

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**CARACTÉRISATION DE LA FLORE MICROBIENNE D'UN BIOPROCÉDÉ AÉROBIE  
THERMOPHILE POUR LE TRAITEMENT DU LISIER DE PORC**

Par  
**Danielle Tremblay**

Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury  
Et examinateur interne

Dr Réjean Beaudet,  
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr Caroline Côté  
Institut de Recherche et  
Développement en  
Agroenvironnement (IRDA)

Directeur de recherche

Dr Jean-Guy Bisailon  
INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

Dr Pierre Juteau  
INRS-Institut Armand-Frappier

## Résumé

Les volumes énormes de lisier de porc produit dans les régions qui présentent une grande densité de production animale et un épandage inapproprié peuvent engendrer la détérioration de la qualité de l'environnement et présenter un risque important pour la santé humaine et animale. Les composés azotés et phosphorés contenus dans le lisier peuvent contribuer à l'eutrophisation des plans d'eau et de l'appauvrissement des sols, alors que les gaz émis par les installations porcines ont un rôle à jouer dans le réchauffement de la planète. De plus, certains éléments présents dans le lisier, composés chimiques, microorganismes pathogènes, peuvent causer des troubles de santé au bétail, aux travailleurs de la production et à la population environnante.

Afin de rendre le lisier de porc plus stable et sécuritaire, un traitement utilisant un bioréacteur aérobic thermophile (échelle laboratoire) est présentement à l'étude. Ce traitement a la particularité de permettre la dégradation de la matière organique, d'éliminer les odeurs, de détruire les microorganismes pathogènes et d'extraire une partie du phosphore et de l'azote ammoniacal.

Puisque l'élévation de la température et la dégradation de la matière organique sont le résultat du métabolisme bactérien, une étude microbiologique semble une approche intéressante pour la compréhension du système. L'analyse de la population thermophile à l'aide de la biologie moléculaire et par techniques classiques de microbiologie ainsi que l'évaluation de la destruction de microorganismes indicateurs et pathogènes sont les principaux objectifs de ce projet.

Pour observer les variations des populations tout au long d'un cycle de traitement, un suivi de l'évolution de la microflore a été réalisé par PCR-DGGE ("Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis"). Dans notre cas, c'est le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S qui a été étudié. Cette technique permet de séparer les gènes ou les fragments d'ADN selon leur séquence en acides nucléiques. Elle a aussi été utilisée comme outil pour le criblage d'une librairie de clones. Les méthodes de microbiologie traditionnelle ont été utilisées pour étudier la présence de bactéries thermophiles cultivables et pour la vérification de la destruction des microorganismes pathogènes au cours du traitement.

Le suivi des populations nous a permis d'observer l'établissement d'une diversité microbienne importante. Elle semble se stabiliser après trois à quatre mois de fonctionnement du système. Les 78 clones qui ont été obtenus lors de l'élaboration de la génothèque ont pu être rassemblés en 24 groupes. Environ 64% des clones étudiés appartiennent ou sont de proches parents du genre *Bacillus* tandis que 18% sont apparentés aux Clostridiales. Quelques souches ont été capables de croître sur milieux de culture solides et 20 isolats ont été obtenus. Parmi celles-ci, 16 appartiennent à la famille des *Bacillaceae*, dont le tiers correspond à l'espèce *Bacillus thermocloacae*, et quatre font partie de la famille des *Micrococcaceae*.

Le bioréacteur aérobie thermophile a la capacité de détruire plus de 99% des coliformes fécaux, des *Campylobacter* spp. et de l'espèce *Clostridium perfringens*. La température semble influencer l'élimination de microorganismes thermostables comme *C. perfringens*, puisqu'un traitement qui avait atteint 70°C a montré une meilleure efficacité de destruction (99.9%) que celui maintenu à 50°C (99.3%). Toutefois, un traitement de trois jours à 50°C est suffisant pour obtenir l'élimination de microorganismes indicateurs et pathogènes contenus dans le lisier à 99%.



Danielle Tremblay  
Candidate à la maîtrise



Jean-Guy Bisailon  
Directeur de recherche



Pierre Juteau  
Co-directeur de recherche

## Remerciements

J'aimerais remercier le Dr Jean-Guy Bisailon et le Dr Pierre Juteau qui m'ont permis de travailler dans leur laboratoire, sur un sujet qui était et qui restera fort intéressant pour les années à venir. J'aimerais particulièrement remercier le Dr Pierre Juteau pour sa supervision, pour son écoute et tous les moments qu'il a bien voulu accorder à mes questions.

Merci au Dr Richard Villemur pour toutes les techniques apprises et l'aide apportée en biologie moléculaire, au Dr Réjean Beaudet et François Lépine pour leur bons conseils.

Merci à Louis Racine pour le support technique et les bons moments de rires, à toute l'équipe du groupe de microbiologie en environnement (Rita, Sylvain) pour leur aide et aux étudiants pour leur temps et leur amitié (Jacinthe, Annie V, Valérie, Eric, Martin, Normand).

Je voudrais remercier Marie-Ève pour avoir endurer toutes mes plaintes et m'avoir soutenu au cours de ces deux années.

Un énorme merci à toute ma famille et particulièrement à Maman, Jean-Guillaume et Catherine, vous avez été d'un support moral et psychologique qui m'ont permis de mettre à terme ce projet.

Finalement j'aimerais remercier le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), la Fondation Armand-Frappier (FAF) et le Fonds d'Action Québécois pour le Développement Durable (FAQDD) pour leur support financier.

## Table des matières

Résumé .....	ii
Remerciements .....	iv
Liste des tableaux et des figures .....	vii
Introduction .....	1
<b>Chapitre 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>4</b>
1.1. Le lisier de porc .....	5
1.1.1. Généralité.....	5
1.1.2. Impacts environnementaux et sur la santé .....	6
1.2. Survol des technologies de traitement du lisier de porc.....	9
1.2.1. Modification de l'alimentation des animaux d'élevages agricoles .....	9
1.2.2. Traitements anaérobies .....	11
1.2.3. Traitements aérobies .....	12
1.3. Traitement aérobie thermophile.....	17
1.3.1. Ingénierie .....	19
1.3.2. Microbiologie .....	22
1.3.2.1. Destruction des pathogènes .....	22
1.3.2.2. Microflore active.....	22
1.4. Techniques de biologie moléculaire, appliquées à l'écologie microbienne.....	28
<b>Chapitre 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>34</b>
2.1. Le lisier de porc .....	35
2.2. Le bioréacteur aérobie thermophile, échelle laboratoire.....	35
2.3. Analyses physico-chimiques.....	37
2.3.1. Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO) .....	37
2.3.2. Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH <sub>3</sub> ).....	38
2.4. Optimisation des paramètres pour le PCR-DGGE.....	39
2.4.1. Extraction de l'ADN génomique.....	39
2.4.2. Amplification des échantillons pour DGGE .....	41
2.4.3. Conditions idéales pour DGGE .....	43
2.5. Suivi de l'évolution de la flore microbienne sur DGGE lors du traitement aérobie thermophile du lisier de porc .....	45
2.5.1. Élaboration d'un marqueur de référence pour le DGGE .....	45
2.5.1.1. Culture des souches .....	45
2.5.1.2. Extraction de l'ADN génomique .....	45
2.5.1.3. Quantification de l'ADN génomique .....	46
2.5.1.4. Amplification d'un fragment de la région hypervariable V3 des souches pures connues ...	46
2.5.1.5. Obtention du marqueur de référence pour DGGE .....	48
2.5.2. Traitement des échantillons provenant du bioréacteur aérobie thermophile par PCR-DGGE....	48
2.5.2.1. Extraction d'ADN génomique des échantillons .....	49
2.5.2.2. Amplification de fragments d'ADN génomique .....	49
2.5.2.3. Migration des échantillons sur DGGE .....	49
2.6. Caractérisation de la flore microbienne présente dans le bioréacteur aérobie thermophile traitant le lisier de porc .....	49
2.6.1. Élaboration de la librairie de clones.....	50
2.6.1.1. Amplification du gène de l'ARN ribosomal 16S .....	50
2.6.1.2. Purification et concentration des amplicons .....	50
2.6.1.3. Ligation et transformation .....	50
2.6.1.4. Extraction d'ADN plasmidique des clones.....	52
2.6.2. Criblage de la librairie de clones par PCR-DGGE et étude phylogénique .....	53
2.6.2.1. Amplification de la région hypervariable V3 de l'ADNr 16S des clones de la génothèque. 53	53
2.6.2.2. Criblage des clones obtenus sur DGGE .....	53
2.6.2.3. Séquençage des clones d'intérêts .....	53
2.6.2.4. Étude phylogénique .....	54
2.6.3. Microorganismes cultivables .....	54
2.6.3.1. Sélection des milieux de cultures.....	54

2.6.3.2. Isolement de bactéries cultivables à 40 et 60°C.....	55
2.6.3.3. Extraction et amplification de l'ADN génomique des souches bactériennes isolées à 40 et 60°C.....	56
2.6.3.4. Correspondance des différentes souches cultivables, purifiées à 40 et 60°C, avec l'échantillon de référence (section 2.6.) par DGGE.....	56
2.6.3.5. Clonage des souches cultivables, purifiées à 40 et 60°C.....	56
2.6.4. Confirmation de l'identité de clones et de souches cultivables par "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP).....	57
2.7. Vérification de la destruction des microorganismes indicateurs et pathogènes.....	58
2.7.1. Détection des coliformes fécaux.....	58
2.7.2. Détection de <i>Clostridium perfringens</i> .....	59
2.7.3. Détection de <i>Campylobacter</i> spp.....	60
2.7.4. Détection de <i>Salmonella</i> spp.....	60
2.7.5. Détection de <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	62
2.7.6. Détection de <i>Cryptosporidium parvum</i> et de <i>Giardia lamblia</i> .....	63
Chapitre 3. RÉSULTATS.....	64
3.1. Optimisation des paramètres pour le PCR-DGGE.....	65
3.1.1. Extraction d'ADN génomique.....	65
3.1.2. Choix des amorces pour PCR-DGGE et conditions idéales pour le gel et l'électrophorèse.....	67
3.2. Élaboration du marqueur de référence.....	71
3.3. Suivi de l'évolution de la flore dans les bioréacteurs.....	71
3.4. Caractérisation de la flore microbienne.....	77
3.4.1. Librairie de clones.....	77
3.4.2. Microorganismes cultivables à 40 et 60°C.....	85
3.4.2.1. Culture des microorganismes à 40°C.....	87
3.4.2.2. Culture des microorganismes à 60°C.....	87
3.4.2.3. Identification des différentes souches bactériennes cultivables isolées à 40 et 60°C.....	89
3.4.2.4. Analyse des groupes 12 et 18.....	97
3.4.3. Étude phylogénique des microorganismes présents dans le bioréacteur (cultivables et non cultivables).....	99
3.5. Destruction des pathogènes.....	106
Chapitre 4. DISCUSSION.....	109
4.1. Évaluation des méthodes utilisées.....	110
4.2. Analyse de la microflore dominante.....	113
4.3. Destruction des pathogènes.....	122
Conclusion.....	124
APPENDICES.....	126
Références.....	140

## Liste des tableaux et des figures

**Tableau 1.** Microorganismes et maladies reliés à l'exposition de particules ou à la contamination par le lisier de porc, p. 10.

**Tableau 2.** Températures, pH et temps nécessaires à la destruction de différents microorganismes pathogènes dans des conditions aérobies thermophiles, p. 23.

**Tableau 3.** Microorganismes identifiés dans des systèmes de traitements aérobies thermophiles à l'aide des méthodes de microbiologie traditionnelle, p. 25.

**Tableau 4.** Liste des éléments importants pour une croissance optimale des microorganismes thermophiles, p. 25.

**Tableau 5.** Proportions des microorganismes cultivables en laboratoire provenant de l'environnement, p. 29.

**Tableau 6.** Caractéristiques du lisier de porc utilisé lors des cycles de traitement ayant fait l'objet d'un suivi microbiologique, p. 36.

**Tableau 7.** Variation des paramètres pour l'optimisation de l'extraction d'ADN génomique par bris mécanique, p. 40.

**Tableau 8.** Liste des amorces utilisées, p. 42.

**Tableau 9.** Description des souches bactériennes utilisées pour l'élaboration d'un marqueur de référence pour le DGGE, p. 47.

**Tableau 10.** Caractéristiques physico-chimiques et performances des cycles de traitement où un suivi microbiologique a été réalisé, p. 75.

**Tableau 11.** Classification des clones retrouvés dans le bioréacteur, p. 84.

**Tableau 12.** Description de la morphologie coloniale et cellulaire des colonies isolées à 40°C, p. 88.

**Tableau 13.** Description de la morphologie coloniale et cellulaire des colonies isolées à 60°C, p. 90.

**Tableau 14.** Caractéristiques des souches cultivables qui ont survécu à la congélation et leur appartenance au groupe de référence sur DGGE, p. 92-93.

**Tableau 15.** Détection de microorganismes pathogènes dans le lisier de porc brut et vérification de leur destruction suite au traitement aérobie thermophile, p. 107.

**Figure 1.** Évolution de groupes microbiens à l'intérieur d'une pile de compost lors de la stabilisation et l'hygiénisation d'un substrat solide, p. 16.

**Figure 2.** Carte circulaire du vecteur pGEM®-T Easy, p. 51.

**Figure 3.** Patron et répartition des dilutions pour la détection et le dénombrement de *Salmonella* spp. selon la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP), p. 61.

**Figure 4.** Résultats des différents essais pour l'optimisation de l'extraction d'ADN génomique par bris mécanique des cellules, p. 66.

**Figure 5.** Essai DGGE avec fragments de 600bp, p. 68.

**Figure 6.** Essai DGGE avec fragment 200bp, p. 69.

**Figure 7.** Obtention d'une bande seule sur DGGE pour chacune des souches pures, p. 70.

**Figure 8.** Effet de la présence d'un gel d'empilement, p. 72.

**Figure 9.** Marqueur de référence, p. 73.

**Figure 10.** Suivis de l'évolution des communautés microbiennes par DGGE, p. 76.

**Figure 11.** Cycle O, suivi serré de la variation des populations microbiennes dans le bioréacteur lors du traitement, p. 78.

**Figure 12.** Identification des bandes de l'échantillon de référence t17 du cycle O obtenu par DGGE, p. 79.

**Figure 13.** Analyse des clones par DGGE, p. 80.

**Figure 14.** Vérification des membres des groupes de clones les plus importants en nombre, p. 82.

**Figure 15.** Distribution du nombre de clones obtenus, p. 83.

**Figure 16.** Courbe de raréfaction des clones obtenus à partir du bioréacteur, p. 86.

**Figure 17.** Correspondance des souches cultivables avec l'échantillon de référence t17 (cycle O), p. 94.

**Figure 18.** Nouvelles positions obtenues suite à l'analyse des souches cultivables par DGGE, p. 95.

**Figure 19.** Nombre de souches cultivables obtenues par rapport à leur appartenance à un des groupes de référence, p. 96.



**Figure 20.** Patrons de restriction pour les clones et les souches cultivables membre du groupe 12, p. 98.

**Figure 21.** Relation phylogénique des clones et des souches cultivables du bioréacteur aérobic thermophile avec des membres des familles des *Bacillaceae* et des *Lactobacillaceae*, p. 100.

**Figure 22.** Relation phylogénique des clones du bioréacteur aérobic thermophile avec des membres de la famille des *Clostridiaceae*, p. 101.

**Figure 23.** Relation phylogénique des clones du bioréacteur aérobic thermophile avec des membres du sous-groupe des *gamma-Proteobacteria* et de la famille des *Spirochaetaceae*, p. 102.

**Figure 24.** Relation phylogénique des clones et des souches cultivables du bioréacteur aérobic thermophile avec des membres de la famille des *Micrococcaceae* et des Bacteroidales, p. 103.

**Figure 25.** Représentation des différentes espèces obtenues dans le bioréacteur aérobic thermophile, p. 105.

## Introduction

Un problème d'actualité au Québec est l'implantation et l'agrandissement de porcheries dans des régions où l'activité agricole intensive atteint déjà un taux élevé. Ce sont les déjections générées par cette industrie qui sont au cœur des débats. Les volumes de déchets liquides produits par les installations porcines sont devenus trop importants pour qu'ils puissent être utilisés de manière traditionnelle, c'est-à-dire par simple épandage sur les terres agricoles voisines. Les différents éléments qui composent le lisier de porc se répandent dans l'environnement et, lorsque déversé en excès, détériorent la qualité des sols, des lacs et des rivières. Les gaz émis par les fosses et lors de l'épandage sont impliqués dans les changements climatiques et dans l'inconfort de la population environnante en dégageant de fortes odeurs nauséabondes. Plusieurs cas de maladies entériques sont reliés à la présence de microorganismes pathogènes provenant des déjections animales qui sont emportés vers les eaux de récréation et de consommation par ruissellement et par percolation.

Beaucoup d'efforts sont déployés par différentes équipes de recherche afin d'amoinrir les effets du lisier de porc sur l'environnement et sur la santé par des procédés biologiques. Les particularités recherchées dans un traitement biologique sont entre autre l'efficacité à dégrader la matière organique, à éliminer les odeurs et parfois même à réduire l'azote.

En collaboration avec l'Institut de Recherche et Développement en Agroenvironnement (IRDA), une chaîne de valorisation du lisier de porc est présentement à l'étude. À l'INRS-Institut Armand-Frappier, nous étudions particulièrement le traitement du lisier de porc à l'aide de bioréacteurs aérobies thermophiles. Les conditions thermophiles du système sont atteintes grâce à l'activité métabolique des microorganismes présents dans les bioréacteurs. L'énergie générée lors de la dégradation ou plus précisément, lors de l'oxydation de la matière organique par les bactéries, est dissipée sous forme de chaleur. Les bactéries utilisent les composés organiques comme source de carbone et d'énergie pour leur croissance et leur maintenance cellulaire. Elles ont aussi la capacité de dégrader certains composés du lisier qui causent des mauvaises odeurs (méthane, H<sub>2</sub>S, acides gras volatils). Les

microorganismes jouent donc un rôle primordial dans la stabilisation et l'hygiénisation du lisier de porc. Les hautes températures et le pH alcalin permettent la volatilisation de l'azote ammoniacal qui est ensuite récupéré dans un laveur acide.

Au cours de ce procédé, les populations microbiennes se relaient la tâche de la dégradation du lisier de porc. L'évolution des différentes communautés lors de ce traitement est un aspect intéressant à approfondir. Est-ce que la diversité microbienne diminue avec l'augmentation de la température? Quelle est l'importance de cette diversité? Varie t'elle d'un cycle de traitement à un autre? Quels sont ces bactéries? Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé des techniques de biologie moléculaire qui nous ont permis une détection plus sensible de la flore microbienne comparativement aux résultats qui auraient été obtenus avec les techniques de microbiologie classique. Tout d'abord, le suivi des populations microbiennes à travers les cycles de traitement a été réalisé par empreinte génétique. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique du "Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" (PCR-DGGE). L'amplification vise une région hypervariable (V3) du gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S). Les fragments d'ADN générés sont appliqués sur un gel de polyacrylamide qui possède un gradient linéaire de dénaturant chimique. Les échantillons subissent une électrophorèse et les différents fragments d'ADN provenant d'une population hétérogène de microorganismes sont séparés selon leur séquence en acides nucléiques. Par la suite, une génothèque a été constituée. Cette fois-ci, l'amplification visait l'ADNr 16S complet, qui a ensuite été cloné. À cette étape, le DGGE a été utilisé comme outil de criblage pour la librairie de clones. Il nous a donc été possible d'identifier les différents microorganismes présents dans le bioréacteur suite au séquençage des clones sélectionnés et à leur comparaison dans les banques de données. Enfin, les méthodes de microbiologie traditionnelle nous ont permis d'obtenir quelques communautés bactériennes thermophiles cultivables sur des milieux solides. La biologie moléculaire nous a permis d'identifier les représentants de la flore cultivable suite au séquençage des isolats et à la comparaison des résultats dans les banques de données.

Une autre interrogation était de savoir si le procédé de traitement du lisier élaboré à l'INRS-IAF avait la capacité de détruire efficacement les microorganismes indicateurs et pathogènes. Les organismes ciblés étaient les coliformes fécaux, *Clostridium*

*perfringens*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., et les parasites *Cryptosporidium parvum* (ookystes) et *Giardia lamblia* (kystes). Des milieux de culture sélectifs pour les souches bactériennes ont été utilisés pour leur détection dans le lisier brut et dans l'effluent sortant du traitement. Le tout était confirmé à l'aide de milieux qui nous permettaient d'observer des activités métaboliques particulières à la bactérie étudiée ou à l'aide de galeries de tests biochimiques miniaturisés. Pour la détection des parasites, les tests ont été réalisés par immunofluorescence, une méthode spécifique et rapide pour l'observation de ces organismes en microscopie.

Ce mémoire de maîtrise présente les résultats obtenus sur l'analyse de la flore microbienne retrouvée dans un bioréacteur aérobique thermophile traitant le lisier de porc. Il est à noter que ce travail a été fait en parallèle avec la mise au point du procédé. Comme cette tâche était la responsabilité d'autres membres de l'équipe, le présent mémoire ne fait qu'une description sommaire des aspects d'ingénierie du système.

## **Chapitre 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1.1. Le lisier de porc

### 1.1.1. Généralité

Un secteur important de l'économie québécoise est l'élevage du bétail à des fins alimentaires. Par exemple, l'industrie porcine a engendré des retombées économiques de 3.7 milliards de dollars pour l'année 2000 (Fédération des Producteurs de Porcs du Québec, 2000). En 2001, elle comptait jusqu'à sept millions de têtes et les exportations à elles seules ont rapporté 829 millions de dollars. Le Québec exporte 40% des viandes de porcs canadiennes. Les nombreuses activités qui entourent cette industrie génèrent plus de 25 800 emplois (Santé Canada, 1999). Cependant, elles sont responsables d'une accumulation importante de déchets qui, éventuellement, peuvent présenter un risque pour l'environnement et la santé.

