrifying Prokaryotes. In: Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E, Schleifer, K-H, Stackebrandt, E (eds.) *The Prokaryotes*. Springer New York, pp. 769-792
43. Sperl GT, Hoare DS (1971) Denitrification with methanol: a selective enrichment for *Hyphomicrobium* species. *J Bacteriol* 108: 733-736
44. Tal Y, Nussinovitch A, van Rijn J (2003) Nitrate removal in aquariums by immobilized *Pseudomonas*. *Biotechnol Prog* 19: 1019-1021
45. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
46. Visvanathan C, Phong DD, Jegatheesan V (2008) Hydrogenotrophic denitrification of highly saline aquaculture wastewater using hollow fiber membrane bioreactor. *Environ Technol* 29: 701-707

47. Yoon JH, Oh TK, Park YH (2004) *Kangiella koreensis* gen. nov., sp. nov. and *Kangiella aquimarina* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1829-1835
48. Yoshie S, Makino H, Hirosawa H, Shirotani K, Tsuneda S, Hirata A (2006) Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 182-189
49. Yoshie S, Noda N, Miyano T, Tsuneda S, Hirata A, Inamori Y (2001) Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method. *J Biosci Bioeng* 92: 346-353
50. 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: 3152-3157
51. Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 533-616

Table 1. Degenerate oligonucleotides used as PCR primers.

Name	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Primer concentration (nM)	References
<i>narG</i> ^a				
narG-A241f	TTYTAYGAYTGGTAYGCNGA	46	500	[1]
narG-C241f	TTYTAYGAYTGGTAYTG YGA		500	
narG-631r	TTYTCYTGNCNACRTARTG		1000	
<i>napA</i> ^a				
napA-206f	GAYCCNAA YGCNMGNCA YTG YATGGC	51	1000	[1]
napA-F457r	TGYTGR TTRAANCCCATNGTCCA		500	
napA-M457r	TGYTGR TTNATNCCCATNGTCCA		500	
<i>nirS</i>				
primer F1acd	TAYCACCCSGARCCGC	57	1000	[20]
primer R4cd	CGTTGAACTTRCCGGTSGG			
<i>nirK</i>				
nirK-203f	TTYGTNTAYCA YTG YGCNCC	56	8000	[1]
nirK-326r	TCNCCRTGNCCNCCDATNARRTGNGG			
<i>cnorB</i> ^a				
cnorB-V212f	TGGGTNGARGGNGTNTGGGA	51	500	[1]
cnorB-T212f	TGGGTNGARGGNACNTGGGA		500	
cnorB-355r	TANGCNCCRWARAANGC		1000	
<i>qnorB</i>				
qnorB2F	GGNCAYCARGGNTAYGA	Touch down	1000	[5]
qnorB7R	GGNGGR TTDATCADGAANCC	PCR		
<i>nosZ</i>				
Nos661f	CGGCTGGGGGCTGACCAA	56	400	[39]
Nos1773r	ATRTC GATCARCTGBTCGTT			

^aThe forward primers narG-A241f/narG-C241f were used with the reverse primer narG-631r, the forward primer napA-206f with the reverse primers napA-F457r/napA-M457r, and the forward primers cnorB V212f/cnorB-T212f with the reverse primer cnorB-355r.

Table 2. Quantification of the denitrification gene sequences in the biofilm by qPCR.

Gene	Gene copies ^a	SD ^b
<i>Methylophaga</i> sp. JAM1		
<i>narG1</i>	1.0 x 10 ⁴	0.14 x 10 ⁴
<i>narG2</i>	1.6 x 10 ⁴	0.25 x 10 ⁴
<i>Hyphomicrobium</i> sp. NL23		
<i>napA</i>	4.5 x 10 ⁴	0.24 x 10 ⁴
<i>nirK</i>	8.4 x 10 ⁴	1.6 x 10 ⁴
<i>nosZ</i>	5.4 x 10 ⁴	0.65 x 10 ⁴
Uncultured bacteria		
nitrate reductase		
<i>narG5</i>	4.5 x 10 ³	1.2 x 10 ³
<i>narG7</i>	1.0 x 10 ³	0.12 x 10 ³
<i>narG27</i>	4.7 x 10 ¹	0.58 x 10 ¹
<i>narG29</i>	3.0 x 10 ¹	1.6 x 10 ¹
<i>narG32</i>	1.2 x 10 ³	0.20 x 10 ³
nitrite reductase		
<i>nirS2</i>	4.4 x 10 ²	0.85 x 10 ²
<i>nirS5</i>	3.6 x 10 ²	0.48 x 10 ²
<i>nirS13</i>	1.6 x 10 ²	0.21 x 10 ²
<i>nirS32</i>	4.4 x 10 ²	0.59 x 10 ²
<i>nirS34</i>	3.6 x 10 ²	1.0 x 10 ²
<i>nirS36</i>	8.9 x 10 ⁰	4.2 x 10 ⁰

^a Average quantification of the three biofilm DNA subsamples. Unit: gene copies per ng of biofilm DNA.

^b Standard deviation.

All pairs of specific primers showed a linear response of the Ct versus the copy numbers of added standard DNA ($R^2 > 0.99$), and exhibited PCR efficiency ranging between 0.89 and 1.06.

Table 3. Detection of denitrification gene transcripts in the bacterial strains and in the biofilm by RT-PCR.

	<u><i>Hyphomicrobium</i> sp. NL23</u>		<u><i>Methylophaga</i> sp. JAM1</u>		<u>Uncultured^b</u>
	Pure culture	Biofilm	Pure culture ^a	Biofilm	Biofilm
<i>narG</i>	NA	NA	<i>narG1</i> <i>narG2</i>	<i>narG1</i> -	<i>narG7</i>
<i>napA</i>	+	-	NA	NA	NA
<i>nirK</i>	+	+	NA	NA	NA
<i>nirS</i>	NA	NA	NA	NA	none
<i>cnorB</i>	+	+	NA	NA	<i>cnorB21</i>
<i>nosZ</i>	+	+	NA	NA	none

NA: not applicable

^a from Auclair et al. [1]

^b Only the *narG* and *cnorB*-related sequences with positive RT-PCR signals were entered in this column. No RT-PCR signal was obtained with the others.

Figure legend

Figure 1

Phylogenetic analysis of the deduced reductase amino acid sequences retrieved from the denitrifying biofilm and the isolated strains. An unrooted phylogenetic tree demonstrated the evolutionary relationship of NarG (A), NapA (B), NirS (C), NirK (D), cNorB (E) and NosZ (F) sequences obtained in this study with representative reductase sequences affiliated with Proteobacteria. The scale bar represents amino acid substitutions per position. Bootstrap values (1,000 replicates) above 50% are indicated at the branches. GenBank accession numbers are indicated in parentheses beside the species name. Trees were inferred from a matrix of pairwise distances using aligned sequences containing 343, 189, 261, 109, 116 and 362 positions for NarG, NapA, NirS, NirK, cNorB and NosZ, respectively. Underlined sequences are from the biofilm, and boxed sequences from the isolated strains.