Aux États-Unis, on estime que l'élevage génère jusqu'à 1.6 milliards de tonnes de matières résiduelles annuellement (Altekruse *et al.*, 1998). Au Québec seulement, ce sont entre neuf et onze millions de mètres cubes de déjections en provenance des installations porcines qui, annuellement, doivent être manipulées, entreposées et appliquées sur les terres agricoles (Santé Canada, 1999; Fédération des Producteurs de Porcs du Québec, 2000). L'épandage constitue le moyen le plus couramment utilisé par les producteurs pour se débarrasser de ces déchets tout en fertilisant ses terres. Présentement, les producteurs font face à un problème majeur: le nombre et l'étendue des terres disponibles pour l'épandage et le recyclage sécuritaire des déjections animales ne sont plus suffisants pour les volumes générés par l'industrie (Smith *et al.*, 2000; Chang et Entz, 1996; Pagilla *et al.*, 2000). Par exemple, la superficie de sol manquante pour l'application de lisier de porcs et de fumier bovin est estimée à 50 000 hectares, seulement pour les installations basées dans le bassin versant de la rivière Chaudière (Santé Canada, 1999). Pour combler ce manque d'espace, les agriculteurs effectuent des applications répétitives de lisier au champ. Suite à cet apport excessif d'agents fertilisants, les éléments du lisier s'accumulent dans le sol et atteignent des concentrations très élevées. À long terme, les terres deviennent saturées par ces composés (Culley *et al.*, 1981; Miner, 1999).

Le lisier de porcs est très riche en éléments minéraux comme l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K) ainsi qu'en matière organique (Santé Canada, 1999). D'après un rapport du "North Carolina Agriculture Research Service", l'azote et le

phosphore sont les nutriments qui possèdent le potentiel polluant le plus élevé ("Swine Odor Task Force", 1995). Dans le lisier de porc, l'azote total se retrouve à des concentrations pouvant atteindre 3500 mg/L, et le phosphore, jusqu'à 2500 mg/L. Aussi, leur contenu en matière organique est 250 fois plus élevé que celui des eaux usées urbaines (Cole *et al.*, 1999; Santé Canada, 1999). La demande biochimique en oxygène (DBO)<sup>1</sup>, qui est un indicateur de la concentration de matière organique présente, peut atteindre jusqu'à 40 000 mg/L (Santé Canada, 1999).

### 1.1.2. Impacts environnementaux et sur la santé

L'utilisation qui est faite des déjections animales a donc un impact environnemental inquiétant: l'accumulation de nutriments dans les sols, la contamination et l'eutrophisation des cours d'eau, la pollution de l'air par les odeurs ainsi qu'une influence au niveau des changements climatiques (Jongbloed et Lenis, 1998) sont quelques exemples. De plus, ces déjections peuvent contenir des microorganismes potentiellement pathogènes qui présentent un risque pour la santé des animaux, des travailleurs et de la population environnante.

La contamination des écosystèmes par les déjections animales peut être due à la non étanchéité des fosses où est entreposé le lisier et d'un épandage mal orchestré (Santé Canada, 1999; Miner, 1999). La surfertilisation, le temps de l'année, la saison et les conditions climatiques qui suivent l'application aux champs, influencent l'efficacité d'incorporation du lisier (Smith *et al.*, 2000; Hooda *et al.*, 2000).

Hooda *et al.* (2000) ont observé que la qualité de l'eau se détériore à la suite d'une averse. Une première explication est le lavage des terres qui ont été fertilisées et qui n'ont pas eu une période de temps adéquate pour absorber efficacement les nutriments. L'autre explication se situe au niveau de la saturation du sol en azote, en phosphore et en matière organique. Ces éléments s'accumulent plutôt que d'être absorbés par le sol et sont ensuite lessivés par la pluie et amenés par ruissellement vers les eaux de surfaces (Coffey, 1999; Hooda *et al.*, 2000). La contamination des cours d'eau entraîne de

---

<sup>1</sup> **Demande Biochimique en Oxygène (DBO):** estimation de la concentration de la matière organique utilisable par la flore microbienne. Obtenue en observant la quantité d'oxygène consommé par la flore microbienne pendant l'oxydation de la matière organique sur une période de temps donnée (Atlas et Bartha, 1997)

nombreux dérèglements dans l'écosystème aquatique qui risquent de se répercuter ensuite sur la faune et la flore environnante et mener à l'appauvrissement de la biodiversité (Jongbloed et Lenis, 1998). Tout d'abord, les nombreux solides présents dans le lisier porcin peuvent rapidement recouvrir la zone benthique du plan d'eau et changer la composition de la faune qui s'y trouve (Cooper, 1993). De plus, la présence de composés azotés et phosphorés en grandes quantités contribue à la dégradation des eaux de surface en favorisant une croissance excessive d'algues et accélérant le phénomène d'eutrophisation (Sharpley et Withers, 1994; Roland *et al.*, 1993; Santé Canada, 1999; Cole *et al.*, 1999). Une concentration de substances phosphorées au delà de 0.05 mg/L est suffisante pour provoquer l'eutrophisation des lacs (McDowell et Sharpley, 2001). La présence de certains composés azotés peut quant à elle mener à la mort d'espèces aquatiques. C'est le cas de l'ammoniaque qui, à un pH alcalin, peut être toxique à une concentration aussi basse que 0.02 mg/L (Hooda *et al.*, 2000). La contamination par la matière organique entraîne une croissance rapide des microorganismes. La consommation d'oxygène par ces organismes diminue la concentration d'oxygène dissout dans l'eau et les sédiments et cause l'anoxie du milieu. Sous un certain seuil, l'oxygène dissout ne permet plus de supporter certaines formes de vies aquatiques comme les poissons (Aneja *et al.*, 2000; Hooda *et al.*, 2000; Santé Canada, 1999; Cole *et al.*, 1999). Enfin, les fortes concentrations de matière organique fraîche qui contaminent les cours d'eau peuvent causer certains problèmes lorsqu'il s'agit de la production d'eau potable. Elle peut d'abord nuire au bon fonctionnement des systèmes de filtration de l'eau. Mais un impact plus important survient lors de la chloration de l'eau. Une réaction entre les infimes particules de matière organique en suspensions et les produits de chloration de l'eau peut mener à la formation de trihalométhanes ou d'autres substances qui ont des propriétés toxiques et mutagènes. Certains liens auraient été faits entre ces substances et le cancer de la vessie et du colon (Santé Canada, 1999).

Les eaux souterraines sont moins touchées par la contamination due aux composés phosphorés puisque leur solubilité et leur mobilité dans le sol sont très faibles. Par contre, si les composés azotés s'accumulent à une profondeur dépassant le réseau racinaire des plantes et atteignent une concentration élevée, les surplus sont amenés par percolation à travers le sol jusqu'aux sources d'eaux souterraines (Coffey, 1999; Miner,



1999). En milieu rural, les eaux souterraines sont la principale source d'eau de consommation des résidents et d'abreuvement des élevages agricoles. Les nitrates et les nitrites qui sont emportés vers cette importante source d'eau constituent un risque énorme pour la santé humaine et animale. L'ingestion de ces composés est toxique, surtout pour les jeunes enfants. Plus précisément, ils diminuent l'habileté du sang à transporter l'oxygène. L'intoxication par ces composés chez les enfants est appelée le syndrome du bébé bleu ou méthémoglobinémie (Aneja *et al.*, 2000; Santé Canada, 1999).

Le lisier a aussi un impact sur la qualité de l'air. Dans un premier temps, l'urée présente dans le lisier est transformée en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) par les microorganismes fécaux qui possèdent une activité uréase (Jongbloed et Lenis, 1998). L'ammoniac gazeux est principalement émis à partir des bâtiments porcins, de l'entreposage des résidus, des procédés de lagunage et surtout lors de l'application du lisier, où 80% du gaz se retrouve dans l'atmosphère (Aneja *et al.*, 2000; Baumgarten *et al.*, 1999). Plusieurs conséquences environnementales sont associées à l'ammoniac atmosphérique. À proximité de la source d'émission, il représente une forte odeur. Sur de plus longues distances, les répercussions qui découlent de la déposition de l'ammoniac sont l'acidification des sols, suite aux réactions de nitrification/dénitrification, et l'eutrophisation des cours d'eau (Aneja *et al.*, 2000).

D'autres gaz comme le méthane ( $\text{CH}_4$ ) et le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) sont générés lors de la décomposition de la matière organique par des microorganismes actifs sous les conditions anaérobies de la fosse à lisier (Cole *et al.*, 1999 ; Santé Canada, 1999). Ce sont des gaz à effet de serre, responsables des changements climatiques et l'effet du méthane sur le réchauffement de la planète est 23 fois plus élevé que le dioxyde de carbone ("Intergovernmental Panel on Climate Change" (IPCC), 1990; IPCC, 2001). De plus, la méthanisation incomplète forme des substances malodorantes comme des acides gras volatils et des composés soufrés, le sulfure d'hydrogène par exemple (Santé Canada, 1999). Ce dernier peut causer des dommages au système nerveux sensoriel et peut mener à l'asphyxie. Aussi, les odeurs associées à la production animale semblent avoir un effet néfaste sur la qualité de vie des résidents qui habitent les régions fortement agricoles. Des recherches ont établi un lien entre la génération d'odeurs par les installations de la production animale et la dégradation de la santé mentale de cette population (Schiffman

1995). Pampalon et Légaré (1997) ont démontré qu'il y a une corrélation entre l'augmentation significative des cas de dépression de 20.6% à 34.3% dans les municipalités fortement touchées par l'exploitation porcine et les moments dans l'année où l'épandage a lieu. Pour les travailleurs, les substances chimiques et les particules en suspension, comme les acides gras volatils, les gaz toxiques, les toxines microbiennes, sont responsables de troubles respiratoires (irritations, difficulté à respirer), de bronchites, de sinusites chroniques ou d'asphyxie. Ils peuvent aussi développer des irritations aux yeux, à la gorge, être atteints de nausées, de vomissements, de diarrhée et de fièvre, toutes des conséquences de la médiocrité de l'air à l'intérieur des installations (Schiffman, 1998; Rylander *et al.*, 1989; Cole *et al.*, 1999). Un autre danger potentiel pour la santé des travailleurs qui doivent manipuler le lisier de porc est la présence de microorganismes dans l'air des bâtiments et dans le lisier lui-même. Ces microorganismes peuvent être la cause de bronchites chroniques, d'asthme professionnel, d'allergies, de zoonoses, de maladies entériques et autres. Les habitants des zones fortement agricoles sont sujet aux épidémies de maladies entériques. Le ruissellement et la percolation du lisier de porc, et des microorganismes pathogènes qu'il contient, vers les eaux de consommation et récréatives sont les principales causes de ces épidémies. Le Tableau 1 résume les différents agents causals de ces maladies.

## **1.2. Survol des technologies de traitement du lisier de porc**

La recherche doit se tourner vers le développement de technologies qui permettent la transformation ou la modification du contenu des déjections animales en une forme qui pourrait être utilisée comme fertilisant "sécuritaire" pour l'environnement ou additionnée, en tant que nutriment, à la nourriture pour animaux d'élevages (Coffey, 1999). Certains traitements ont été particulièrement utilisés pour des résidus domestiques ou industriels mais ils peuvent potentiellement s'appliquer aux déchets d'origine agricole.

### **1.2.1. Modification de l'alimentation des animaux d'élevages agricoles**

Une amélioration peut d'abord être apportée au régime alimentaire du bétail. Pour ce faire, il est important de connaître les exigences nutritionnelles des animaux selon leur

**Tableau 1. Microorganismes et maladies reliés à l'exposition de particules ou à la contamination par le lisier de porc (Hooda et al., 2000; Cole et al., 1999; Santé Canada, 1999)**

Microorganismes	Troubles et Maladies	Cible	Particularité
<b>Bactéries</b>			
- <i>Acinetobacter calcoaticus</i> - <i>Flavobacterium</i> sp. - <i>Pseudomonas</i> sp. - <i>Serratia marcescens</i> → Endotoxine	Problèmes respiratoires Bronchite chronique Asthme professionnel	Travailleurs	
- <i>Yersinia enterocolitica</i> - <i>Salmonella</i> sp. - <i>Campylobacter</i> sp. - <i>Escherichia coli</i> (O157: H7) - <i>Leptospira</i> sp.	Infections entériques (diarrhée, nausée, vomissement)  Leptospirose	Travailleurs Population	<i>Y. enterocolitica</i> peut être relié à une fréquence accrue de pseudo-appendicites  <i>E. coli</i> , Syndrome hémolytique urémique (SHU)  Symptômes semblables à ceux de la grippe, méningite, anémie, hémorragie
- <i>Streptococcus suis</i>	Systémie sévère	Travailleurs	Méningite, pneumonie, endocardite, arthrite (rare)
<b>Moisissures</b>			
	Syndrome toxique d'exposition aux poussières organiques	Travailleurs	
- <i>Saccharospora rectivirgula</i> - <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Alvéolite allergique intrinsèque Maladies cutanées (zoonose érysipéloïde)		Maladie du poumon du fermier ( <i>S. rectivirgula</i> )
<b>Parasites</b>			
- <i>Cryptosporidium</i> sp.  - <i>Giardia</i>	Maladies entériques (diarrhée)	Travailleurs Population	Ookystes résistants à plusieurs désinfectants Stable dans l'environnement  Stable dans l'environnement

âge et de posséder les connaissances nécessaires sur les propriétés digestibles des acides aminés, la principale source d'azote et de phosphore dans la nourriture. Le remplacement d'un aliment difficile à digérer par un plus digestible est une façon simple de minimiser l'excrétion de nutriments. Un moyen de réduire la quantité d'azote non digérée et excrétée dans l'environnement est d'éviter l'apport excessif en protéines en diminuant les rations données à l'élevage. À ce moment, un supplément constitué de certains acides aminés essentiels doit être prévu puisque la lysine, la méthionine, la thréonine et le tryptophane pourraient se retrouver en concentration insuffisante dans les rations offertes pour assurer une bonne croissance des animaux. L'ajout de phytases au régime des bêtes permet de réduire le problème lié à l'excrétion du phosphore. Ces enzymes augmentent la disponibilité du phosphore des plantes en hydrolysant l'acide phytique en orthophosphate libre et en inositol, plus facilement absorbés par l'animal. L'ajout de phosphore inorganique à la nourriture pour assurer un développement plus rapide de l'animal n'est donc plus nécessaire. La quantité de phosphore rejeté dans l'environnement est du même coup diminuée (Jongbloed et Lenis, 1998; Coffey, 1999).

### **1.2.2. Traitements anaérobies**

Un système utilisé depuis longtemps aux États-Unis est le traitement et l'entreposage du lisier de porc dans des lagunes anaérobies. Sa principale fonction est la dégradation des composés organiques résiduels. Ces lagunes génèrent des volumes importants de biogaz (méthane) qui peut être récupéré et converti en énergie. Cependant, les systèmes de lagunage en conditions anaérobies ont la réputation de générer des odeurs désagréables. Un pré-traitement comme l'utilisation d'un digesteur anaérobie ou d'une séparation solide/liquide est souvent nécessaire afin d'éviter les surcharges des lagunes et la production d'odeurs (Vetter *et al.*, 1990). Une mauvaise gestion de ce type de système peut présenter certains risques pour l'environnement. Les débordements, les fissures peuvent provoquer le drainage du contenu des lagunes vers les cours d'eau. Leur contenu peut aussi atteindre la nappe phréatique par infiltration dans le sol suite à un bris ou à un défaut au fond de la lagune (Miner, 1999).

Le lisier de porc peut également être traité de manière efficace dans un réacteur biologique séquentiel (RBS) sous des conditions anaérobies psychrophiles (Massé *et al.*, 1996) ou mésophiles (Ng, 1989). Les systèmes ont la capacité de réduire le contenu en matière organique total de 85% ( Ng, 1989; Massé *et al.*, 1996). Les RBS anaérobies ont la caractéristique de produire des quantités importantes de biogaz de bonne qualité, qui peuvent éventuellement être utilisées comme énergie pour le chauffage des bâtiments de l'industrie (Ng, 1989; Massé *et al.*, 1996; Massé, 1999). Le traitement réduit les solides volatils, principaux agents responsables des émissions d'odeurs (Massé *et al.*, 1996). Les volumes de boues générées par ce procédé sont relativement faibles (LaPara et Alleman, 1999). La séparation solide-liquide ne nécessite aucun agent flocculant puisque les conditions physico-chimiques et microbiologiques nécessaires à la floculation "naturelle" sont idéales (Ng, 1989). Malgré ces avantages, Ng (1989) suggère un traitement secondaire suite au passage de la matière résiduelle dans le système anaérobique. Un traitement aérobie par exemple permettrait de diminuer les fortes concentrations d'ammoniaque avant le rejet de l'effluent dans l'environnement. De plus, les traitements anaérobies ont tendance à s'effectuer sur de longues périodes pouvant aller jusqu'à quelques semaines.

### **1.2.3. Traitements aérobies**

Plusieurs types de systèmes aérobies, ou incluant une étape aérobie, ont été étudiés. Certains ont voulu utiliser des algues comme flore active. C'est le cas de l'équipe de Chikh *et al.* (1997) qui ont travaillé sur un système de lagunes compartimentées et aérées, mis au point par de la Noüe *et al.* (1994) qui permet de recycler les nutriments du lisier de porc. Ils sont convertis sous différentes formes de biomasse selon l'étape du traitement, pour finir en nourriture pour les poissons (de la Noüe *et al.*, 1994). Le lisier de porc dilué alimente les bassins d'algues. Elles servent ensuite de source alimentaire pour les daphnies, une espèce de zooplancton qui, à leur tour, serviront de nourriture pour les poissons (de la Noüe *et al.*, 1994). L'équipe de Baumgarten (1999) a quant à elle tenté de traiter le lisier de porc seulement à partir d'algues ajoutées et de bactéries présentes dans le lisier. Dans ce système, ils ont observé que la réduction de  $\text{NH}_4$  et des composés organiques totaux n'était pas la responsabilité

des algues mais bien des bactéries (Baumgarten *et al.*, 1999). L'ajout d'algues s'est avéré alors plus ou moins utile.

Le procédé de traitement des matières résiduelles domestiques ou industrielles que l'on rencontre le plus souvent en condition aérobie est le système de boues activées. Ce sont de grands bassins ou de plus petites enceintes sur lesquelles est appliquée une très forte aération. Cette forte aération permet l'implantation et le développement d'une flore microbienne hétérotrophe non fixée qui est responsable de la dégradation de la matière organique (Atlas et Bartha, 1997). Pour que le système soit continuellement performant, une partie des boues est recirculée dans le bassin. Certaines équipes de recherche ont adapté le procédé de traitement par boues activées pour dégrader le lisier de porc. C'est le cas de l'équipe de Osada (1991) qui ont limité l'aération ou effectué des aérations intermittentes pour permettre l'enlèvement de l'azote et du phosphore. Les résultats ont été particulièrement intéressants avec l'aération intermittente où 71.5 à 98% de l'azote et 91% du phosphore étaient éliminés (Osada *et al.*, 1991). Le traitement de boues activées conventionnel, où la diminution de la DCO est similaire au système à aération intermittente (89.0 à 99.5%), atteint des taux d'enlèvement de l'azote variant entre 25.2 et 61.9% et du phosphore de 51.1% (Osada *et al.*, 1991). Il est toutefois à noter que le lisier utilisé lors de ces essais était de faible concentration. Un problème majeur relié au traitement par boues activées est le volume relativement important de boues générées. Elles doivent être soit enfouies, incinérées ou traitées. C'est entre autre pour diminuer la quantité de boues à rejeter que les unités de boues activées sont souvent couplées à des étapes de digestion aérobie, anaérobie, mésophile ou thermophile (Atlas et Bartha, 1997; Forster *et al.*, 2000)

D'autres procédés de traitement consistent en des biofiltres aérés, c'est-à-dire des réacteurs remplis de supports solides, souvent en plastiques, permettant à la population microbienne de s'y fixer et d'y proliférer. Cette technique augmente la concentration des microorganismes dans le réacteur et permet une oxydation plus importante de la matière organique, l'enlèvement de la DCO pouvant varier de 76 à 90% selon le "design" du système (Doyle *et al.*, 1986; Westerman *et al.*, 2000). Les populations microbiennes responsables de cette réduction sont chimio-hétérotrophes (Doyle *et al.*, 1986; Westerman, 2000). Même si il est possible de retrouver des bactéries qui possèdent une

activité nitrifiante dans certaines sections de ces bioréacteurs (Westerman *et al.*, 2000), ces procédés semblent rencontrer quelques problèmes pour l'élimination des nitrates et des nitrites. En effet, les zones anaérobies sont restreintes voir même absentes dans de tels systèmes, ce qui empêche l'implantation d'une population dénitrifiante stable, qui permettrait la transformation des nitrates et des nitrites en azote atmosphérique. Un système de deux biofiltres en série traitant un surnageant de lisier décanté a produit un effluent dont les concentrations en azote ammoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), en azote total (N) et en phosphore (P) étaient respectivement 82%, 49% et 26% moindre que l'affluent (Westerman *et al.*, 2000). Le phosphore retiré ainsi que 36% de l'azote total initial se retrouvaient dans l'eau de lavage qui, elle, représentait 29% du volume de l'affluent.