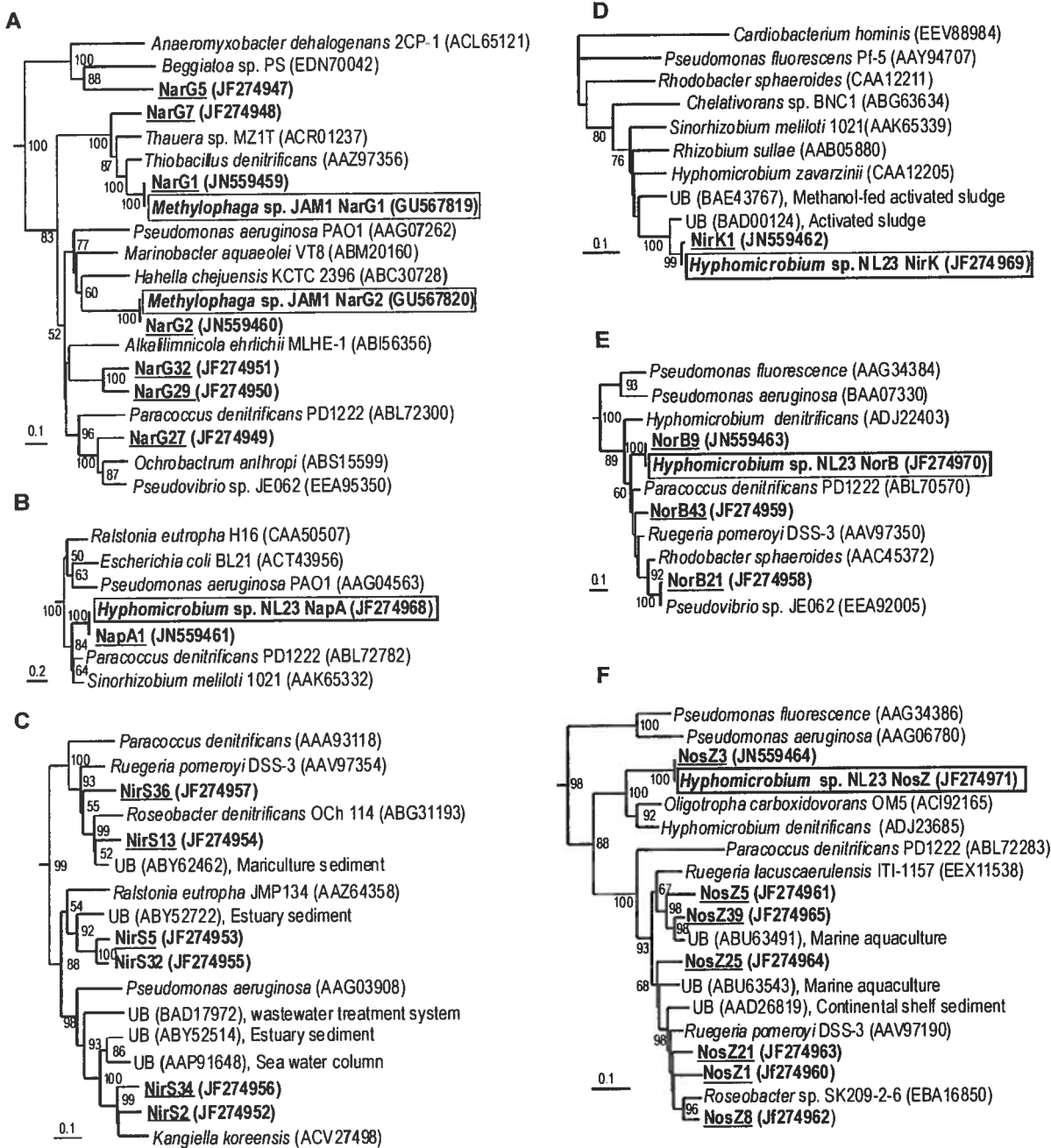


Figure 1

Table S1 Specific primers used for qPCR.