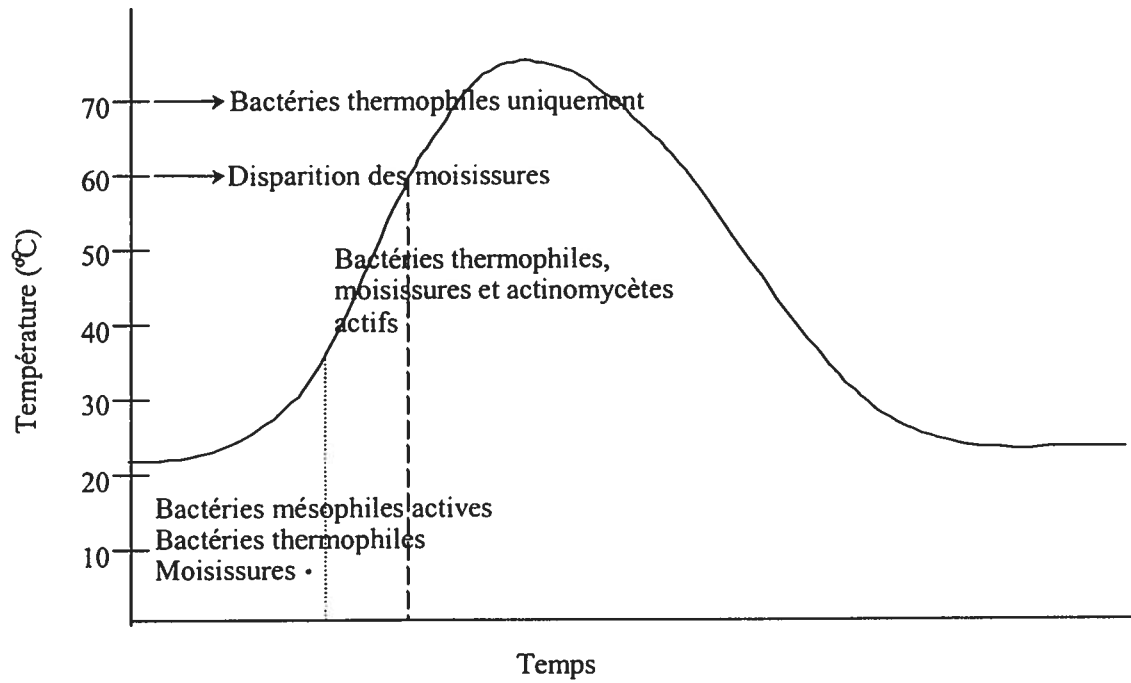
Le désavantage majeur des procédés en condition mésophile et/ou anaérobie est la durée du traitement qui est relativement longue. Plusieurs recherches se sont tournées vers les traitements à hautes températures. Les conditions nécessaires peuvent être atteintes en appliquant une source de chaleur externe ou le système peut être auto-chauffant. Un côté très intéressant des procédés ayant une étape thermophile est leur capacité à détruire les microorganismes pathogènes (Cheunbarn et Pagilla, 1999). Afin d'optimiser les rendements de dégradation, les chercheurs ont combiné différents types de réacteurs. Par exemple, Rintala et Lepistö (1993) et Jahren et Ødegaard (1999) ont fait l'essai d'un réacteur anaérobie couplé à un système aérobie pour le traitement d'eaux usées industrielles (pâtes et papier). Les deux réacteurs fonctionnaient à des températures élevées. L'enlèvement de la matière organique semblait efficace (Rintala et Lepistö, 1993; Jahren et Ødegaard, 1999) mais les acides gras volatils formés dans l'enceinte anaérobie n'étaient pas dégradés lors de l'étape aérobie (Jahren et Ødegaard, 1999). D'autres ont préféré combiner un réacteur aérobie thermophile à une enceinte anaérobie mésophile. La première étape thermophile permettait la destruction des pathogènes et l'obtention d'un effluent plus facilement dégradé par le traitement anaérobie mésophile (Cheunbarn et Pagilla, 1999). Le système anaérobie produit des biogaz qui peuvent être récupérés. La réduction de la matière organique du lisier de porc dans ce type de procédé en deux étapes était de 67% (DCO) pour un traitement d'une durée de quinze jours et le nombre de pathogènes avait diminué de cinq unités logarithmiques (Pagilla *et al.*, 2000).

La partie solide du lisier de porc peut être stabilisée par compostage. Le compostage est un procédé bio-oxydant où les composés organiques sont dégradés en dioxyde de carbone, en eau, en minéraux et en matière organique stable que l'on appelle compost (Choi, 1999; Zucconi et De Bertoldi, 1987). Mais au départ, le lisier de porc n'est pas un substrat adéquat pour être composté. Son ratio carbone/azote (C/N) est trop bas et son taux d'humidité, trop élevé. Pour pallier à ce problème, un amendement organique dont le ratio C/N est plus élevé et le taux d'humidité beaucoup plus bas, est ajouté afin d'équilibrer le substrat à traiter. Les valeurs idéales pour que le compostage s'opère efficacement se situent entre 25 et 30 pour le ratio C/N (Rynk, 1992) et entre 50 et 70% d'humidité (Polprasert, 1996).

Durant le compostage, une succession de différentes populations microbiennes se relaye tout au long de la réaction (Figure 1) pour finalement offrir un produit stable. Au départ, la température interne est en équilibre avec la température ambiante. Les bactéries thermophiles et les moisissures sont présentes mais, à ce stade, les réactions sont effectuées uniquement par les bactéries mésophiles. Plusieurs réactions biologiques sont exothermiques et on observe alors une montée de la température à l'intérieur de la pile à compost. La flore thermophile devient plus abondante et les actinomycètes deviennent plus actifs.

Lorsque la température atteint 60°C, les moisissures disparaissent. À 70°C, l'activité de dégradation est assurée seulement par les bactéries thermophiles. Lorsque la température a atteint un maximum, elle redescend et les différentes communautés microbiennes réapparaissent selon leurs zones de températures respectives (De Bertoldi *et al.*, 1980; Finstein et Morris, 1975). L'étape thermophile permet la destruction des microorganismes pathogènes présents dans le lisier de porc (Forshell, 1993). Toutefois, selon Droffner et Brinton (1995) il est nécessaire que la température ait atteint au moins 55°C pendant un minimum de onze jours afin d'obtenir l'élimination de bactéries comme *Escherichia coli* et *Salmonella Typhimurium*. Le compostage permet tout de même d'obtenir une source de matière organique stable, riche en minéraux, sécuritaire, qui peut être utilisée en horticulture.





**Figure 1. Évolution de groupes microbiens à l'intérieur d'une pile de compost lors de la stabilisation et l'hygiénisation d'un substrat solide. Les populations apparaissent ou s'atténuent dans le temps selon la température atteinte à l'intérieur de la pile.**

La partie liquide du lisier de porc peut aussi être traitée en condition aérobie thermophile. Ces procédés peuvent entre autre être auto-chauffants, ils génèrent peu de boues (LaPara et Alleman, 1999; Ginnivan *et al.*, 1981; Beaudet *et al.*, 1990; Stover et Samuel, 1997; Rozich et Stover, 1997) et la dégradation de la matière organique est plus rapide que dans les systèmes conventionnels mésophiles (LaPara et Alleman, 1999; Malladi et Ingham, 1993; Sonnleitner et Bomio, 1990; Zvauya *et al.*, 1994). Le traitement aérobie thermophile a été étudié et utilisé surtout pour des eaux usées domestiques et industrielles, où la DCO est relativement basse comparativement à celle du lisier de porc. La description des procédés aérobies thermophiles pour les rejets liquides est présentée à la partie 1.3.

### **1.3. Traitement aérobie thermophile**

Des recherches ont été effectuées sur des procédés opérant uniquement sous des conditions aérobies thermophiles et elles ont montré que ces derniers ont la capacité de stabiliser efficacement différentes matières. Ces systèmes combinent plusieurs des avantages reconnus pour les traitements anaérobiques et les systèmes mésophiles. La majorité des traitements thermophiles sont auto-chauffants grâce aux réactions métaboliques microbiennes. (Rozich *et al.*, 1992; Cheunbarn et Pagilla, 1999). Tout comme les procédés anaérobies, peu de boues, de biomasse ou de solides sont générés lors du traitement (LaPara et Alleman, 1999; Ginnivan *et al.*, 1981; Beaudet *et al.*, 1990; Stover et Samuel, 1997; Rozich et Stover, 1997). Le traitement des résidus est plus rapide que les systèmes conventionnels mésophiles (LaPara et Alleman, 1999; Malladi et Ingham, 1993; Sonnleitner et Bomio, 1990; Zvauya *et al.*, 1994) et il permet d'éliminer les microorganismes potentiellement pathogènes (Ginnivan *et al.*, 1981; Beaudet *et al.*, 1990; Burt *et al.*, 1990; Sonnleitner et Bomio, 1990; Zvayua *et al.*, 1994; Cheunbarn et Pagilla, 1999; LaPara et Alleman, 1999). La qualité du contenu fertilisant de l'effluent traité semble aussi plus intéressante que celle obtenue par traitement anaérobique (Sonnleitner et Bomio, 1990; Banat *et al.*, 2000). Pour d'autres, la composition protéique d'un effluent partiellement traité dans des conditions thermophiles pourrait servir de

supplément nutritionnel pour les animaux d'élevages agricoles (Ginnivan *et al.*, 1981; Gariépy *et al.*, 1989).

Un cas en particulier de procédé thermophile est le système ATAD, qui signifie "Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion". La base du traitement est semblable au compostage mais s'effectue à partir de résidus liquides (USEPA, 1990). Il a été reconnu comme un des systèmes de digestion de boues les plus performants et il est aujourd'hui utilisé dans plusieurs villes européennes et nord-américaines pour le traitement des boues d'eaux usées. L'ATAD peut se composer d'une ou de plusieurs étapes et il est auto-chauffant. Aucune source externe de chaleur n'est nécessaire. Elle provient de la dégradation microbienne du substrat. Le taux de dégradation de la matière organique obtenu suite à l'utilisation de l'ATAD est relativement élevé (40-45% d'enlèvement de la DCO, (USEPA, 1990)), il détruit efficacement les pathogènes et occupe peu d'espace. Théoriquement, ce système serait aussi apte à dégrader différents déchets provenant de fermes laitières, bovines et porcines (USEPA, 1990). Cependant, dans un rapport émis par Pilon *et al.* (1984), il a été démontré que le système ATAD n'est pas adapté pour la dégradation du lisier de porc. Suite à l'augmentation de température, une quantité importante de mousse était formée et elle faisait court-circuiter les différents appareils électriques. De plus, les gaz sortant du système n'étaient pas récupérés ce qui entraînait le dégagement d'odeurs (Pilon *et al.*, 1984). Des équipes ont par la suite adapté les caractéristiques du système ATAD afin d'obtenir un traitement efficace de matière résiduelle fortement chargée en matière organique comme les boues d'abattoirs (Couillard *et al.*, 1989; Gariépy *et al.*, 1989), le lisier de porc (Ginnivan *et al.*, 1981; Beudet *et al.*, 1990), les lixiviats provenant de déchets dangereux (Rozich *et al.*, 1992) ou les eaux usées d'usines de transformation alimentaire (Malladi et Ingham, 1993). Malgré ces travaux, encore peu d'informations sont disponibles sur les procédés aérobies thermophiles et particulièrement pour le traitement du lisier de porc. Ce manque de connaissances se ressent autant du côté de l'ingénierie qu'au niveau microbiologique.

### 1.3.1. Ingénierie

Le métabolisme des microorganismes présents dans le bioréacteur thermophile est responsable de l'élévation et du maintien des hautes températures chez les systèmes auto-chauffants. C'est d'abord lors de l'oxydation de la matière organique par les microorganismes mésophiles qu'une partie de l'énergie produite est dissipée sous forme de chaleur (Cheunbarn et Pagilla, 1999; Ponti *et al.*, 1995a; Burt *et al.*, 1990; LaPara et Alleman, 1999). Leur activité métabolique est réduite, voir perdue aux profits des bactéries thermophiles suite à l'augmentation des températures. À leur tour, elles génèrent de la chaleur selon le même mécanisme et maintiennent ainsi les conditions thermophiles du bioréacteur (LaPara et Alleman, 1999). Selon Ponti *et al.* (1995b), cette chaleur produite microbiologiquement est proportionnelle à la consommation d'oxygène des microorganismes.

Pour que le système soit auto-chauffant, une quantité minimale de substrat carboné est nécessaire (Banat *et al.*, 2000; Stover et Samuel, 1997; Kelly *et al.*, 1992). D'après Banat *et al.* (2000) la valeur minimale de la demande chimique en oxygène (DCO)<sup>2</sup> à enlever doit se situer entre 20 000 et 25 000 mg/L. De plus, les pertes de chaleur du bioréacteur doivent être limitées au maximum. L'air sortant du bioréacteur représente la perte de chaleur la plus importante du système. Lorsque le substrat à traiter est fortement chargé, comme le lisier de porc, il engendre une forte demande en oxygène, nécessaire pour satisfaire la demande des bactéries du système (Rozich et Colvin, 1997; Stover et Samuel, 1997). D'autant plus que cette demande en oxygène est 14% plus élevée que celle des traitements aérobies conventionnels (LaPara et Alleman, 1999; Ponti *et al.*, 1995b). L'aération doit donc être très intense. Afin de minimiser les pertes de chaleur, tout en offrant le maximum d'oxygène pour le bon fonctionnement du traitement, il est primordial de posséder un équipement d'aération ayant une haute efficacité de transfert c'est-à-dire d'injecter moins d'air pour une quantité donnée d'oxygène transféré. Les aérateurs de type "Venturi" possèdent cette caractéristique (Ponti *et al.*, 1995a; Burt *et al.*, 1990). L'aérateur "Venturi" est constitué d'une restriction dans la conduite qui

---

<sup>2</sup>**Demande chimique en oxygène (DCO)** : moyen de mesurer la quantité de carbone organique total dans un échantillon. Elle est déterminée en mesurant la quantité d'agent oxydant (dichromate) nécessaire à l'oxydation de la matière organique présente dans un échantillon

permet la recirculation du liquide. Cette restriction crée une pression négative au niveau de l'entrée d'air et aspire l'air à grande vitesse à l'intérieur du système. Un autre moyen de minimiser les pertes de chaleur est de réchauffer l'air entrant dans le système avec la chaleur de l'air sortant du bioréacteur qui peut en partie être récupérée par un échangeur de chaleur. Ceci est habituellement utilisé lorsque la charge organique du substrat à traiter est insuffisante pour permettre le maintien des hautes températures par "auto-chauffage" (Banat *et al.*, 2000). Dans les cas où de fortes charges organiques sont traitées, un échangeur de chaleur peut être utilisé pour extraire cette chaleur et l'utiliser à d'autres fins comme le chauffage de bâtiments ou la production d'eau chaude.

Finalement, l'agitation fournie par une pompe couplée à l'aérateur Venturi joue un rôle particulier. Elle permet un meilleur contact entre les molécules d'oxygène, les bactéries et avec la matière organique non dégradée (Kelly *et al.*, 1992; Burt *et al.*, 1990; Ponti *et al.*, 1995a) améliorant ainsi le taux de dégradation résultant du traitement en bioréacteur.

Pour éliminer l'azote et le phosphore, les traitements conventionnels utilisent plusieurs enceintes ou doivent passer par différentes étapes où les conditions d'aération varient. Ces étapes permettent à une succession de populations microbiennes nitrifiantes, dénitrifiantes et parfois même accumulatrices de phosphore d'effectuer leur transformation ou d'utiliser les différents composés azotés et phosphorés (Beaudet *et al.*, 1990; Rim et Han, 2000; Dae Sung Lee *et al.*, 2001). Cependant, les conditions rencontrées dans les systèmes de traitement aérobie thermophile ne permettent pas la croissance de ces populations microbiennes. Elles sont pourtant idéales pour la désorption de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). L'aération, le pH élevé (entre 8.0 et 8.5) et les hautes températures, permettent son élimination par volatilisation (Banat *et al.*, 2000; Beaudet *et al.*, 1990). L'ammoniac gazeux ainsi produit peut être récupéré par solubilisation dans une solution acide. Le sel d'ammonium obtenu pourrait éventuellement servir d'engrais.

La précipitation apparaît la méthode la plus appropriée pour se débarrasser du phosphore soluble de l'effluent en traitement. Le simple fait que le pH augmente au-dessus de 8 dans le lisier en traitement provoque la formation de struvite ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) et d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ ) (Zhu *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002) composés qui ont tendance à précipiter. Un agent chimique, comme le chlorure

de magnésium ( $MgCl_2$ ) peut optimiser la formation de struvite ( $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ ) et la précipitation du phosphore. Le struvite peut avoir un potentiel intéressant pour les sols déficients en phosphore (Burns *et al.*, 2001).

Suite à ces observations, une seule enceinte semble alors nécessaire lors de la dégradation du lisier de porc par un traitement aérobic thermophile et aucun changement au niveau des conditions n'est nécessaire pour effectuer l'enlèvement des différentes composantes (Beaudet *et al.*, 1990).

L'utilisation de procédés opérant en conditions aérobies thermophiles a son lot de problèmes. Tout d'abord, ces procédés ont l'inconvénient de former beaucoup de mousse. Celle-ci cause des problèmes au niveau sanitaire lors de débordements et elle provoque parfois des bris mécaniques importants (Pilon 1984; LaPara et Alleman, 1999; Rozich et Colvin, 1997). La grande concentration de matière organique, de biomasse, de solides et la présence probable de microorganismes producteurs de biosurfactants, couplés à une forte aération, sont des causes possibles de la génération de mousse. L'ajout d'agents anti-moussants ou l'installation d'un briseur de mousse mécanique peut prévenir la production de mousse, sinon, la maintenir à des niveaux assez bas pour éviter les débordements (Rozich et Colvin, 1997).

Pour que la vitesse de dégradation des matières résiduelles soit optimale, il est nécessaire de recycler une partie de la biomasse active du lot précédent. Cependant, la flore thermophile n'a pas les caractéristiques microbiologiques pour permettre la formation de "bioflocs" qui permettraient une séparation efficace de la biomasse et de l'effluent à rejeter suite à une décantation (LaPara et Alleman, 1999). Certains ont utilisé des agents flocculants, comme l'alun, afin de provoquer la précipitation de la biomasse. D'autres ont couplé un système de microfiltration sur membrane ( $0.2 \mu m$  de porosité) à leur bioréacteur aérobic thermophile. Grâce à ce montage, 100% de la biomasse active est maintenue dans le bioréacteur (LaPara *et al.*, 2001).

## 1.3.2. Microbiologie

### 1.3.2.1. Destruction des pathogènes

Les traitements de résidus liquides en conditions aérobies thermophiles semblent efficaces pour l'hygiénisation de ces déjections. Tout d'abord, plusieurs chercheurs ont affirmé que les solides présents dans les substrats à traiter ont un effet protecteur sur les microorganismes (Ponti *et al.*, 1995b; Ugwuanyi *et al.*, 1995; Droffner et Brinton, 1995). Dans un traitement comme le compostage, on observe un temps de destruction des pathogènes assez long, pouvant s'étendre sur une semaine (Droffner et Brinton, 1995). Toutefois, Droffner et Brinton (1995) ont remarqué qu'une augmentation du taux d'humidité à l'intérieur de la pile de compost diminue le temps de d'élimination de pathogènes comme *Escherichia coli* et *Salmonella Typhimurium*. Dans un système aérobie thermophile liquide, cet effet protecteur est de beaucoup diminué, la concentration de solides étant beaucoup plus faible. De plus, les températures atteintes par le procédé ainsi que le pH et le temps de rétention du résidu seraient, selon plusieurs équipes de recherche, assez élevés pour détruire les microorganismes potentiellement pathogènes (Sonnleitner et Bomio, 1990; Burt *et al.*, 1990; Beaudet *et al.*, 1990; Cheunbarn et Pagilla, 1999; LaPara et Alleman, 1999; Ginnivan *et al.*, 1981; Zvauya *et al.*, 1994). Dans le Tableau 2 sont indiqués les températures, le pH et les temps qui ont été nécessaires à l'élimination de microorganismes pathogènes dans des systèmes aérobies thermophiles lors de différentes études. Pour plusieurs microorganismes, le pH et la température semblent jouer un rôle primordial sur leur inactivation (Böhm, 1984; Turner *et al.*, 1999; Ugwuanyi *et al.*, 1999), tandis que l'effet de compétition avec les autres organismes du système serait négligeable (Sonnleitner et Bomio, 1990). En résumé, un traitement de 55 à 60°C, à pH 8.0 et pendant 36 heures semble suffisant pour éliminer les microorganismes pathogènes sous le seuil de détection.

### 1.3.2.2. Microflore active

Lors du démarrage d'un traitement aérobie thermophile, ce sont d'abord les microorganismes mésophiles qui débutent le travail. La flore thermophile prend la relève dès que les conditions le permettent. À ce moment, elle dégrade activement les différents

**Tableau 2. Températures, pH et temps nécessaires à la destruction de différents microorganismes pathogènes dans des conditions aérobies thermophiles.**

Microorganismes	Températures (°C)	pH	Temps (min.)	Référence (substrat)
<b>Bactéries</b>				
<i>Escherichia coli</i>	65	7 ou 8	10	Ugwuanyi <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65		30	(synthétique, amidon)
<i>Enterococcus faecalis</i>	60		120	
<i>Serratia marcescens</i>	60	7	>720	
<i>Salmonella enteritidis</i>	55		1440	
<i>Campylobacter jejuni</i>	55	7	très rapide	
<b>Parasites</b>				
<i>Cryptosporidium parvum</i> (ookyste)	55		1440	Whitmore et Robertson, 1995 (boues épuration)
<b>Virus de la ...</b>				
Fièvre aphteuse	50	8	2880	Böhm, 1984
Pseudorage	40		3000	(lisier de porc)
Maladie vésiculaire du porc	40		2880	
Maladie vésiculaire du porc	60	8	5	Turner <i>et al.</i> , 1999 (lisier de porc)
Peste porcine africaine	60	8	5	



composés organiques. Les populations de cette flore thermophile sont dites hétérotrophes puisqu'elles utilisent la matière organique comme principale source de carbone et d'énergie (LaPara et Alleman, 1999).

Jusqu'à tout récemment, peu de travaux ont été effectués sur l'identification des microorganismes présents dans les bioprocédés aérobies thermophiles traitant les résidus liquides. Les études réalisées à l'aide des méthodes classiques d'isolement et de culture semblent indiquer la présence dominante du genre *Bacillus* (Tableau 3). Dans certains travaux est mentionné la présence du genre *Thermus* mais ce dernier tend à être sensible aux variations de substrat, surtout à fortes concentrations (LaPara et Alleman, 1999). Afin d'obtenir une croissance optimale des bactéries thermophiles en milieux de culture, l'équipe de Sürücü (1999) s'est penchée sur les éléments nécessaires à leur métabolisme. La méthionine par exemple, est un élément essentiel aux microorganismes thermophiles tandis que d'autres substances, comme la riboflavine, ont plutôt une action stimulante (Tableau 4).

Des recherches ont dernièrement été effectuées afin d'identifier ces microorganismes à l'aide des outils de biologie moléculaire. Plusieurs auteurs estiment à moins de 15% la flore microbienne cultivable en laboratoire provenant de l'environnement (Amann, 1995). Les techniques de biologie moléculaire permettent d'éviter de passer par l'étape de culture pour la caractérisation. L'analyse s'avère alors plus rapide, complète et précise. Des études intéressantes ont été réalisées avec la technique du PCR-DGGE ("Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis"). Le séquençage complet ou de fragments du gène de l'ARN ribosomal 16S (voir section 1.4) a été alors réalisé soit en parallèle à la technique (LaPara *et al.*, 2000c) ou à la suite du PCR-DGGE et visait alors des bandes (populations) bien précises (Kurusu *et al.*, 2002). Selon ces travaux, les microorganismes impliqués dans la dégradation de matières résiduelles sous des conditions aérobies thermophiles sont rassemblés dans trois grands groupes ou sous-classes. La majorité semble appartenir au groupe des bactéries Gram-positives à faible contenu en G+C. Plus précisément, lorsque le substrat à traiter consiste en des eaux usées synthétiques ou pharmaceutiques le genre

**Tableau 3. Microorganismes identifiés dans des systèmes de traitements aérobies thermophiles à l'aide des méthodes de microbiologie traditionnelle.**

Effluents traités	Microorganismes identifiés	Références
Boues d'eaux usées	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Sonnleitner et Bomio, 1990
Rejet d'usines de transformation de la pomme de terre	<i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>B. brevis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. acidodarduis</i> <i>Lactobacillus</i> Autres bâtonnets Gram +	Malladi et Ingham, 1993
Lisier de porc	<i>Bacillus spp.</i> <i>B. licheniformis</i>	Beudet et <i>al.</i> , 1990

**Tableau 4. Liste des éléments importants pour une croissance optimale des microorganismes thermophiles (Sürücü, 1999).**

Éléments Essentiels	Éléments Stimulants
Méthionine	Riboflavine
Magnésium (Mg)	Histidine
Calcium (Ca)	Thiamine
Fer (Fe)	

*Bacillus* est prédominant (LaPara *et al.*, 2000c; Kurisu *et al.*, 2002). Les espèces *B. licheniformis* et *B. thermocloacae* ont particulièrement été détectées dans un système traitant des eaux usées synthétiques, qui avait au départ été inoculé avec un échantillon de compost "semi-aérobie" (Kurusu *et al.*, 2002). Les autres microorganismes détectés dans le traitement thermophile d'eaux usées pharmaceutiques étaient apparentés au genre *Clostridium*, *Thermoanaerobacter* ou bien ont été regroupés dans la sous-classe des  $\beta$ -protéobactéries et dans le groupe des synergistes, principalement *Thermanaerovibrio* (LaPara *et al.*, 2000c).