Gene	Sequence (5'-3')	Product Length (bp)	Final primer Concentration (nM)	Annealing Temperature (°C)
<i>narG</i>				
<i>narG1</i>				
G1b_276f	ATTACCGCCACCCAGTTT	157	300	55
G1b_433r	GCITTCGGCATTTC AACCTG			
<i>narG5</i>				
G5b_154f	CTAATAGCAGTGTTTGCCC	136	300	55
G5b_290r	GGATTGGATGGTGATTACC			
<i>narG2</i>				
G2b_331f	GTAGCAAACCTGGAGAGTGC	66	300	63
G2_397r	TCC AACAGCGAAAAAGTACCG			
<i>narG7</i>				
G7b_447f	GGTGC AA CAAAACTCTGAC	117	400	51
G7b_564r	GCTATGTTTCGGATCGTGT			
<i>narG27</i>				
G27b_517f	TTGCCCTTTTGTCTTGG	122	300	51
G27b_639r	GGAAATGGAAAACTGTTGCGG			
<i>narG29</i>				
G29b_353f	CGCCATCAAGATCAATAATAC	153	300	54
G29b_506r	ACATTGCTTGGTTCGCAA			
<i>narG32</i>				
G32b_521f	CTCCGTGTTTGGAAATCGG	89	300	51
G32b_610r	GCGATATCACTGTGCCGACA			
<i>nirS</i>				
<i>nirS2</i>				
nirS2b_292f	CCACCCACAGATTGTTTG	128	500	54
nirS2b_420r	TCACTCIGATCGGTACTG			
<i>nirS5</i>				
nirS5b_105f	GTGTTCCACACCGAAAATC	119	300	54
nirS5b_224r	CGCACCCATGAAGTTTIG			
<i>nirS13</i>				
nirS13c_305f	CATAGAGATGCTCCGATTC	76	300	57
nirS13c_381r	AATGGTGCAGCAGGTGTAT			
<i>nirS32</i>				
nirS32b_538f	CTTCCTTGGTGTGCGATGG	136	500	57
nirS32b_674r	CGACCTGGAAAAACCTTACC			
<i>nirS34</i>				
nirS34b_582f	GCGGTCAGGAAGTACCTT	169	500	57
nirS34b_751r	ATCGTTCGGATCACACAAG			
<i>nirS36</i>				
nirS36b_89f	CAACGATGGCAGATTCGAGG	84	300	59
nirS36b_173r	CAACCCCGTGTGTTC AAGG			
<i>nirK</i>				
nirK1b160f-NL23	GGTCTGGACCGTATCGAAATAG	118	300	57
nirK1b278r-NL23	TTCCTTACGACCGCGTCTACTA			
<i>nosZ</i>				
nosZ321f-NL23	GCTGGAATCTTGTGCGTTGAAG	227	300	55
nosZ548r-NL23	TCGAGGAAGCCGTCAAGAAG			
<i>napA</i>				
napA346f-NL23	GATCACACGGCGTTCTTCAA	158	300	55
napA504r-NL23	GTCCAAGGTGTACTCTGAT			

Table S2. Specific primers used for RT-PCR.