Les bactéries nitrifiantes, les microorganismes impliqués dans la formation de "bioflocs", les actinomycètes ainsi que les protozoaires sont rares, voir même absents des systèmes thermophiles liquides (LaPara et Alleman, 1999). Par exemple, Ginnivan *et al.* (1981) ont tenté d'optimiser le traitement du lisier de porc en ajoutant à leur réacteur un actinomycète, *Thermomonospora fusca*. La capacité de cette bactérie à sécréter des enzymes aptes à digérer la cellulose contenue dans les déjections porcines rendait son utilisation intéressante. Pourtant, aucune amélioration du système n'a pu être observée suite à son inoculation dans le bioréacteur. La compétition avec les autres microorganismes et les conditions environnantes peu favorables au maintien de la croissance de l'actinomycète n'ont pas permis son implantation (Ginnivan *et al.*, 1981).

Le métabolisme des bactéries thermophiles est le principal agent responsable des activités de stabilisation de la matière résiduelle et est responsable de plusieurs avantages de ce procédé. Les microorganismes puisent dans le résidu les éléments essentiels à leur croissance et contribuent ainsi à l'enlèvement, la dégradation et la transformation des différentes substances indésirables de l'effluent. Par exemple, lorsque l'oxygène se retrouve en concentration suffisante, les lipides procurent aux bactéries le carbone et l'énergie nécessaire à leur croissance et leur maintien cellulaire, tandis que les protéines sont utilisées préférentiellement comme source d'azote (Ponti *et al.*, 1995a; Burt *et al.*, 1990). Cette flore a la particularité d'avoir une croissance rapide mais un rendement cellulaire faible, donc de produire peu de biomasse pour une quantité donnée de substrat. C'est que l'énergie, le carbone et les autres éléments utilisés servent presque

essentiellement à la maintenance cellulaire (LaPara *et al.*, 2000b; Sonnleitner et Bomio, 1990). La dégradation de la matière résiduelle est à son maximum pendant la phase exponentielle de la croissance microbienne. Pendant cette période, la flore thermophile sécrète une quantité importante de protéases dans son environnement (Sonnleitner et Bomio, 1990; Ponti *et al.*, 1995a). Ces enzymes semblent présentes en permanence dans les traitements aérobies thermophiles d'effluents municipaux et industriels (Sonnleitner et Bomio, 1990). Certaines expériences, effectuées à l'aide de milieux synthétiques imitant les caractéristiques des résidus fortement chargés (LaPara *et al.*, 2000) ou avec des résidus fortement chargés en polymères biodégradables (Malladi et Ingham, 1993), ont montré la présence d'autres enzymes. Dans ces milieux, des sources de carbone comme l' $\alpha$ -lactose et l'amidon étaient présentes en quantités importantes. L'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase et celle de l'amylase ont été détectées (Malladi et Ingham, 1993; LaPara *et al.*, 2000a). Sous des conditions optimales pour la flore microbienne, le système peut accepter des résidus dont la DCO est aussi élevée que 60 kg/m<sup>3</sup> sans affecter l'efficacité du processus de dégradation (Ponti *et al.*, 1995a). Les températures élevées favorisent la solubilité de composés organiques qui sont alors plus disponibles pour les microorganismes (Barr *et al.*, 1996). L'enlèvement de la DCO soluble peut atteindre 90% en trois jours, une vitesse de dégradation de trois à dix fois plus élevée que les systèmes mésophiles conventionnels (Ginnivan *et al.*, 1981; Couillard *et al.*, 1989; Beudet *et al.*, 1990; LaPara et Alleman, 1999). Des équipes ont démontré la facilité d'adaptation des bactéries thermophiles lors de l'ajout de composés organiques difficilement biodégradables, comme le 4-nonylphénol, ou d'effluents à hautes teneurs en sel (Sonnleitner et Bomio, 1990; Banat *et al.*, 1999; Rozich et Stover, 1997). Certains ont même mentionné que la flore thermophile, grâce à ses caractéristiques de croissance, résiste et s'adapte aisément à des changements marqués dans la composition du substrat à dégrader et aux variations des conditions d'opération (Rozich et Colvin, 1997; Ponti *et al.*, 1995a).

Cependant, les travaux de LaPara *et al.* (2000b) remettent en question certaines conclusions des travaux précédents. Lors d'essais sur un procédé où un apport continu de substrat était appliqué (système en continu), ils ont affirmé que les microorganismes thermophiles toléraient difficilement les changements trop importants de leur

environnement, comme des variations de la concentrations du substrat ou de la source de carbone. Une diminution de la vitesse de croissance, des activités métaboliques ou un changement marqué de la flore suite à l'établissement de conditions limitantes de nutriments (carbone, oxygène) ne permettraient pas aux microorganismes présents d'effectuer une dégradation efficace et rapide suite à un nouvel apport de substrat. Aussi, les habiletés métaboliques de la flore ne feraient que décliner lorsque leur environnement deviendrait de plus en plus thermophile (LaPara *et al.*, 2000b). En remettant ainsi en doute la rapidité du traitement et l'efficacité d'enlèvement de la DCO, l'équipe de LaPara (2000a,b) ainsi que celle de Jahren *et al.* (2002) ont considéré que les paramètres cinétiques d'un système thermophile en continu ne sont pas supérieurs aux traitements conventionnels mésophiles.

#### **1.4. Techniques de biologie moléculaire, appliquées à l'écologie microbienne**

Lors d'études de communautés microbiennes provenant de différents écosystèmes, seulement une fraction des bactéries s'est avérée cultivable en laboratoire. Le Tableau 5 indique les proportions dans lesquelles certaines populations peuvent être obtenues par culture. Il est probable que ces difficultés soient dues à l'interdépendance des différentes espèces de microorganismes les unes envers les autres ou simplement à un manque de connaissances sur les conditions et les éléments nécessaires aux bactéries pour proliférer (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer et Smalla, 1998). Une alternative intéressante a été l'utilisation de la biologie moléculaire afin d'apporter des informations additionnelles par rapport aux méthodes traditionnelles de microbiologie.

Ces techniques permettent entre autre l'identification et l'étude de la phylogénie des miroorganismes non cultivables en se basant sur les variations dans les ARN ribosomiaux (Muyzer *et al.*, 1993). Des techniques comme le "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) ou le "Single Strand Conformation Polymorphism" (SSCP) sont fréquemment utilisées lors de ce type d'études. La technique du RFLP consiste en l'analyse et la comparaison de patrons de bandes obtenus suite à la digestion de l'ADN ou de fragments d'ADN amplifiés par PCR (PCR-RFLP), par des enzymes de

**Tableau 5. Proportions des microorganismes cultivables en laboratoire provenant de l'environnement.** Le nombre de microorganismes déterminé par compte total des cellules au microscope est comparé avec le nombre déterminé par des techniques de biologie moléculaire (tiré de Amann *et al.*, 1995).

Provenance	Proportions cultivables (%)
Eau de mer	0.001 à 0.1
Eau douce	0.25
Lac "mésotrophique"	0.1 à 1
Eau d'estuaire marin non pollué	0.1 à 3
Boues activées	1 à 15
Sédiments	0.25
Sols	0.3

restriction. La distance entre les sites de restriction visés diffèrent d'un microorganisme à un autre et permet ainsi de les distinguer (Brown, 1995). Cette méthode nécessite l'utilisation de plusieurs enzymes de restriction permettant ainsi l'obtention d'informations valables et concluantes. Le SSCP permet de différencier les populations microbiennes selon la mobilité électrophorétique d'un fragment obtenu par amplification et dont le double brin a été dénaturé. Suite à la dénaturation des doubles brins, les simples brins prennent une structure repliée déterminée par les interactions intramoléculaires et par leur séquence en acides nucléiques. La substitution d'un seul nucléotide change la structure du simple brin et sa mobilité électrophorétique (Spinardi *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996). L'interprétation est particulière et difficile puisque parfois, une espèce bactérienne peut être représentée par trois bandes et plus, c'est-à-dire les deux brins simples, le double brin d'ADN non dénaturé et parfois la présence d'hétéroduplexes (Miller *et al.*, 1999). De plus, l'analyse des résultats obtenus avec ces méthodes peut être très laborieuse lors de l'observation de populations hétérogènes complexes.

L'utilisation du DGGE, "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" semble particulièrement intéressante lorsqu'il s'agit de l'analyse des communautés microbiennes. C'est en 1979 que Fischer et Lerman ont publié pour la première fois cette technique. Cependant, c'est dans les années 1990 que ce type d'analyse a commencé à être utilisé de manière régulière en écologie microbienne. La majeure partie de la description qui suit a été tirée du chapitre 7 du volume "PCR Technology, Principles and Applications for DNA amplification" rédigé par Myers *et al* (1989).

Le DGGE permet de séparer des fragments ou des molécules d'ADN qui possèdent des différences aussi minimales qu'une seule paire de bases et ce, indépendamment de leur longueur. Ici, la séparation se base sur les propriétés dénaturantes de l'ADN en solution, c'est-à-dire sa température de dissociation ( $T_m$ ). Un double brin d'ADN possède plusieurs domaines de dissociation et le  $T_m$  est directement dépendant de la séquence nucléotidique de ces domaines. La température n'est pas le seul élément qui a la possibilité de dénaturer une hélice d'ADN. Certains produits chimiques comme l'urée et le formamide ont aussi cette capacité.

Le DGGE est un gel de polyacrylamide composé d'un gradient linéaire d'agents dénaturants. Du haut vers le bas, la concentration des produits dénaturants augmente. Les fragments d'ADN migrent à l'intérieur de ce gel par électrophorèse. Lorsqu'un fragment d'ADN atteint la concentration de dénaturant correspondant au domaine dont le  $T_m$  est le plus faible, une partie de sa structure se déforme et retarde considérablement sa mobilité à travers le gel. C'est ainsi que des fragments, dont la séquence en acides nucléiques est différente, migrent plus ou moins loin dans le gel (Myers *et al.*, 1989; Muyzer *et al.*, 1993).

L'amplification de séquences d'intérêts par PCR ("Polymerase Chain Reaction"), comme la région hypervariable V3 du gène de l'ARN ribosomal 16S par exemple, permet, dans un premier temps, de limiter la longueur des fragments à observer sur DGGE, qui idéalement doit se situer entre 100 et 500 bp. De plus, elle permet d'insérer sur le fragment une séquence de 40 à 45 nucléotides, riches en guanines et en cytosines, à partir de l'extrémité 5' de l'une des deux amorces utilisées. Ce petit ajout, appelé pince GC, a un  $T_m$  plus élevé que le reste du fragment d'ADN amplifié. La pince GC permet une meilleure résolution des fragments sur DGGE puisque tous les domaines de dissociations peuvent être dénaturés, sans qu'il n'y ait dissociation complète des deux brins (Myers *et al.*, 1989; Muyzer *et al.*, 1993).

Le DGGE est très utile d'abord pour observer et analyser les variations et la distribution spatiale et temporelle des différentes communautés bactériennes que ce soit dans un environnement donné ou dans des systèmes de traitement (Sekiguchi *et al.*, 2001; Muyzer et Smalla, 1998). Il suffit d'effectuer une amplification sur un échantillon de populations microbiennes mixtes avant leur migration sur DGGE. Le patron de bandes obtenu est en fait un profil de la communauté présente (Muyzer *et al.*, 1993). De cette manière, il est possible d'avoir de l'information sur la complexité et la diversité génétique des communautés microbiennes, comme dans les biofilms et dans les milieux parfois complexes ou extrêmes. Les changements dans les populations suite à des variations marquées de leur environnement, telles que la source de carbone ou la température par exemple, sont facilement détectables (Muyzer et Smalla, 1998).

Des manipulations supplémentaires peuvent être effectuées suite au DGGE. Des groupes bien spécifiques de bactéries provenant de populations hétérogènes peuvent être



ciblés par hybridation à l'aide de sondes spécifiques à ces derniers. L'identification et l'étude phylogénique des espèces bactériennes présentes peuvent aussi se faire par excision, amplification et séquençage de certaines bandes. L'hybridation et l'excision de bandes sont impossible à réaliser suite à une analyse par SSCP due à la coloration et la fixation du nitrate d'argent (Hastings, 1998).

Des précautions sont à prendre lors de l'utilisation du DGGE. D'abord, il est possible d'éviter la formation d'hétéroduplexes sur DGGE en diminuant la concentration de la matrice d'ADN utilisée lors de l'amplification (Myers *et al.*, 1989). Les hétéroduplexes sont produits lors de l'amplification, suite à l'hybridation de deux produits de PCR différents. Le  $T_m$  des hétéroduplexes est plus bas que celui des homoduplexes dû aux mésappariements entre les deux brins (Myers *et al.*, 1989; Muyzer et Smalla, 1998). Ensuite, deux bandes qui migrent à la même position ne sont pas nécessairement de la même espèce ou du même genre (Muyzer *et al.*, 1993). Elles possèdent le même comportement de dénaturation mais peuvent ne pas être constituées de la même séquence. Ceci peut se vérifier suite au séquençage de chaque bande (Muyzer et Smalla, 1998). Dans un même ordre d'idée, une bande simple sur le gel peut ne pas représenter une seule espèce bactérienne. Des fragments différents dans un même échantillon peuvent co-migrer (Sekiguchi *et al.*, 2001). La migration des fragments sur un gel dont le gradient dénaturant est plus restreint peut permettre de séparer ces bandes. L'établissement d'une génothèque et le séquençage des clones est une alternative mais elle est beaucoup plus longue et fastidieuse (Muyzer, 1999; LaPara *et al.*, 2000c). Enfin, certaines populations sont rares et les amorces universelles peuvent ne pas convenir à leur amplification. Leur détection sur DGGE est alors pratiquement impossible. Trois options s'offrent pour pallier à ce problème. La première est de tenter une hybridation avec des sondes spécifiques à ces populations sur le DGGE. Deuxièmement, une amplification peut être effectuée à l'aide d'amorces spécifiques aux genres visés. Ces deux options nécessitent la connaissance de ces microorganismes pour l'élaboration de sondes et d'amorces et leur présence doit préalablement avoir été soupçonnée (Muyzer, 1999). Finalement, dans la séquence des amorces universelles, il y a des mésappariements qui reviennent fréquemment pour certaines positions et ont été observés chez différentes populations. Lorsque l'on change les nucléotides de ces sites par un

résidu inosine, il semble plus facile de détecter les populations rares qu'avec les amorces universelles conventionnelles (Watanabe *et al.*, 2001).

## **Chapitre 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **2.1. Le lisier de porc**

Le lisier de porc utilisé provient de la ferme d'engraissement de monsieur Marc Aubin qui est située à Prévost (Québec). Le nombre de porcs de l'élevage s'élève à 600. Le lisier a été prélevé dans la partie supérieure de la préfosse à l'aide d'une pompe submersible. Les déjections ont été tamisées grossièrement afin d'enlever les particules pouvant obstruer les différentes pompes du système thermophile. Le lisier a été conservé dans des barils de 206 litres à 4°C. Les caractéristiques du lisier utilisé lors des suivis microbiologiques sont présentées dans le Tableau 6. Il est à noter que plus d'un lot de lisier a été prélevé à la ferme lors de ce projet. De plus, un lot de lisier utilisé lors de six analyses a dû être centrifugé avant chaque entrée dans le bioréacteur puisque la quantité de solides présents nuisait au bon fonctionnement du système.

## **2.2. Le bioréacteur aérobique thermophile, échelle laboratoire**

Chaque bioréacteur est constitué d'une enceinte en polypropylène (Plastique Miller, Montréal, Qc.) de 33 cm de diamètre par 69 cm de hauteur (capacité maximale de 58 L). Les parois de ces enceintes ont été recouvertes d'une mousse isolante en polyuréthane, elle-même recouverte d'une membrane isolante aluminisée. Lors des traitements, les bioréacteurs contenaient entre 30 et 40 L d'un mélange de lisier et de biomasse active (liqueur mixte). La recirculation et l'agitation de ce mélange ont été assurées par une pompe centrifuge d'une puissance de 93 watts (modèle 5-MD-SC, Little Giant, Oklahoma City, OK). Cette dernière a été couplée à un aérateur Venturi (modèle 978, Mazzei Injector Co., Bakersfield, CA), afin d'obtenir une aération efficace. L'aération a été maintenue à 2.5 L/min pendant les cycles de traitement, dont la durée s'étendait de trois à quatre jours. À la fin de chaque cycle, 50% du volume de liquide était retiré et remplacé par du lisier frais. Les gaz s'échappant des bioréacteurs étaient d'abord aspirés vers une unité d'absorption de l'azote ammoniacal. Cet équipement permettait de récupérer l'ammoniac sous forme de sel d'ammonium grâce à une douche d'acide chlorhydrique (HCl) dilué. Les gaz résiduels étaient ensuite passés par un biofiltre composé de compost et de perlite. L'oxygène dissous dans le bioréacteur était mesuré en continu par des analyseurs modèle 4100 de Mettler-Toledo (Wilmington, MA)

**Tableau 6. Caractéristiques du lisier de porc utilisé lors des cycles de traitement ayant fait l'objet d'un suivi microbiologique.**

Caractéristiques <sup>1</sup>	Valeurs <sup>2</sup> (g/L)
<u>Lisier centrifugé</u>	
DCO <sup>3</sup> totale	13.76 ± 7.8
DCO soluble	12.98 ± 6.7
Azote ammoniacal	N.D. <sup>4</sup>
Solides en suspension (SS)	0.862 ± 1.6
Solides volatils en suspension (VSS)	0.537 ± 1.0
<u>Lisier brut</u>	
DCO totale	71.05 ± 11.55
DCO soluble	37.87 ± 7.59
Azote ammoniacal	3.83 ± 0.43
Solides en suspension (SS)	24.02 ± 4.86
Solides volatils en suspension (VSS)	17.87 ± 2.78

<sup>1</sup> Parmi les 13 cycles de traitement analysés, 6 utilisaient un lisier centrifugé (cycle A à F) puisque les solides présents étaient 7 utilisaient un lisier brut (cycle I à O).

<sup>2</sup> Moyennes et écarts types de différents lots de lisier utilisé

<sup>3</sup> DCO : Demande Chimique en Oxygène

<sup>4</sup> N.D. : donnée non disponible

munis de sondes InPro 6000. Les analyseurs d'oxygène dissous étaient reliés à un micro-ordinateur via un système d'enregistrement de données modèle OMK-TDA4 de Omega Engineering (Stamford, CT). Des thermocouples, également branchés sur le module OMK-TDA4, permettaient l'enregistrement en continu de la température. Lors du traitement, la température interne du réacteur pouvait passer de 30°C à des températures thermophiles variant selon les caractéristiques du lisier ajouté et ce, en moins de 24 heures. Cependant, pour la réalisation d'un essai sur la destruction des pathogènes, la température de l'un des bioréacteur avait été limitée à 50°C. Le pH quant à lui a été mesuré à chaque prélèvement d'échantillons et il variait entre 8.0 et 9.0. Un coupe mousse constitué d'une hélice en acier inoxydable, située au dessus de la phase liquide du bioréacteur et activée par un moteur placé sur le couvercle de l'enceinte, a été utilisé afin de maintenir la formation de mousse à un seuil minimum, pour éviter les débordements.

## **2.3. Analyses physico-chimiques**

### **2.3.1. Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)**

La DCO est une mesure indirecte de la quantité de carbone organique dans un environnement donné. Elle a été obtenue en mesurant la quantité d'agent oxydant, le dichromate, nécessaire à l'oxydation de la matière organique présente dans un échantillon (méthode 5260 D, APHA, AWWA et WEF, 1998). De façon plus précise, l'échantillon était mélangé à une solution acide de dichromate de potassium en présence d'un catalyseur, soit l'argent dans notre cas. Pendant les deux heures de digestion à 150°C, les composés organiques oxydables réduisent les ions dichromates ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , coloration orangée) en ions chromiques ( $\text{Cr}^{3+}$ ) ce qui rend la solution verdâtre. La réaction colorimétrique pouvait ainsi être lue au spectrophotomètre.

Les tubes de réactifs utilisés pour le dosage de la DCO étaient pour des échantillons dont les concentrations se situaient entre 0 et 1500 mg/L et entre 0 et 15 000 mg/L (Hach, Ames, IA ou Chemetrics, Calverton, VA). Pour chacune de ces séries, une courbe standard a été élaborée avant d'effectuer les analyses des échantillons. Une solution stock de phtalate de potassium (KHP) de 15 grammes par litre d'eau milli-Q (15000 mg/L) a d'abord été préparée. À partir de cette solution maîtresse, les deux courbes ont été réalisées, en préparant quelques dilutions. Dans les tubes de digestion de

la gamme de concentration de 0 à 1500 mg/L, 2 mL des échantillons standards ou inconnus y étaient déposés. Pour celui de la gamme de 0 à 15000 mg/L de DCO, un volume de 0.2 mL a été ajouté. Un blanc a été effectué en remplaçant l'échantillon par de l'eau milli-Q. Les tubes ont ensuite été chauffés à 150°C dans un réacteur à DCO (modèle 45600, Hach) pendant deux heures, afin de permettre une oxydation complète de la matière organique. Après refroidissement des tubes, une lecture a été prise, pour chaque échantillon, au spectrophotomètre (Pye Unicam SP6-550) à une longueur d'onde de 620 nm. Il a parfois été nécessaire de diluer les échantillons puisque leur concentration était plus élevée que la gamme de tubes de réactifs sélectionnée ou disponible. Idéalement, lors de la lecture au spectrophotomètre les densités optiques des échantillons devaient se situer entre 0.1 et 0.4.