Primer	Sequence 5'-3'	Primer concentration (nM)	Annealing temperature (°C)
<i>narG</i>			
G1_180f	CCCTGTACGCTCGATACCA	200	56
G1_384r	GCCAGTACGCAAGGTTAAGC		
G5_170f	CCCAITCTTGTGCAAAAGCT	200	49
G5_358r	CCGATGGTAAAAACGATACG		
G2_175f	TCACGCGCAATTTGAACCAC	200	57
G2_397r	TCCAACAGCGAAAAAGTACCG		
G7_60f	AACTCATGACCTGTACGTGC	200	64
G7_285r	TGTGGCGTAATA TGCCGTGC		
G27_479f	GGTCGTCAAGAA TCAGACTC	200	64
G27_684r	TCGTGGCTCTGATTTCAAGG		
G29_530f	CGCTCTTTAGAA TCCTTAGG	200	60
G29_727r	TACGTTCCAGGTCAAAATGG		
G32_182f	CGACCTGGATGACTTTATCG	200	49
G32_396r	CTGGATCGCAATA TTCGA		
<i>napA</i>			
napA136f-NL23	CTGCAAACCTTCACGAACCG	200	58
napA326r-NL23	GTCTCAGCCCGTAGCCGATA		
<i>nirS</i>			
nirS2_255f	GACTGACTGATCTCGTCTCC	200	58
nirS2_482r	CAACTTCATCCACCCCGAGT		
nirS5_176f	GTC'TTIGATGCCCGACCACT	200	53
nirS5_428r	CGAA'TCCGTGGCTTTGATCG		
nirS13_358f	ATCGCATACACCTGCTGCACC	200	59
nirS13_582r	CAACAAGGTGGTGGTGATGG		
nirS32_411f	ATGAGCGCGATGGTTTCGTG	200	60
nirS32_674r	CGACCTGGAAAAACCTTACCA		
nirS34_200f	GATCGGCAGGGTTTCA TAGC	200	57
nirS34_377r	GTTCAAAGGTGGTCAGAA TCC		
nirS36_89f	CAACGATGGCAGATTCGAGG	200	61
nirS36_335r	AAATCGCACCCGAACTCTGC		
<i>nirK</i>			
nirK48f-NL23	GCGAATGGATGATGAGAACC	200	53
nirK223r-NL23	CGAGAAGGGCGATTACAAGA		
<i>cnorB</i>			
cnorB_40f-NL23	TTATGTCAATCGTCGGCACG	300	55
cnorB234r-NL23	GCC'TTGTTCGGATGCTCA		
cnorB21_194f	GTTCGGTCTCTCTACTCTG	300	55
cnorB21_293r	GCTT'TGT'TGGGTGGTTC TTA		
cnorB43_99f	GTACGTCAATCGCCGCAIT	300	60
cnorB43_249r	GGCAAAGGACATCATCGCA		
<i>nosZ</i>			
nosZ1_177f	GTCAGATCCGCCATAAGACG	200	55
nosZ1_363r	GCTGGACGCTT'TGTTTGATG		
nosZ321f-NL23	GCTGGATCTTGTCTGTGAAG	200	55
nosZ548r-NL23	TCGAGGAAGCCGTCAAGAAG		
nosZ5_194f	CTGTACGGCTTTCGCAATGT	200	50
nosZ5_426r	ATGGCAITCACGTTGTATC		
nosZ8n_336f	CAGCATCCAGTTTIC'CAACG	200	50
nosZ8n_525r	AACTACCAGGAGCTGAAAGG		
nosZ21_150f	GTCCACTTTATCCA TGACTGG	200	51
nosZ21_349r	TCACAGACAACGCCGACGAA		
nosZ25_291f	ACCAAGTCCCAATTCAGGCTC	200	61
nosZ25_536r	CAGGTTCTCAACGGCATTCC		
nosZ39_194f	GCCTTGATCGCCTTTTCGATA	200	50
nosZ39_386r	TGTTCCGGTATCGACGTGAC		

Table S3: Results of the cloning process.

Clone name	Positive clones/ screened clones	Clone name	Positive clones/ screened clones	Clone name	Positive clones/ screened clones
narG1	4/48	nirS2	4/96	cnorB9	4/48
narG2	20/48	nirS5	1/96	cnorB21	1/48
narG5	5/48	nirS13	1/96	cnorB43	1/48
narG7	1/48	nirS32	1/96	<u>unspecific</u>	<u>42/48</u>
narG27	1/48	nirS34	1/96		
narG29	1/48	nirS36	1/96	nosZ1	1/48
narG32	1/48	<u>unspecific</u>	<u>87/96</u>	nosZ3	11/48
<u>unspecific</u>	<u>15/48</u>			nosZ5	1/48
		nirK1	10/36	nosZ8	17/48
napA1	14/36	<u>unspecific</u>	<u>26/36</u>	nosz21	1/48
<u>unspecific</u>	<u>22/36</u>			nosZ25	2/48
		qnorB	ND	nosZ39	1/48
				<u>unspecific</u>	<u>12/48</u>

qnorB: no PCR product was obtained.