### 2.3.2. Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH<sub>3</sub>)

Les méthodes 4500-NH<sub>3</sub>-B et C (APHA, AWWA et WEF, 1998) ont été utilisées. L'azote ammoniacal des échantillons était d'abord récupéré par distillation après que ces derniers aient été dilués dans de l'eau milli-Q (1:10), tamponnés avec un tampon borate (0.025N de borate de sodium) et que le pH ait été ajusté à 9.5. Le distillat était récupéré dans une solution d'indicateur (méthyle rouge 0.2%, bleu méthylène 0.2%) à l'acide borique 2% (violet) qui devenait vert au contact de l'azote ammoniacal (pH alcalin). Après avoir obtenu un volume total de 30 mL de distillat, l'azote ammoniacal était dosé par titration avec de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 0.05 N jusqu'au point de virage qui correspondait à la réapparition de la coloration violette. Encore une fois, un blanc avec de l'eau milli-Q a été effectué. Le volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilisé lors de la titration était incorporé dans la formule suivante:

$$\frac{(\text{Vol. H}_2\text{SO}_4 \text{ 0.05N échantillon} - \text{Vol. H}_2\text{SO}_4 \text{ 0.05N blanc}) \times 700 \times 2}{5 \text{ mL}} = [\text{N-NH}_3] \text{ mg/L}$$

où 700 est le facteur de standardisation de l'acide sulfurique (1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02N = 200 mg d'azote), la valeur 2 est le facteur de dilution de l'échantillon et le 5 mL est le volume total de l'échantillon dilué. Le volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05N qui est nécessaire pour le blanc est habituellement de 0.05 mL.

## **2.4. Optimisation des paramètres pour le PCR-DGGE**

### **2.4.1. Extraction de l'ADN génomique**

La technique utilisée pour l'extraction a été la lyse cellulaire par bris mécanique des membranes à l'aide d'un homogénéisateur ("beads beater" Retsch, Sybron/Brinkmann, Rexdale, ON). Les cellules ont été soumises à de fortes frictions avec des billes de verre sous une agitation de type va-et-vient très rapide. La méthode a tout de même dû être optimisée pour permettre la récupération d'une grande quantité d'ADN de bonne qualité, provenant de la majorité des différents microorganismes présents dans un échantillon environnemental mixte. Les différents paramètres étudiés sont présentés au Tableau 7. La qualité et la quantité d'ADN obtenue ainsi que le pourcentage de lyse et de viabilité cellulaire sont les critères que nous avons retenus pour déterminer les paramètres optimaux.

La qualité et la quantité d'ADN ont été observées suite à la migration des lysats à 80V pendant 20 minutes, sur un gel d'agarose 1% (p/v) de 10 cm de long (Difco, Detroit, MI). Les quantités d'ADN des différentes préparations ont été comparées entre elles et avec un marqueur. Le marqueur était constitué de l'ADN total du phage lambda (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ), dont la concentration est connue. Cependant, l'ADN total obtenu n'a pas été quantifié mais estimé visuellement. La présence d'une traînée dans les puits des extraits indique la dégradation de l'ADN et sa piètre qualité.

Le pourcentage de lyse cellulaire a été observé en microscopie à fluorescence suite à une coloration à l'acridine orange. Le colorant a la particularité de s'incorporer aux cellules vivantes uniquement. Trois approches ont été envisagées pour cette coloration. Dans un premier temps, l'échantillon a été dilué jusqu'à  $10^{-6}$ . Une solution d'acridine orange de 0.01% (p/v) a été mise en contact avec les échantillons fixés sur une lame à puits multiples (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH). Dans un deuxième temps, le colorant a été placé directement dans les tubes de dilution. Un petit volume du contenu de ces tubes a été fixé sur la lame. La troisième option a été la filtration des dilutions sur



**Tableau 7. Variation des paramètres pour l'optimisation de l'extraction de l'ADN génomique par bris mécanique.**

Paramètres observés	Variations apportées			
	EDTA	β-mercaptoéthanol		
Utilisation d'un inhibiteur de DNase				
Concentration d'EDTA (mM)	20	50	100	
Grosseur des billes de verre (mm)	0.17	0.45		
Quantité de billes de verre (g)	0.5	1	1.5	2
Volume de l'échantillon (μL)	250	500		
Volume de la solution d'extraction (μL) (500mM Tris·HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 10% SDS)	250	500		
Temps de lyse (min)	1	3	5	10

une membrane noire de 0.22  $\mu\text{m}$  de porosité (Isopore membrane filters, Millipore, Cork Irlande). L'acridine orange 0.01% (p/v) a été mis en contact avec les particules retenues sur le filtre et filtré à son tour. La membrane a été placée entre une lame et une lamelle qui ont par la suite été fixées l'une à l'autre avec du vernis à ongle. Toutes les lames ont été observées en microscopie à épifluorescence (Nikon Eclipse E800, Nikon, Japon) à 520 nm (excitation entre 450 et 490 nm). Ces procédures ont d'abord été réalisées sur l'échantillon intact et ensuite sur un échantillon lysé pour obtenir un pourcentage d'efficacité de lyse cellulaire. La viabilité cellulaire a été déterminée suite à l'ensemencement de différentes dilutions des échantillons, avant et après la lyse, sur un milieu R2A (BBL, Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD).

#### **2.4.2. Amplification des échantillons pour DGGE**

Trois paires d'amorces ont été utilisées pour l'amplification de la région hypervariable V3 du gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S): PRBA341F-GC et PRUN907R, PRBA341F-GC et PRUN515R ainsi que PRBA341F-GC et PRUN518R. L'information sur ces amorces est présentée dans le Tableau 8. L'amplification a été réalisée à l'aide de l'appareil "DNA Thermal Cycler" modèle 480 (Perkin Elmers, Norwalk). Les volumes de réactions étaient de 50  $\mu\text{L}$  total et ils résultaient du mélange de deux solutions. Une première solution comprenait les éléments suivants: 5 ng d'ADN d'un échantillon thermophile ou d'une souche bactérienne pure, 37.5 pmol de chaque amorce, 10  $\mu\text{mol}$  de chacun des désoxyribonucléotides triphosphates (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 2.5  $\mu\text{L}$  de tampon d'amplification 10X (100mM Tris·HCl pH 9.0, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500mM KCl) (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) et 0.75  $\mu\text{L}$  d'albumine de sérum bovin 50X (20 mg/mL) (Sigma Chemical CO. St.Louis, MO). Le volume de cette solution était complété à 25  $\mu\text{L}$  avec de l'eau milli-Q stérile. La deuxième solution comprenait 1.25 U de l'enzyme "Taq polymerase" (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) et 2.5 $\mu\text{L}$  de tampon d'amplification 10X. La solution était ensuite complétée par l'ajout de 25  $\mu\text{L}$  avec d'eau milli-Q stérile.

Différents programmes d'amplification ont été testés. Dans le premier programme utilisé, la température d'hybridation des amorces était de 50 ou 55°C, et le nombre de

**Tableau 8. Liste des amorces utilisées.**

Amorces	Séquences	Positions chez <i>E. coli</i>	Références
PRBA341f	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	341-357	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
PRUN907r	5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'	926-907	Straub et Buchholz-Cleven, 1998
PRUN515r	5'-TTACCGCGGCKGCTGGCAC-3'	533-515	
PRUN518r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	534-518	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
Pince GC	5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCG GGGCGGGGGCACGGGGGG-3'		Muyzer <i>et al.</i> , 1993
pA	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	8-27	Edwards <i>et al.</i> , 1989
pH	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	1541-1522	Edwards <i>et al.</i> , 1989

cycles effectués pour la réaction totale de 25 ou 30. L'amplification débutait avec la première solution (ADN, amorce, dNTPs) par un temps de dénaturation de l'ADN de 5 minutes à 99°C suivi d'un léger refroidissement à 80°C pour l'ajout du deuxième mélange ("Taq polymerase"). La température a ensuite été augmentée à 94°C pendant 5 minutes pour permettre la dénaturation de l'ADN, puis abaissée à 50 ou 55°C pour 5 minutes afin que les amorces s'hybrident sur les simples brins et enfin remontée pendant 2 minutes à 72°C pour l'élongation des brins. Les 25 ou 30 autres cycles d'amplification ont suivi le patron suivant: 94°C, 1 min.; 50 ou 55°C, 1min.; 72°C, 2 min. Finalement, 10 minutes à 72°C ont permis de terminer l'élongation. Les produits de PCR ont ensuite été observés sur gel d'agarose 1.5% (p/v) (80V, 60 minutes). Le second programme testé a été une amplification dite "Touch down" ("Touch down PCR"). Lors de cette amplification, le programme a été semblable au premier à l'exception de la température d'appariement des amorces. Elle a débuté à 65°C et à tous les deux cycles la température d'appariement était diminuée d'un degré pour finalement atteindre 55°C.

#### **2.4.3. Conditions idéales pour DGGE**

Avant de débiter les essais sur le suivi de la population bactérienne, une mise au point de la technique du DGGE a été réalisée. Les gels utilisés avaient une dimension de 16 cm de longueur par 16 cm de hauteur. Différentes épaisseurs de gels (0.75, 1 et 1.5 mm) ont été testées afin d'obtenir des gels faciles à manipuler. Ces gels sont constitués de polyacrylamide et afin d'obtenir la meilleure résolution des bandes, les concentrations de polyacrylamide suivantes ont été testées: 6, 8 et 12% (v/v). Les solutions de polyacrylamide étaient obtenues à partir d'une solution de 40% (p/v) d'acrylamide:bis (37.5:1) ("Acrylamide 99.9% Electrophoresis purity reagent"; "Bis-N,N'-Methylene-bis-acrylamide Electrophoresis reagent", Bio-Rad, Hercules, CA). Pour obtenir le gradient, le volume total de polyacrylamide nécessaire pour faire le gel était divisé en deux. La première partie contenait une faible concentration en dénaturant et la deuxième avait la concentration la plus élevée. Une concentration de dénaturant qui atteint 100% est constituée de 7 M d'urée ("Urea, Electrophoresis purity reagent", Bio-Rad) et de 40% (v/v) de formamide (SigmaUltra, Sigma Chemical CO) traité au moins deux heures avec

une résine déionisante (AG® 501-X8 20-50 mesh, "Molecular Biology Grade", Bio-Rad). Il a été nécessaire de déterminer dans quel intervalle de dénaturant se situaient nos échantillons. Pour ce faire, un gel ayant un gradient de 0 à 80% de dénaturant a été réalisé. Les solutions servant à l'élaboration du gel (basse et haute concentration en dénaturant) ont été désoxygénées dans une jarre mise sous vide, avec agitation, pendant 15 minutes. Cette étape était effectuée avant de couler chaque gel. Le gel était fabriqué de manière à obtenir un gradient dénaturant linéaire de haut en bas. Pour ce faire, différentes méthodes pour permettre l'élaboration du gradient linéaire de dénaturant ont été testées: 1) utilisation d'un appareil pour la formation de gradient, modèle 475 fourni avec l'équipement du DGGE ("D-Code™ Universal Mutation Detection System", Bio-Rad), 2) formation du gradient à l'aide d'une pompe péristaltique (MasterFlex, Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, IL) ayant un débit de 5 mL/min et muni d'une chambre double pour la formation de gradient en chromatographie (modèle 385, "Gradient Former", Bio-Rad), 3) essai avec cette même chambre double mais avec l'aide de la gravité pour l'écoulement des solutions. Aussi, la pertinence d'ajouter un gel d'empilement a été vérifiée. Ce dernier était formé d'une solution de polyacrylamide de même concentration que le gel principal, mais sans les agents dénaturants. Un voltage plus bas était appliqué lors de la migration des échantillons dans le gel d'empilement pour ensuite être augmenté au voltage de la migration (entre 80 et 100V). Suite à l'insertion du peigne pour la formation des puits dans le gel, ce dernier polymérisait pendant deux heures à la température ambiante.

Dans la cuve à électrophorèse, environ sept litres de tampon TAE 1X étaient réchauffés à 60°C, température à laquelle la migration s'effectuait. Lorsque le gel était polymérisé et ses puits nettoyés avec du TAE 1X, il était placé sur le support de migration pour ensuite être équilibré pendant une heure dans le tampon à 60°C.

Les échantillons étaient déposés dans les puits avec un tampon de chargement. La quantité d'ADN utilisée était la même pour tous les échantillons, la comparaison étant ainsi facilitée. Cette quantité variait selon la concentration obtenue des produits de PCR mais habituellement se situait entre 300 et 600 ng. Un marqueur de référence était aussi placé dans l'un des puits (voir section 2.5.1). Il était ainsi possible de vérifier si la migration avait bien fonctionné et de comparer les résultats obtenus d'un gel à l'autre.

Les puits des extrémités du gel n'étaient pas utilisés puisque le gradient y était moins bien formé et le champ magnétique produit à ces endroits risquait de déformer les bandes. Des essais ont été effectués afin de connaître l'intensité du voltage (80V, 100V, 130V et 150V) et le temps de migration des échantillons nécessaires pour obtenir des gels de bonne résolution. Pour la variation du temps de migration, le test a été effectué sur un seul gel. À chaque heure, un échantillon était déposé dans un puits (différent pour chaque heure) et ce pendant dix heures suivant le début de la migration. Les dix échantillons déposés sur le gel étaient tous de la même origine, permettant ainsi une meilleure comparaison entre les différents temps de migration. La migration s'est ensuite poursuivie pendant encore 8 heures. Les gels étaient colorés au bromure d'éthidium (10 minutes) et décolorés avec de l'eau milli-Q (15 minutes). Par la suite, ils étaient exposés au UV sur un transilluminateur de type "GelDoc" modèle 1000 de Bio-Rad.

## **2.5. Suivi de l'évolution de la flore microbienne sur DGGE lors du traitement aérobic thermophile du lisier de porc**

### **2.5.1. Élaboration d'un marqueur de référence pour le DGGE**

#### **2.5.1.1. Culture des souches**

Les souches bactériennes du Tableau 9 ont étéensemencées sur milieu TSA (Difco; la composition et la méthode de préparation de tous les milieux de culture et de confirmation sont décrites à l'appendice I) de manière à obtenir une culture confluyente après incubation à 37°C pendant 24 heures. Les bactéries ont été récupérées en resuspendant la culture dans du tampon phosphate salin (PBS) 0.2 M pH 7.0 (40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.85% NaCl).

#### **2.5.1.2. Extraction de l'ADN génomique**

Pour l'extraction de l'ADN total des souches bactériennes pures, les billes de verre utilisées avaient un diamètre variant entre 0.17 et 0.18 mm (B. Braun Biotech International, Allemagne) et avaient été stérilisées. Des volumes égaux de 500µL de l'échantillon et de la solution d'extraction (500 mM Tris·HCl pH 8.0; 100 mM NaCl; 10% (p/v) SDS; 100 mM EDTA) ont été déposés dans un tube de 1.5 mL fermé hermétiquement où environ 1g de billes de verre ont été placées. Les cellules ont été brisées à l'aide d'un

homogénéisateur modèle MM2 (Retsch GmbH & Co., Haan, Allemagne) à vitesse maximale pendant cinq minutes à la température ambiante (20 à 25°C). Les surnageants ont été récupérés et la purification de l'ADN génomique a été effectuée par extraction au phénol:chloroforme:isoamyl (25:24:1) et chloroforme:isoamyl (24:1). L'ADN a été précipité avec 0.3 volume d'acétate d'ammonium 10 M et 2 volumes d'éthanol 95% (v/v) et placé à -20°C pendant 30 minutes. L'ADN a ensuite été récupéré par centrifugation et resuspendu dans une solution de TE (10 mM Tris·HCl pH 8.0, 1 mM d'EDTA pH 8.0) dilué 1/10. L'ADN a été vérifié sur un gel d'agarose 1% (p/v) (80V pendant 30 minutes), coloré au bromure d'éthidium, observé et photographié sur un transilluminateur UV (GelDoc 1000, Bio-Rad). Il a par la suite été conservé à -20°C. Pour la souche de *Streptomyces coelicolor* M145 et la souche 6, l'ADN génomique purifié était déjà disponible. L'une des caractéristiques génomiques des souches utilisées, soit le pourcentage G+C, est aussi présentée dans le Tableau 9.

#### **2.5.1.3. Quantification de l'ADN génomique**

Les produits d'ADN génomique ont été quantifiés à l'aide du logiciel "Molecular Analyst" (Bio-Rad). Différents volumes d'une solution d'ADN du phage Lambda de 25 ng/ $\mu$ L (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) ont été placés sur le même gel d'agarose afin d'effectuer une comparaison entre les produits extraits et la solution standard (ADN du phage Lambda). Le logiciel calcule l'intensité des bandes sélectionnées et, par la suite, les données fournies ont été traitées à l'aide du logiciel *Microsoft Excel*.

#### **2.5.1.4. Amplification d'un fragment de la région hypervariable V3 des souches pures connues**

Le cocktail des réactifs de PCR a été sensiblement le même que celui décrit à la section 2.4.2. sauf pour la matrice d'ADN. Pour une première réaction, nous avons ajouté 5 ng d'un mélange des ADN des souches pures et pour les autres, 5 ng d'ADN de l'une des souches pures étaient incorporés dans des tubes différents. Pour les réactions d'amplification contenant de l'ADN de *S. coelicolor* M145, 1  $\mu$ L d'une solution de 5% (v/v) Tween 20 et 8  $\mu$ L de propionamide 50% (p/v) ont été ajoutés. Le premier

**Tableau 9. Description des souches bactériennes utilisées pour l'élaboration d'un marqueur de référence pour le DGGE.**

Souches bactériennes	ATCC	% G+C <sup>a</sup>	Culture	ADN disponible
<i>Escherichia coli</i>	25922	54.6	✓	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	51.5	✓	
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	51.5	✓	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	51.0	✓	
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	(1)	59.2		✓
Souche 6	(2)	53.2		✓

<sup>a</sup> % G+C du fragment généré lors de l'amplification, région hypervariable V3 de l'ADNr 16S

(1) Laboratoire Dr F. Shareck

(2) Laboratoire Dr J-G. Bisailon



programme décrit à la section 2.4.2. a été utilisé avec une température d'hybridation des amorces à 55°C et 30 cycles d'amplification ont été réalisés.

Les produits de PCR ont été quantifiés avec les mêmes logiciels qu'à la section 2.5.1.3. Cependant, le marqueur standard utilisé a été le "EZ Load Precision Molecular Mass Standard" (Bio-Rad).

#### **2.5.1.5. Obtention du marqueur de référence pour DGGE**

Pour élaborer le marqueur de référence, la même quantité, en nanogramme, des produits de PCR de chaque souche a été mélangée. Les deux essais avec les marqueurs, c'est-à-dire celui dont l'ADN génomique a été mélangé avant l'amplification et celui dont les amplicons ont été mélangés à la suite du PCR, ont été comparés sur DGGE. Afin de permettre la correspondance des bandes du marqueur avec leurs souches respectives, l'ADN de ces dernières a été ajouté séparément sur le DGGE.

#### **2.5.2. Traitement des échantillons provenant du bioréacteur aérobique thermophile par PCR-DGGE**

Les échantillons ont été recueillis à différents temps pendant les cycles de dégradation. Un échantillon de lisier brut et un échantillon de liqueur mixte présente dans le bioréacteur (temps zéro, t<sub>0</sub>) ont été recueillis au départ de chaque cycle. Idéalement, un prélèvement a été effectué à chaque fois que la température du lisier en traitement montait d'environ 10°C. Ils ont ensuite été placés à -20°C jusqu'à ce que tous les échantillons du cycle aient été recueillis. Un volume moyen de 5 mL était prélevé pour chaque échantillon. Lorsque tous les échantillons d'un cycle ont été recueillis, ces derniers ont été traités pour finalement être observés sur DGGE. Pour l'un des cycles, les prélèvements ont été effectués plus fréquemment afin d'observer les moindres variations de la population microbienne. Pour ce suivi, le premier échantillon a été prélevé au temps zéro. Le second a été recueilli après une augmentation de température de 10°C. À partir de ce prélèvement, les autres échantillons ont été recueillis à toutes les deux heures pendant environ 20 heures. Puis, les derniers échantillons ont ensuite été recueillis à toutes les 24 heures jusqu'à la fin du cycle.

### **2.5.2.1. Extraction d'ADN génomique des échantillons**

La méthode d'extraction et de purification de l'ADN génomique a été la même que celle décrite à la partie 2.5.1.2. Seul le temps de lyse a changé. Il a été plus long, soit de dix minutes pour s'assurer que tous les microorganismes, qui possèdent différents types de parois et de membranes cellulaires, soient lysés.

### **2.5.2.2. Amplification de fragments d'ADN génomique**

L'amplification de la région hypervariable V3 de l'ADNr 16S a été effectuée comme à la section 2.5.1.4. à l'exception du nombre de cycles qui a été diminué à 25. Cette modification a été effectuée afin de minimiser le risque de la formation d'hétéroduplexes car ces derniers pourraient être pris pour une population microbienne distincte sur DGGE (Myers *et al.*, 1989). La quantification des produits de PCR a été identique à celle effectuée à la section 2.5.1.4.

### **2.5.2.3. Migration des échantillons sur DGGE**

L'ADN des échantillons recueillis était déposé sur des gels de 8% (v/v) de polyacrylamide à partir d'une solution à 40% (p/v) d'acrylamide:bis (37.5:1) dont l'épaisseur était de 1.5 mm. L'intervalle de dénaturant dans laquelle se situaient les échantillons et qui permettait une meilleure résolution se situait entre 30 et 70% (produit croisé entre la distance limite des bandes et les concentrations du gel). Les suivis ont donc été effectués avec cette plage de gradient. La chambre double formatrice de gradient par gravité a été la méthode utilisée afin d'obtenir le gradient linéaire. L'électrophorèse s'est effectuée à 100 V pendant 16 heures.

## **2.6. Caractérisation de la flore microbienne présente dans le bioréacteur aérobie thermophile traitant le lisier de porc**

Suite à des résultats obtenus lors d'un suivi très serré de l'évolution des populations microbiennes dans le traitement (prélèvement à toutes les deux heures), un échantillon représentatif (t17, 61°C, 17 heures de traitement) de la majorité des

communautés présentes a été sélectionné. À partir de cet échantillon de référence, une génothèque (bibliothèques de clones) a été élaborée.

## **2.6.1. Élaboration de la librairie de clones**

### **2.6.1.1. Amplification du gène de l'ARN ribosomal 16S**

À partir de l'ADN génomique de l'échantillon sélectionné (t17) extrait tel que décrit à la section 2.5.2.1., une amplification du gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) a été réalisée. La concentration des réactifs ainsi que les conditions d'amplification étaient les mêmes que celles décrites à la section 2.5.2.2. Cependant, les amorces utilisées étaient pA et pH (Tableau 8) et elles visaient le début et la fin du gène d'intérêt (ARNr 16S).

### **2.6.1.2. Purification et concentration des amplicons**

Les produits de réactions de PCR qui ont été faits à partir de la même matrice d'ADN étaient regroupés dans le même tube. Les amplicons étaient purifiés et concentrés par précipitation en complétant le volume à 200 µL avec de l'eau milli-Q stérile, en ajoutant 50 µL d'acétate d'ammonium 10 M et deux volumes d'éthanol 95% (v/v) (500 µL). Le mélange était placé à -80°C pendant quinze minutes et centrifugé. Finalement, le culot était resuspendu dans de l'eau milli-Q stérile.

### **2.6.1.3. Ligation et transformation**

Les produits de PCR ainsi purifiés et concentrés ont été ligués dans le vecteur "pGEM®-T Easy" (Promega, Madison, WI) qui contient un site multiple de clonage, l'opéron *lacZ*, et un gène de résistance à l'ampicilline (Figure 2). La ligation a été assurée par la ligase du phage T4 à raison de 3 unités par réaction de ligation. Idéalement, le ratio insert:vecteur doit être de 2:1. Cependant, lors de l'élaboration de la génothèque, ce ratio n'a pas été respecté. Un volume de 7 µL des produits de PCR a été ajouté au cocktail des réactifs de la ligation, sans tenir compte de la concentration des amplicons. À ce mélange était ajouté 5 µL de tampon 2X (60 mM Tris·HCl pH 7.8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 2 mM ATP et 10% polyéthylène glycol) fourni avec la ligase T4, pour un volume total de 10 µL. Le mélange était incubé toute la nuit à 4°C.

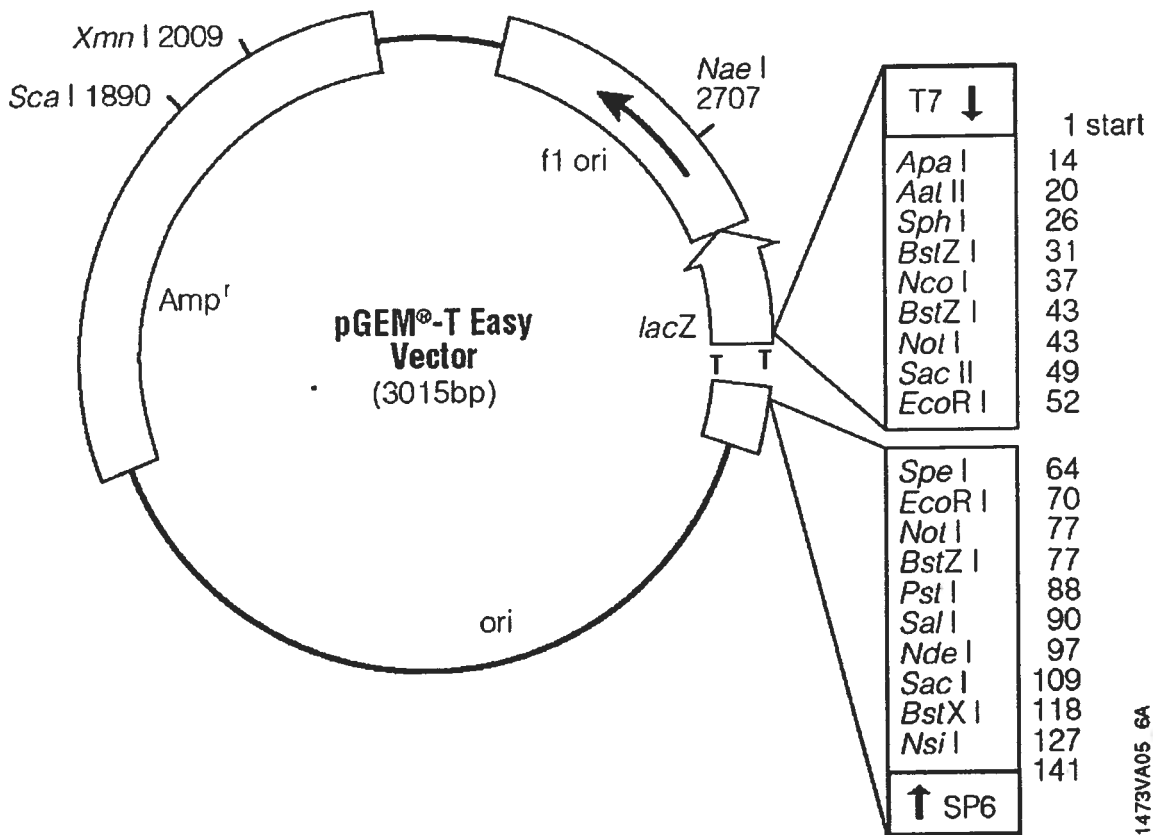


Figure 2. Carte circulaire du vecteur "pGEM®-T Easy" (Promega, Madison, WI)

Suite à la ligation, 100µL de cellules compétentes d'*Escherichia coli* DH5α (entre 10<sup>6</sup> et 10<sup>8</sup> UFC/mL) ont été transformées par choc thermique, pour être ensuite régénérées dans 400µL de milieu SOC à 37°C. Entre 50 et 100 µL de cette préculture a été étalée sur des boîtes de Pétri de milieu SOB agar avec 100 µg/mL d'ampicilline (ICN Biomedicals Inc.), 40 µg/mL de X-gal (Ultrapure, Gibco-BRL, Life technologies Inc. New York) et 119 µg/mL d'IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Boehringer Mannheim, Allemagne). Les boîtes étaient incubées 18 à 24 heures à 37°C. Les colonies blanches et une bleue, qui a servi de témoin négatif à la ligation de l'insert, ont été repiquées dans 3 mL de bouillon SOB avec ampicilline 1X. Les tubes étaient incubés à 37°C pendant 24 heures. Un aliquot de 1 mL de chaque culture a été transféré dans un tube de 1.5 mL. Le reste des cultures était conservé à 4°C jusqu'à ce que les clones intéressants aient été déterminés.

#### ***2.6.1.4. Extraction d'ADN plasmidique des clones***

Les cellules ont été lysées sous forte agitation (vortex pendant 15 secondes) dans une solution de phénol:chloroforme:isoamyl (25:24:1) et l'ADN plasmidique était purifié avec la même solution. Les tubes étaient centrifugés pendant 5 minutes à la vitesse maximale et 200 µL de la solution aqueuse étaient récupérés. L'ADN plasmidique de cette solution était ensuite précipité avec 50 µL d'acétate d'ammonium 10 M et 500 µL d'éthanol 95% (v/v). Suite à la centrifugation et au retrait du surnageant, le culot était resuspendu dans du TE pH 8.0 (10 mM Tris·HCl pH 8.0, 1 mM d'EDTA pH 8.0) dilué 1/10 et additionné de 10 µg/mL de RNase A. L'ADN plasmidique des clones était vérifié sur un gel d'agarose 1% (p/v) (80 V pendant 1 hr; coloration au bromure d'éthidium 15 min., décoloration 20 min.). Suite à l'observation du gel au transilluminateur, 200 µL des cultures de clones qui possédaient le bon insert (environ 1.5 kb de plus que le témoin négatif) ont été conservés à -80°C dans 10% (v/v) de glycérol.

## **2.6.2. Criblage de la librairie de clones par PCR-DGGE et étude phylogénique**

### **2.6.2.1. Amplification de la région hypervariable V3 de l'ADNr 16S des clones de la génothèque**

Les amorces utilisées lors de cette amplification étaient les mêmes que celles employées pour le suivi de la population microbienne du bioréacteur aérobie thermophile sur DGGE, c'est-à-dire PRBA341F-GC et PRUN518R. Le programme de l'amplification était le même que celui décrit à la section 2.5.2.2

### **2.6.2.2. Criblage des clones obtenus sur DGGE**

À cette étape, le DGGE a servi d'outil de criblage pour déterminer la correspondance des clones avec les bandes de l'échantillon mixte de référence d'où provient la banque de clones. Le gel a été formé de la même manière que celui effectué à la section 2.5.2.3., avec un intervalle de gradient de dénaturant de 30 à 70%. Les amplicons de chaque clone ont été placés dans un puits indépendant des autres clones. Certains puits comprenaient l'échantillon de référence t17 (2 à 3 puits). L'électrophorèse a été réalisée à 100V pendant 16 heures.

### **2.6.2.3. Séquençage des clones d'intérêts**

Suite au rassemblement des clones dans des groupes correspondants aux différentes bandes de l'échantillon de référence, un clone de chaque groupe a été retenu pour le séquençage de l'ADNr 16S. Le séquençage a été réalisé par la compagnie "DNALandMark Inc." (Saint-Jean-sur-Richelieu, QC) à partir d'un échantillon de la culture dans le glycérol ou d'une colonie isolée suite à un étalement sur gélose et de l'amorce pA (Edwards *et al.*, 1989). Les séquences obtenues ont été comparées à l'aide des bases de données informatiques disponibles à partir des programmes "FASTA3" ("European Bioinformatiques Institute", <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) et "BLASTN" ("National Center for Biotechnology Information", <http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Les séquences ont été analysées dans le programme "CHECK\_CHIMERA" ("Ribosomal Database Projet II", <http://rdp.cme.msu.edu/html>) afin de vérifier si les fragments obtenus lors de l'amplification étaient des chimères. Finalement, des analyses de raréfaction et de

Chaos ont été réalisées à partir du logiciel "BiodiversityPro" (<http://www.sams.ac.uk/dml/projets/benthic/bdpro/>).

#### **2.6.2.4. Étude phylogénique**

L'étude phylogénique des différents clones provenant du bioréacteur a été effectuée à partir des données obtenues à la section 2.6.2.3. Le logiciel BioEdit 5.0.9.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) a permis d'aligner les séquences à l'aide du programme CLUSTALW 1.4 (Thompson *et al.*, 1994). Les différentes analyses statistiques et l'élaboration des arbres phylogéniques ont été réalisées à partir des outils informatiques fournis dans l'ensemble Phylip 3.5 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Dans cet ensemble, le programme "DNAdist" permet d'évaluer les distances entre les espèces en comparant leur séquences en acides nucléiques, selon les paramètres de Kimura-2 (Jin et Nei, 1990). Par la suite, le programme "Fitch" estime la phylogénie par l'élaboration de la table des distances en s'assurant que la distance estimée précédemment correspond à la sommation de la longueur des branches entre les espèces. Les alignements de séquences sont ensuite réarrangés ("bootstrap") dans le programme "Seqboot" et une multitude d'arbres sont produits à partir de ces réarrangements. Lors de nos analyses, 1000 "bootstrap" (réarrangements de séquences) ont été effectués. Finalement, à partir de tous les arbres élaborés par "Seqboot", le programme "Consense" détermine les arbres majoritaires et établi un arbre consensus. Les arbres ont par la suite été redessinés et ajustés dans le logiciel CorelDraw (version 8, Corel Corporation, Ottawa, ON).

### **2.6.3. Microorganismes cultivables**

#### **2.6.3.1. Sélection des milieux de cultures**

Une première série d'expérience a été faite pour déterminer quels milieux étaient le plus appropriés pour la croissance des microorganismes thermophiles. Des dilutions séquentielles ont été effectuées sur un échantillon de biomasse du bioréacteur dans du tampon phosphate salin pH 8.0, 0.02 M (8.5 g/L NaCl). Pour chaque dilution, 0.1 mL a été inoculé sur les milieux suivants: agar trypticase de soya (TSA)(Difco), R2A (BBL, Becton Dickinson and Company), gélose cœur-cervelle (BHI agar)(Difco), gélose sang

Columbia (BBL, Becton Dickinson and Company) et gélose lisier 50%. La gélose lisier 50% (v/v) était constituée de lisier traité pendant 24 heures, centrifugé à 18 500 xg (2 fois, 30 minutes), et dilué avec de l'eau milli-Q. De plus, 1.5% (p/v) d'agar a été ajouté et le tout a été stérilisé à l'autoclave pendant 30 à 40 minutes à 121°C. L'incubation des milieux solides s'est effectuée à la température à laquelle a été prélevé l'échantillon, et ce, pendant 24 à 48 heures. Le dénombrement bactérien a été effectué à partir de la dilution qui, lorsque inoculée sur la gélose, générait entre 30 et 300 colonies.

#### ***2.6.3.2. Isolement de bactéries cultivables à 40 et 60°C***

Les échantillons prélevés à des températures de 40 et de 60°C provenaient du cycle où un suivi serré de l'évolution de la population microbienne a été effectué (section 2.4.2.). Les prélèvements ont été effectués à ces températures afin de comparer la flore cultivable à une température mésophile et à une température thermophile. Les échantillons ont été conservés à 4°C pour un maximum de 24 heures. Ils ont ensuite été dilués jusqu'à  $10^{-6}$  et 0.1 mL de chaque dilution était étalé sur les milieux sélectionnés à l'étape précédente (2.6.3.1), soit sur gélose sang Columbia (BBL) et sur gélose lisier 50%. Les boîtes de Pétri étaient incubées à la même température que celle de l'échantillon lors du prélèvement et ce, pendant 24 à 48 heures. Les décomptes bactériens ont été effectués à partir des boîtes de Pétri où 30 et 300 colonies étaient visibles.

Toutes les colonies qui semblaient différentes sur la base de leur morphologie coloniale (forme, couleur, texture, grosseur, etc.) ont été prélevées et repiquées sur leurs milieux respectifs de manière à obtenir des colonies isolées. L'incubation a été effectuée à leur température de provenance pendant 24 à 72 heures, afin de s'assurer qu'il y ait croissance. Chaque colonie a été observée au microscope photonique (Laborlux D, Ernst Leitz Wetzlar, Allemagne) et les cellules ont été décrites d'après leur morphologie. Le repiquage s'est effectué jusqu'à l'obtention d'une culture bactérienne pure. Lorsque les différentes colonies obtenues ont été purifiées, elles ont de nouveau été inoculées sur leur milieu de culture respectif mais de manière à obtenir une croissance confluite. De plus, elles ont été ensemencées dans un bouillon lisier 50% (v/v) pour celles provenant des géloses lisier 50% et dans un bouillon Trypticase de soya (TSB, Difco) pour celles isolées sur gélose sang Columbia. Les bouillons ont été incubés sous forte agitation, soit



entre 250 et 300 rpm. Cependant, il a été impossible d'obtenir une culture en milieu liquide. C'est pourquoi, après l'incubation des boîtes de Pétri, les bactéries ont été resuspendues à même la gélose avec 2 mL de tampon phosphate salin pH 8.0, 0.02 M (8.5 g/L NaCl). Une partie de la suspension (1 mL) a été récupérée dans un tube de plastique et du glycérol stérile (FisherBiotech, FisherScientific, Fair Lawn, NJ) a été ajouté pour une concentration finale de 10% (v/v). Ces tubes ont été conservés à -80°C. Le reste de la suspension a été utilisé pour l'extraction de l'ADN génomique. Un repiquage à partir des cultures congelées a été réalisé pour vérifier les souches qui sont apte à repousser et pour confirmer et compléter leur description microscopique.

#### ***2.6.3.3. Extraction et amplification de l'ADN génomique des souches bactériennes isolées à 40 et 60°C***

L'extraction s'est effectuée exactement comme celle décrite à la section 2.5.2.1. Les échantillons qui n'atteignaient pas le volume nécessaire de 500 µL ont été complétés avec du tampon phosphate salin pH 8.0, 0.02 M. Les réactifs et les conditions d'amplification ont été les mêmes que ceux décrits à la section 2.5.2.2.

#### ***2.6.3.4. Correspondance des différentes souches cultivables, purifiées à 40 et 60°C, avec l'échantillon de référence (section 2.6.) par DGGE***

La formation du DGGE et les conditions d'électrophorèse ont été identiques à celles décrites à la section 2.5.2.3. Les amplicons de chaque souche pure cultivable ont été placés indépendamment les uns des autres dans les puits du gel. Le marqueur et l'échantillon de référence ont aussi été ajoutés dans d'autres puits. La présence de l'échantillon de référence a donné un indice sur l'identité de la souche et a permis de regrouper les différents isolats.

#### ***2.6.3.5. Clonage des souches cultivables, purifiées à 40 et 60°C***

Suite à la correspondance des souches sur DGGE et à leur regroupement, un représentant par groupe a été cloné. Afin d'éviter les ambiguïtés lors du séquençage, les souches où plus d'une bande ont été observées ont été mises de côté et n'ont pas été

séquencées. L'amplification de l'ADNr 16S s'est effectuée de la même façon que celle décrite à la section 2.6.1.1.

Pour la purification des amplicons, tout le produit de PCR des souches sélectionnées a été placé sur un gel d'agarose préparatif (grand puit) de 1% (p/v). L'électrophorèse a été réalisée pendant une heure à 80V. Les bandes ont été excisées et les produits de PCR ont été récupérés et purifiés à l'aide de l'ensemble commercial QIAEXII, Gel extraction kit (Qiagen, Allemagne).

Les amplicons des souches cultivables ont été ligués et transformés selon la procédure décrite à la section 2.5.1.3. et l'extraction de l'ADN plasmidique des clones a été effectuée comme à la section 2.5.1.4. Afin de s'assurer que l'insert est bien de la longueur attendue, l'ADN plasmidique a été digéré avec l'enzyme de restriction *EcoRI*.

Les clones ont ensuite été repiqués sur milieu SOB agar de manière à obtenir des colonies isolées et le travail de séquençage a été effectué par la compagnie "DNA LandMark Inc." (Saint-Jean-sur-Richelieu, QC). Les séquences ont été comparées à partir des bases de données électroniques décrites à la section 2.6.2.3. pour ensuite être incluses à l'étude phylogénique réalisée à la section 2.6.2.4.

#### **2.6.4. Confirmation de l'identité de clones et de souches cultivables par "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP)**

Suite au séquençage d'un membre des clones (A6) et d'une souche cultivable (60L2) appartenant tous deux au groupe 12 selon leur position sur le DGGE, les résultats obtenus pour les deux candidats n'étaient pas les mêmes. Puisque deux espèces différentes semblent composer le groupe 12, une confirmation de l'identité des membres de ce groupe (clones et souches cultivables) a été effectuée par digestion avec des enzymes de restrictions. Tout d'abord, une amplification du gène de l'ADNr 16S a été réalisée sur les clones et les souches cultivables du groupe 12 selon la procédure décrite à la section 2.6.2.1. Une évaluation de la carte de restriction des séquences de l'ADNr 16S du clone A6 et de la souche cultivable 60L2 ont permis de sélectionner les enzymes de restrictions, soit *HhaI* et *DdeI*. La digestion a eu lieu pendant deux heures et les produits de la digestion ont été placés sur un gel d'agarose 2% (p/v). L'électrophorèse s'est déroulée pendant 1 hre à 90 V.

## **2.7. Vérification de la destruction des microorganismes indicateurs et pathogènes**

Pour tous les tests, un échantillon a été prélevé à partir du lisier brut entrant dans le système avant le démarrage d'un cycle et un deuxième a été récupéré dans l'effluent sortant, à la fin du traitement de trois jours. Puisque les deux bioréacteurs utilisés au moment de ces essais ne suivaient pas le même patron de température, l'un étant limité à 50°C, l'autre ayant libre cours aux variations de températures (peut atteindre jusqu'à 75°C), un échantillon de l'effluent sortant de chaque enceinte a été recueilli. Ces échantillons ont été conservés au plus 24 heures à 4°C avant d'être analysés. Après chaque analyse, le nombre de microorganismes déterminés dans les effluents traités ont été comparés avec celui obtenu dans le lisier brut pour évaluer le taux de destruction de ces microorganismes potentiellement pathogènes.

### **2.7.1. Détection des coliformes fécaux**

Les étapes qui suivent pour la détection des coliformes fécaux ont été réalisées selon le protocole établi par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (2000). Une dilution séquentielle a été réalisée sur chaque échantillon d'après le nombre de coliformes fécaux soupçonné. Sur une rampe de filtration équipée de membranes en nitrocellulose de 0.2 µm de porosité (Supor® 200, 47mm, Gelman, Pall Life Science, Ann Arbor, MI ), 10 mL de chaque dilution y ont été filtrés. Les membranes ont été déposées sur des géloses m-FC (Difco) de 69 mm de diamètre. Les milieux étaient ensuite incubés dans un bain-marie à 44.5°C (température sélective pour les coliformes fécaux) pendant 24 heures. Le dénombrement a été effectué à partir des membranes où l'on retrouvait entre 20 et 60 colonies typiques aux coliformes fécaux, c'est-à-dire bleues pâles à bleues foncées. La formule suivante permet de déterminer le nombre présumé de coliformes fécaux dans l'échantillon:

$$\text{UFC/100mL} = \frac{\text{Nb de colonies de coliformes fécaux}}{\text{Vol. d'échantillon analysé en mL} \times \text{facteur de dilution}} \times 100$$

Par la suite, 10% des colonies typiques obtenues ont été inoculées sur des géloses inclinées d'infusion cœur-cerveille (BHI) (Difco) et incubées à 35°C, température permettant une croissance plus importante, et ce pendant 24 heures. À partir de ces propagations, les tests de confirmation suivants ont été réalisés: test d'oxydase (Difco), hydrolyse de l'ONPG (Réactif de Colilert®, IDEXX, Christophe technologies) et métabolisation du 4-méthylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) (Réactif de Colilert®, IDEXX, Christophe technologies). Afin de confirmer le nombre de coliformes fécaux dénombrés préalablement, les résultats présomptifs et ceux de la confirmation ont été insérés dans la formule suivante:

$$\% \text{ de confirmation} = \frac{\text{Nb de colonies confirmées}}{\text{Nb de colonies testées}} \times 100$$

### 2.7.2. Détection de *Clostridium perfringens*

Pour la détection du microorganisme thermotolérant *Clostridium perfringens*, la méthode a été tirée du document "Bacteriological Analytical Manual" de la "Food and Drugs Administration" (FDA, 1998) mais a été légèrement modifiée. Tout d'abord, les échantillons ont subi une dilution séquentielle dans de l'eau peptonée 0.1% (p/v) stérile. Ensuite, 1 mL de chaque dilution a été déposé dans environ 20 mL de milieux gélosés Tryptose-Sulfite-Cyclosérine fondu (TSC). Lorsque les milieux ont solidifié, l'incubation s'est effectuée dans une jarre anaérobie. Une enveloppe capable de générer une atmosphère constituée de H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> (BBL GasPak® Anaerobic System, Becton Dickenson, Cockeysville, MD) a été placée dans la jarre. Le catalyseur utilisé a préalablement été régénéré au four Pasteur. Les boîtes de Pétri ont été placées dans la jarre et incubées à 35°C pendant 24 heures. Les boîtes retenues pour le décompte bactérien possédaient entre 30 et 300 colonies noires. Afin de confirmer que les colonies appartenaient bien à l'espèce *Clostridium perfringens*, 10% des colonies ont été ensemencées dans les milieux de confirmation pour la réduction des nitrates et la mobilité (Nitrate-mobilité) ainsi que pour la fermentation du lactose et la production de gélatinase (Lactose-gélatine). Ces deux séries de tubes ont été incubées à 35°C pendant 24 heures. La confirmation a été complétée en effectuant des galeries API 20A (bioMérieux, Lyon, France) sur des colonies noires qui avaient préalablement été repiquées sur gélose sang

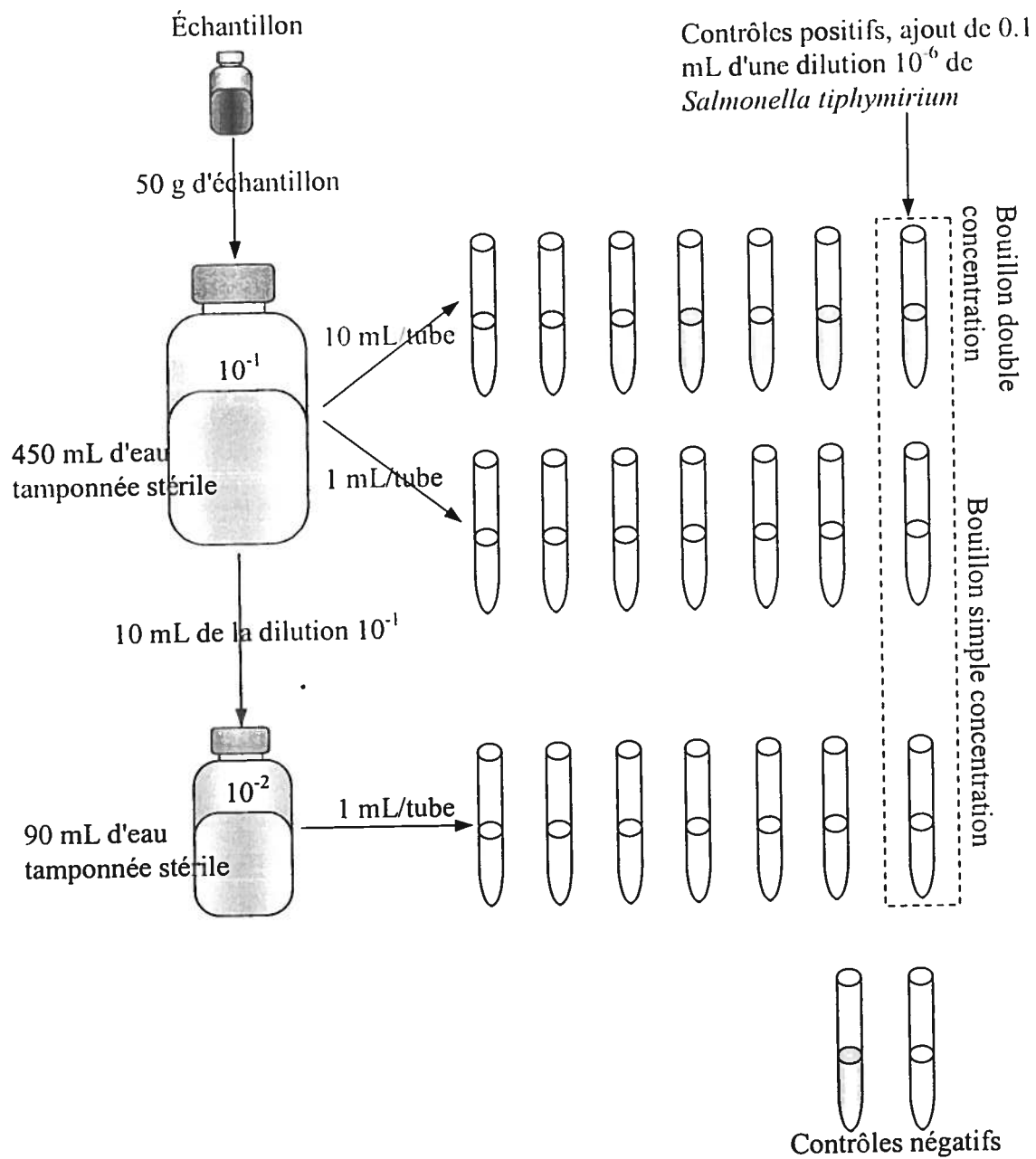
Columbia (BBL, Becton Dickinson and Company) ou sur gélose sang TSA II (BBL, Becton Dickinson and Company). L'incubation a été effectuée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les milieux TSC.

### **2.7.3. Détection de *Campylobacter* spp.**

Les techniques utilisées pour la détection de *Campylobacter* spp. proviennent en partie du "Center for Food Safety & Applied Nutrition" de la FDA (1998) et ont été modifiées selon des communications personnelles avec l'Institut de Recherche et Développement en Agroenvironnement (IRDA) et le département de microbiologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. *Campylobacter* spp. nécessite un environnement et un milieu particulier pour croître. Tout d'abord, aucun enrichissement n'a été effectué. Le milieu utilisé a été une gélose Charcoal-Cefoperazone-Désoxycholate-Agar (CCDA Preston modifié) qui était constituée d'un milieu de base pour *Campylobacter* exempt de sang (Oxoid, Larmshire, Angleterre) et du supplément pour CCDA (Amphotéricine B et Cefoperazone, Oxoid). Sur les boîtes de Pétri, 0.1 mL des échantillons non dilués a été inoculé par étalement. Les boîtes ont été placées dans une jarre hermétique dans laquelle était déposée une enveloppe génératrice de gaz (BBL CampyPak, Microaerophilic System, Becton Dickinson) créant des conditions microaérophiles (5% O<sub>2</sub>; 10% CO<sub>2</sub>; 85% N<sub>2</sub>). La jarre était incubée à 40°C pendant 48 heures. Après avoir repiqué une colonie apparentée à *Campylobacter* spp. sur une gélose sang Columbia ou TSA II (BBL, Becton Dickinson and Company) et l'avoir incubée en condition microaérophile à 40°C pour 24 heures, les tests d'oxydase et de catalase ont été réalisés sur des colonies isolées.

### **2.7.4. Détection de *Salmonella* spp.**

Pour dénombrer le genre *Salmonella*, la technique du nombre le plus probable (NPP), qui consiste en un enrichissement sélectif, a été utilisée selon le protocole décrit par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (2000). Le milieu était un bouillon Sélénite Dulcitol (SD) dont une première série de tubes était de double concentration (2X) et les deux autres de simple concentration (1X). La Figure 3 illustre de quelle manière ont été effectuées les dilutions et indique les volumes nécessaires pour



**Figure 3. Patron et répartition des dilutions pour la détection et le dénombrement de *Salmonella* spp. selon la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). Le milieu utilisé est un bouillon sélectif pour le genre *Salmonella*, Bouillon Sélénite-Dulcitol. Le contrôle négatif se compose d'un tube de bouillon double et d'un simple concentration, sans inoculum.**

l'ensemencement des bouillons. Les trois séries de tubes, les témoins positifs et les témoins négatifs ont été incubés à 40°C pendant 24 heures. Par la suite, une anse de fil à boucle de chaque tube a été ensemencée sur gélose XLT4, un milieu sélectif pour les *Salmonella* (excepté *Salmonella typhi*). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies de *Salmonella* se reconnaissent sur XLT4 par leur couleur noire, jaune avec un centre noir ou rose avec ou sans centre noir. Afin de confirmer l'authenticité d'une colonie soupçonnée, un test d'oxydase était d'abord effectué et ensuite la colonie était propagée sur gélose MacConkey pour observer la fermentation du lactose. Des milieux sélectifs pour des microorganismes autres que *Salmonella*, pouvant potentiellement croître sur le milieu XLT4, ont été utilisés pour confirmer leur présence. C'est le cas pour les *Pseudomonas* qui peuvent facilement être reconnus lorsque l'on utilise une gélose Pseudosel (BBL) et *Escherichia coli* qui se reconnaît par son reflet vert métallique sur milieu EMB (BBL). Par la suite, une galerie API 20E (bioMérieux) a été réalisée. Dès qu'une colonie typique de *Salmonella* était détectée, le tube d'où elle provenait était considéré positif. Les résultats étaient ensuite compilés (tubes positifs et négatifs) et reportés dans la grille pour le NPP (voir Appendice VII).

#### **2.7.5. Détection de *Yersinia enterocolitica***

Le protocole tiré du "Bacteriological Analytical Manual" de la FDA (1998) a été quelque peu modifié. Trois stratégies de détection et/ou de quantification ont été utilisées. La première stratégie consistait à inoculer directement 0.1 mL d'échantillon sur des géloses Cefsulodin-Irgasan-Novobiocine (CIN) et MacConkey. Pour la deuxième stratégie, 1 mL des échantillons a été mélangé à 9 mL d'une solution de KOH (0.5% p/v) et NaCl (0.5% p/v) pendant quelques secondes. De ces suspensions, 0.1 mL a été étalé sur milieux CIN et MacConkey. Pour la troisième stratégie, 25 mL de chaque échantillon ont été mélangés à 225 mL de bouillon Peptone-Sorbitol-Sels Biliaires (PSBB). Après dix jours d'incubation à 10°C, 0.1 mL des bouillons PSBB a été suspendu par agitation pour quelques secondes dans 1 mL d'une solution de KOH (0.5% p/v) et NaCl (0.5% p/v). Un autre 0.1 mL de bouillon PSBB a été mélangé à 1 mL d'une solution de NaCl (0.5% p/v). Le tout a été suivi de l'inoculation sur milieux CIN et MacConkey. Tous les ensemencements sur géloses ont été effectués en triplicata.

Après l'incubation des milieux solides, les colonies soupçonnées ont été inoculées sur des milieux de confirmation pour vérifier qu'elles n'utilisaient pas le citrate (milieu Simmon's citrate), qu'elles possédaient une activité uréase (gélose urée Christensen's) et qu'elles fermentaient des sucres en conditions aérobies et anaérobies (Fer Triple Sucre, TSI). Afin de s'assurer que les colonies répondant aux derniers critères appartenaient vraiment à l'espèce *Yersinia enterocolitica*, elles ont été inoculées sur galerie API 20E (bioMérieux).

Après dix jours d'incubation des bouillons PSBB, 0.1 mL des cultures a été suspendu par agitation pour quelques secondes dans 1 mL d'une solution de KOH 0.5% (p/v)-saline (0.5%, p/v) et dans 1 mL d'une solution saline (0.5%, p/v). Chaque suspension a étéensemencée sur milieu CIN et MacConkey et incubée à 30°C pour 24 à 48 heures. Les tests de confirmation ont été les mêmes que ceux décrits plus haut.

#### **2.7.6. Détection de *Cryptosporidium parvum* et de *Giardia lamblia***

Tout d'abord, les échantillons ont subi une série de centrifugations à basse vitesse (entre 500 et 1500 x g). L'une d'entre elles a été effectuée sur une solution saturée en NaCl et l'autre, sur une solution concentrée en sucrose (70% p/v) froide. Ces étapes ont permis d'éliminer un grand nombre de solides et de bruits de fond en microscopie. Les oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. lamblia* ont été détectés par immunofluorescence à l'aide de l'ensemble commercial MERIFLUOR® *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Diagnostic Inc., Cincinnati, OH). Les anticorps sont couplés à la fluoresceine isothiocyanate (FITC), et les échantillons ont été observés à une longueur d'onde de 520 nm (excitation entre 450 et 490 nm) en microscopie à fluorescence (Nikon Eclipse E800).



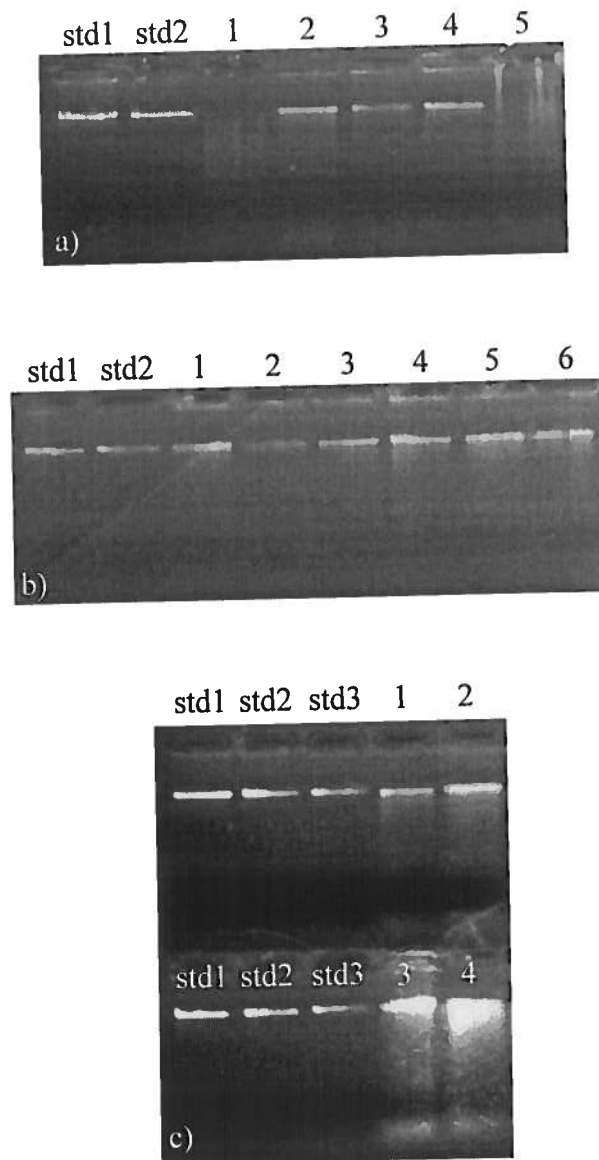
## **Chapitre 3. RÉSULTATS**

### 3.1. Optimisation des paramètres pour le PCR-DGGE

#### 3.1.1. Extraction d'ADN génomique

Différentes conditions d'extraction d'ADN génomique ont été testées afin que la technique permette la lyse de la majorité des parois et des membranes cellulaires et pour obtenir de l'ADN en grande quantité et de bonne qualité. La qualité et la quantité d'ADN extrait étaient examinées sur gel d'agarose. Après chaque essai, la lyse cellulaire des échantillons était observée par coloration à l'acridine orange et la viabilité des cellules restantes par croissance sur milieu R2A. Suite à plusieurs essais, l'efficacité de l'extraction a été déterminée seulement à partir de l'électrophorèse de l'ADN extrait. La coloration des cellules par l'acridine orange s'est avérée peu adaptée pour le type de flore observée (thermophile). Les cellules étaient difficiles à observer, fantomatiques. Le colorant ne semblait pas capable de pénétrer à l'intérieur des bactéries ou très difficilement. Il était alors ardu de distinguer un débris d'une cellule. La détermination des cellules viables a aussi été laissée de côté puisque les résultats ne représentaient pas la population thermophile totale, cette dernière ayant peu d'affinité à pousser sur certains milieux de culture dont la gélose R2A.

Les résultats sur gel d'agarose 1% (p/v) des différents essais réalisés pour l'optimisation de l'extraction de l'ADN génomique sont présentés à la Figure 4. Tout d'abord, la présence d'EDTA dans la solution d'extraction semblait plus efficace que le  $\beta$ -mercaptoéthanol (Figure 4, a). Les trois différentes concentrations d'EDTA testées, c'est-à-dire, 20, 50 et 100 mM, étaient toutes efficaces pour conserver l'intégrité de l'ADN (Figure 4, a). On remarque à la Figure 4 b que dix minutes de lyse permettaient de récupérer plus d'ADN que cinq minutes. De plus, nous obtenions plus d'ADN avec 0.5 et 1.5 g de billes de verre qu'avec 1 g lorsque la période de lyse était de cinq minutes. À dix minutes de lyse, les trois quantités de billes offraient sensiblement la même quantité d'ADN. Les quatre essais effectués pour déterminer le volume de solution d'extraction et le volume d'échantillon nous ont tous permis d'obtenir de l'ADN de bonne qualité. Cependant, les essais avec 0.5 mL d'échantillon ont permis de récupérer beaucoup plus d'ADN (Figure 4, c).

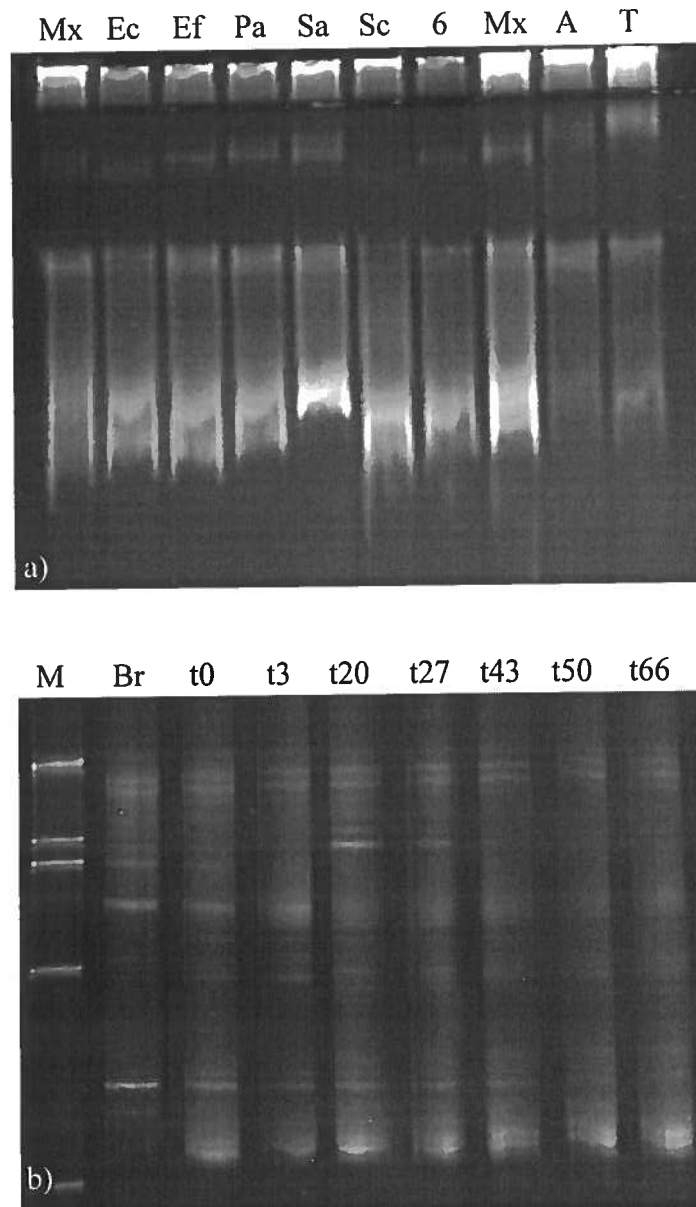


**Figure 4. Résultats des différents essais pour l'optimisation de l'extraction d'ADN génomique par bris mécanique des cellules.** Std1: standard, 100ng; std2: 50 ng; std3: 25 ng. **a)** Utilisation d'un inhibiteur de DNase. 1: sans inhibiteur, 2: 20 mM d'EDTA, 3: 50 mM d'EDTA, 4: 100 mM d'EDTA, 5: 1%  $\beta$ -Mercaptoéthanol. **b)** Essais sur la quantité de billes et le temps de lyse. 1: 0.5g de billes et 5 minutes de lyse, 2: 1.0g et 5 min., 3: 1.5g et 5 min., 4: 0.5g et 10 min., 5: 1.0g et 10 min., 6: 1.5g et 10 min. **c)** Essais avec différents volumes d'échantillon et de solution d'extraction. 1: 0.25 mL d'échantillon et 0.25 mL de solution d'extraction, 2: 0.25mL éch. et 0.5 mL soln ext., 3: 0.5 mL éch. et 0.5 mL soln ext., 4: 0.5 mL éch. et 0.25 soln ext.

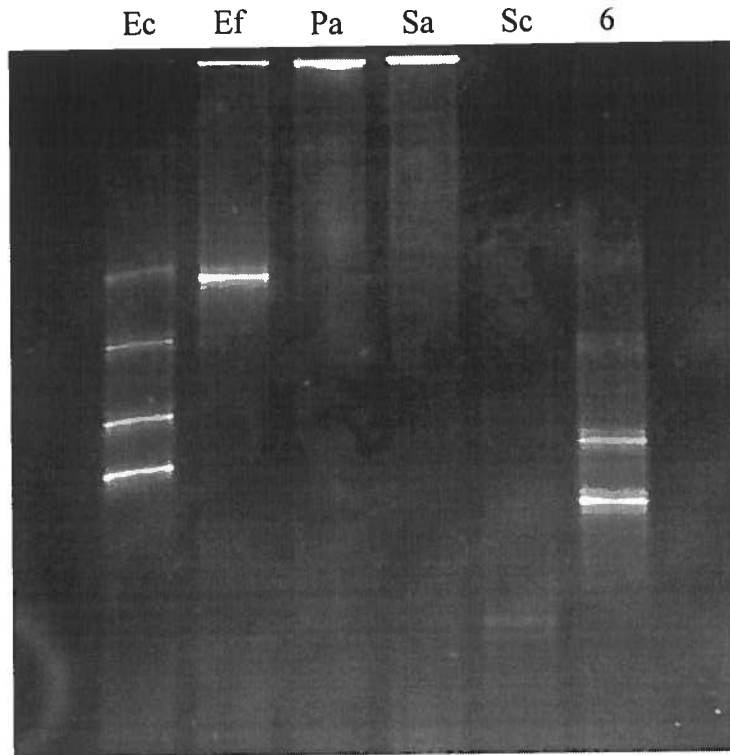
Les conditions qui ont été retenues pour l'extraction d'ADN génomique sont d'abord d'effectuer la lyse avec des billes de verres de 0.17 mm, qui semblaient les mieux adaptées pour les échantillons thermophiles (résultats non présentés). Ensuite, pour permettre d'ajouter 0.5 mL d'échantillon et 0.5 mL de solution d'extraction, 1 g de billes de verre était ajouté à chacun des tubes. À la solution d'extraction a été ajouté de l'EDTA pour une concentration finale de 50 mM. Finalement, puisque les techniques utilisées pour vérifier l'état des microorganismes après la lyse n'ont pas été efficaces (acridine orange et viabilité cellulaire sur milieux de culture), dix minutes de traitement ont été appliquées à tous les échantillons thermophiles afin d'assurer de la lyse générale de cette population.

### **3.1.2. Choix des amorces pour PCR-DGGE et conditions idéales pour le gel et l'électrophorèse**

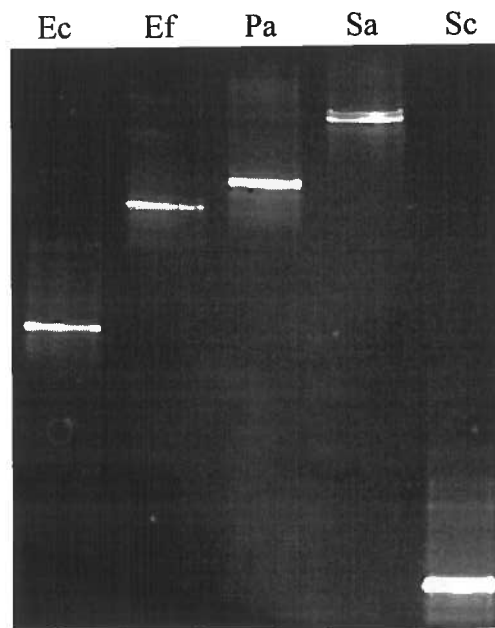
Le choix des amorces et l'évaluation des meilleures conditions pour le gel et l'électrophorèse ont été faits en parallèle. Lors de l'amplification avec les amorces PRBA341F-GC et PRUN907R qui génèrent des fragments de 600 paires de bases (pb), il n'était pas possible d'observer de bandes distinctes sur DGGE, que ce dernier soit constitué de 6 ou de 8% (p/v) de polyacrylamide (Figure 5). Les échantillons donnaient de grandes traînées et quelques bandes floues. De plus, les gels à 6% (p/v) étaient très fragiles et se déchiraient dès qu'ils étaient manipulés. C'est pourquoi une concentration de polyacrylamide de 8% (p/v) pour le gel a été retenue. D'autres amorces ont été utilisées de manière à obtenir des amplicons d'une longueur de 200 pb. La première paire d'amorces utilisée, PRBA341F-GC et PRUN515R, ne donnait pas la résolution souhaitée (Figure 6). Plus précisément, les amplicons d'*Escherichia coli*, d'*Enterococcus faecalis* et de la souche 6 donnaient plus d'une bande sur DGGE. De plus, l'une des bandes de *E. faecalis* migrait à la même hauteur que celle de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus*. Le troisième couple d'amorces, PRBA341F-GC et PRUN518R, s'est révélé efficace et les gels obtenus avaient une très bonne résolution (Figure 7). Par la suite, afin de permettre une manipulation plus facile des gels sans qu'ils ne se brisent



**Figure 5. Essai DGGE avec fragments de 600bp.** a) Le gel était constitué de polyacrylamide 6% (p/v) avec un gradient dénaturant de 40 à 60%. De plus, un gel d'empilement est présent au haut du gel. Mx: Mixte des ADN dans la réaction de PCR, Ec: *Escherichia coli*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sc: *Streptomyces coelicolor*, 6: souche 6, A: échantillon provenant d'un bioréacteur séquentiel anaérobie, T: échantillon provenant du bioréacteur aérobie thermophile. b) Le DGGE du cycle C (30-07-01 au 02-08-01, voir Tableau 10 pour plus d'information sur ce cycle) contient 8% (p/v) de polyacrylamide avec un gradient dénaturant de 30 à 70%. Aucun gel d'empilement n'a été utilisé. M: Marqueur de référence (200bp), t0: temps zéro, biomasse de départ et lisier à traiter, t3: 3 hrs de traitement, t20: 20 hrs de traitement, t27: 27 hrs, t43: 43 hrs, t50: 50 hrs, t66: fin du traitement, échantillon de l'effluent, 66 hrs.



**Figure 6. Essai DGGE avec fragments 200bp.** Les amorces utilisées pour l'amplification de la région hypervariable V3 de l'ADNr 16S sont PRBA341F-GC et PRUN515R. Certaines souches pures donnent plus d'une bande et même que quelques unes migrent à la même hauteur (Ef, Pa et Sa). Ec: *Escherichia coli*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sc: *Streptomyces coelicolor*, 6: souche 6



**Figure 7. Obtention d'une seule bande sur DGGE pour chacune des souches pures.** Le DGGE est de 8% (p/v) polyacrylamide, et le gradient dénaturant se situe entre 30 et 70%. Les souches ont été amplifiées avec les amorces PRBA341F-GC et PRUN518R. Ec: *Escherichia coli*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sc: *Streptomyces coelicolor*.

continuellement, l'épaisseur de ces derniers a été établie à 1.5 mm plutôt que 0.75 ou 1 mm. Les essais réalisés sur la présence d'un gel d'empilement ont démontré que ce dernier n'est pas nécessaire puisqu'il n'améliore pas la qualité de la résolution. Il génère même un artefact, soit une bande ayant une distance de migration identique d'un échantillon à l'autre, même lorsqu'il s'agit de souches pures (Figure 8). Suite aux différents voltages testés, celui utilisé pour l'électrophorèse a été établi à 100V, nous permettant une bonne résolution des bandes et un temps de migration relativement court. Le temps minimal de la migration des échantillons est de huit heures mais la migration peut se faire jusqu'à 18 heures sans déranger la position des bandes (résultats non présentés). Pour des fins pratiques, ce temps a été établi à 16 heures, ce qui permet au gel de migrer pendant la nuit.

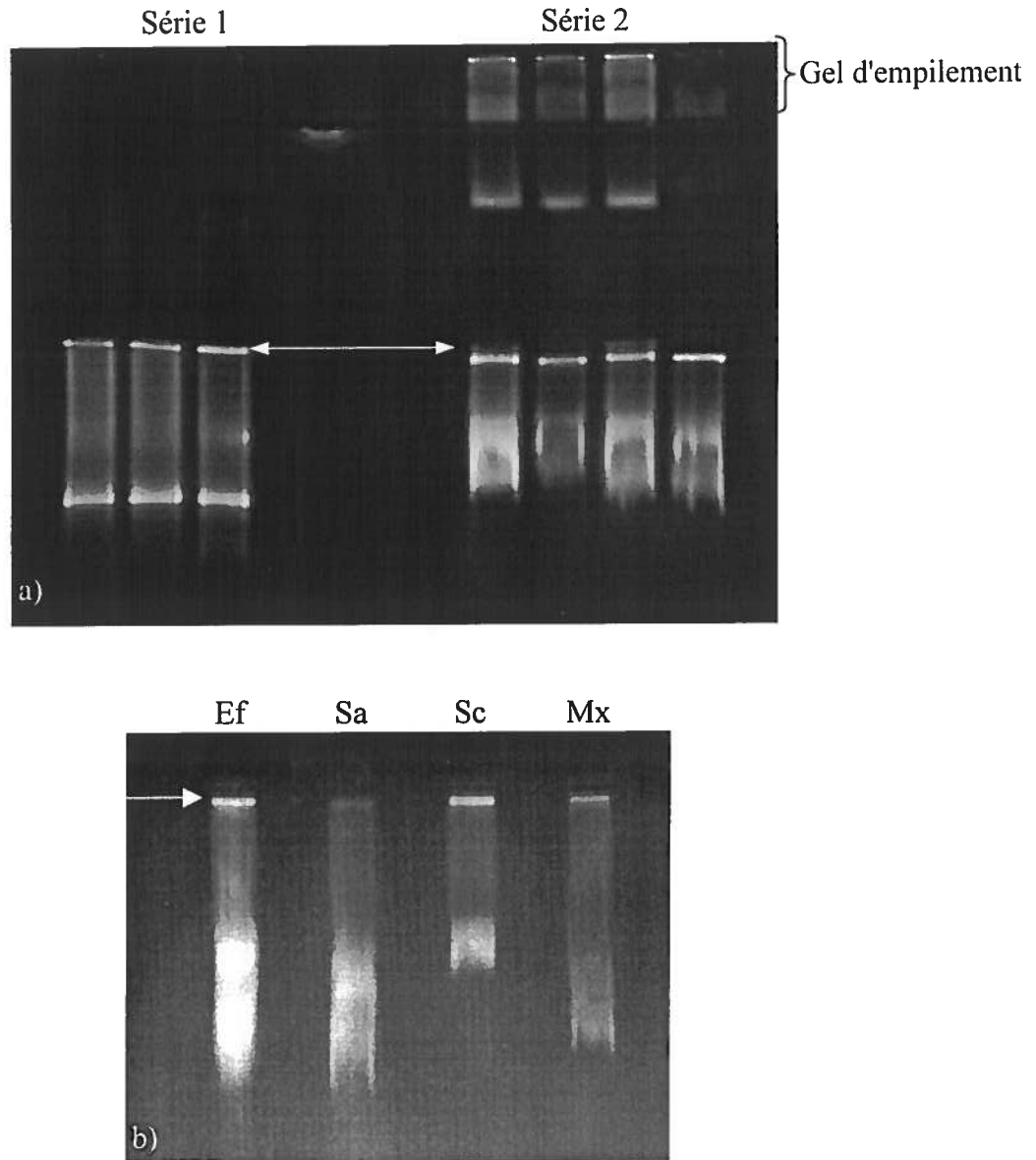
### **3.2. Élaboration du marqueur de référence**

Un marqueur de référence a été élaboré pour faciliter la comparaison entre les gels des différents suivis de populations mais aussi pour nous assurer du bon fonctionnement des électrophorèses. La même région de l'ADNr 16S des échantillons a été amplifiée chez différentes souches bactériennes pures. Ces dernières ont été retenues selon leur disponibilité et leur contenu en G+C, de manière à ce que les bandes générées soient distribuées sur toute l'étendue du gel (Figure 9). La souche 6 n'a pas été retenue pour faire partie du marqueur puisque plus d'une bande étaient générées par cette bactérie dont certaines se rapprochaient trop de celle d'*E. coli* (résultats non présentés). Nous avons également établi que les ADN génomiques des souches bactériennes ne devaient pas être mélangés ensemble avant l'amplification car les amorces favorisent l'amplification de *S. aureus* (Figure 9).

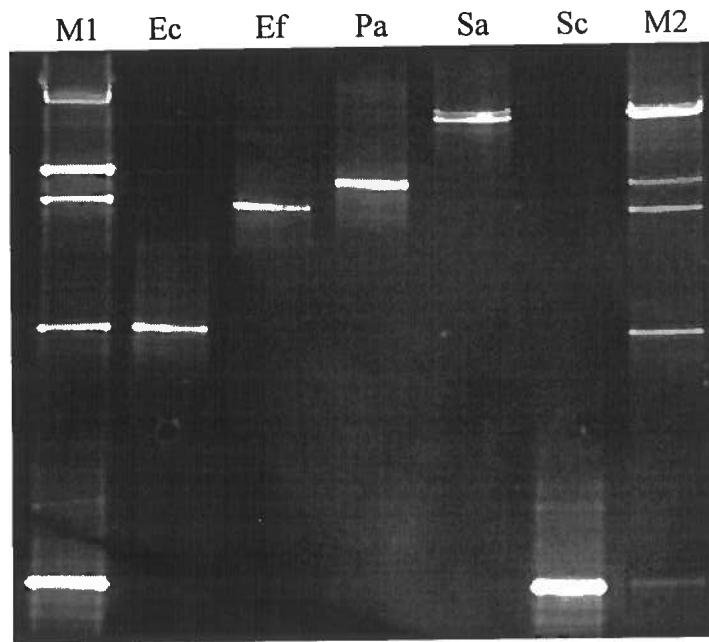
### **3.3. Suivi de l'évolution de la flore dans les bioréacteurs**

Au total, quinze cycles de traitement de lisier ont été suivis et identifiés par les lettres de l'alphabet (A à O) sur une période de quatre mois. Cependant, quelques uns ont été interrompus pendant le traitement suite à des bris mécaniques ou des débordements de mousse (Cycles G, H). Les caractéristiques physico-chimiques et les performances des





**Figure 8. Effet de la présence d'un gel d'empilement.** Le gel d'empilement était constitué de polyacrylamide à 8% (p/v) sans agent dénaturant. **a)** Essai avec *Staphylococcus aureus*. La première série était constituée de fragments de 200 bp (générés avec les amorces PRBA341F-GC et PRUN515R) et la deuxième de fragments de 600 bp (générées avec les amorces PRBA341F-GC et PRUN907R). **b)** Essai avec d'autres souches bactériennes. Ec: *Enterococcus faecalis*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sc: *Streptomyces coelicolor*, Mx: mélange des trois souches. Les flèches indiquent un artefact généré par la présence du gel d'empilement.



**Figure 9. Marqueur de référence.** Le DGGE est un gel de 8% (p/v) polyacrylamide, composé d'un gradient dénaturant de 30 à 70%. Les souches ont été amplifiées avec les amorces PRBA341F-GC et PRUN518R. M1: Marqueur élaboré suite au mélange des produits de PCR des souches pures, M2: Marqueur élaboré suite à l'amplification d'un mélange des ADN totaux des souches pures, Ec: *Escherichia coli*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sc: *Streptomyces coelicolor*.

cycles ininterrompus sont présentés au Tableau 10 et les résultats du suivi des cycles A, F, K et N sont présentés à la Figure 10. La diversité microbienne observée dans les échantillons est relativement élevée. En moyenne de douze à quinze bandes peuvent être observées par échantillon. Les échantillons qui montrent la plus grande diversité microbienne sont généralement ceux prélevés au démarrage des cycles (temps zéro, t<sub>0</sub>). Le réacteur contient alors du lisier traité provenant du cycle précédent ainsi que du lisier brut dans une proportion de 1:1. Si on considère un gel à la fois, on remarque que la diversité diminue avec le temps. Il est aussi possible d'observer les variations des populations microbiennes pendant un cycle. Si on se réfère au cycle K de la Figure 10 c, certaines populations s'atténuent au fil du temps (bandes *a*, *d*, *g*, *k*, *m*, *n* et *o*) tandis que d'autres s'installent fermement (bandes *c* et *f* par exemple). Lorsque l'on observe le cycle N qui suit le cycle K de quelques jours (Figure 10), on remarque que les populations qui s'atténuent pendant le cycle K reviennent au cycle N, pour encore une fois s'atténuer pendant le cycle (bandes *a* et *d*). Le phénomène se produit inversement pour les communautés qui s'établissent pendant le cycle. Lorsqu'un nouveau cycle démarre, ces populations sont plus faibles et semblent reprendre leur place à mesure que le traitement avance (bande *c*).

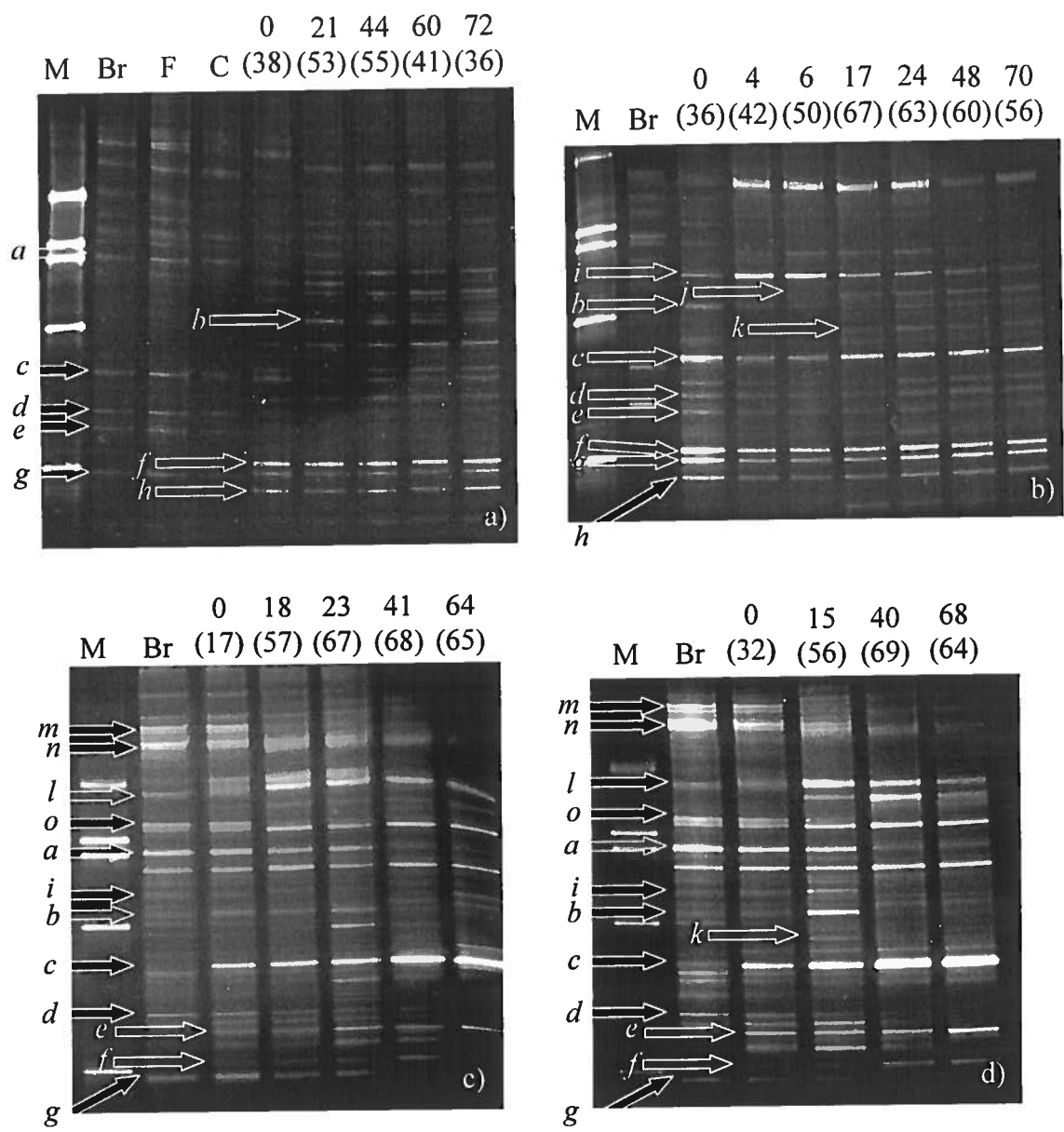
La comparaison des suivis de différents cycles de traitement réalisés montre que les communautés ne sont pas toutes établies lors des premiers essais. On peut voir que les bandes *i*, *l*, *o*, *m* et *n* ne sont pas présentes dans les premiers cycles analysés mais sont ensuite établies lors des derniers suivis effectués (Figure 10). D'autres communautés s'atténuent et deviennent pratiquement indétectables sur les DGGE, d'autres disparaissent (bande *h*). Les derniers cycles, démontrent une certaine stabilité au niveau des différentes communautés (Figure 10, c et d). Un fait à remarquer est que des populations microbiennes (bandes *b*, *c*, *d*, *e*, *f* et *g*) sont présentes depuis le premier suivi réalisé, le cycle A, jusqu'au dernier, le cycle O. Les résultats de tous les autres cycles de traitement peuvent être consultés à l'Appendice III.

Le cycle O a été suivi de manière très étroite. Après que la température ait augmenté de 10°C (sept heures) suite au début du traitement, les échantillons ont été prélevés aux deux heures. Ce suivi a permis d'observer les petites variations ne pouvant

**Tableau 10. Caractéristiques physico-chimiques et performances des cycles de traitement où un suivi microbiologique a été réalisé**

Cycle	Durée hrs	T° max	DCO Total			DCO soluble			NH <sub>3</sub>		
			Entrée g/L	Sortie g/L	Réduction %	Entrée g/L	Sortie g/L	Réduction %	Entrée g/L	Sortie g/L	Réduction %
A <sup>a</sup>	73.4	56.3	8.05	4.03	49.94	10.34	1.2	88.39	N.D.	N.D.	N.D.
B <sup>a</sup>	66.0	57.7	10.47	2.68	74.40	9.67	1.07	88.93	N.D.	N.D.	N.D.
C <sup>a</sup>	65.8	58.7	10.34	2.95	71.47	9.4	1.21	87.12	N.D.	N.D.	N.D.
D <sup>a</sup>	47.8	62.1	24.7	5.64	77.17	23.62	2.42	89.75	N.D.	N.D.	N.D.
E <sup>a</sup>	67.7	61.9	6.44	6.85	-6.37	6.04	2.28	62.25	N.D.	N.D.	N.D.
F <sup>a</sup>	93.8	68.1	22.55	8.05	64.30	18.79	2.42	87.12	N.D.	N.D.	N.D.
I	72.5	69.1	57.99	22.55	61.11	29	7.11	75.48	3.25	1.27	60.92
J	67.9	72.0	57.46	19.87	65.42	30.61	7.12	76.74	3.33	1.54	53.75
K	64.6	64.7	73.03	23.63	67.64	38.12	11.54	69.73	3.98	1.71	57.04
L	42.2	72.5	76.79	27.65	63.99	37.59	12.22	67.49	4.02	2.16	46.27
M	73.9	66.8	75.17	N.D.	N.D.	38.66	7.38	80.91	4.17	1.69	59.47
N	63.6	70.5	90.33	22.95	74.59	52.45	10.93	79.16	N.D.	1.82	N.D.
O	66.0	72.1	66.58	27.12	59.27	38.66	13.29	65.62	4.24	2.63	37.97

<sup>a</sup>: lisier brut utilisé pour le cycle était centrifugé



**Figure 10. Suivis de l'évolution des communautés microbiennes par DGGE.** Les conditions du DGGE sont de 8% (p/v) polyacrylamide avec un gradient dénaturant de 30 à 70%. **a)** Cycle A, du 09-07-01 au 12-07-01, **b)** Cycle F, du 23-08-01 au 27-08-01, lisier brut préalablement filtré **c)** Cycle K, du 09-11-01 au 12-11-01 **d)** Cycle N, du 17-11-01 au 20-11-01. Les flèches précédées d'une lettre indiquent certaines bandes d'intérêts (voir texte). M: Marqueur de référence, Br: lisier brut, F: lisier brut filtré (cotton fromage), C: lisier brut centrifugé. Les nombres au-dessus de chaque photo identifient les échantillons; le premier nombre indique le temps (en heure) écoulé depuis le début du cycle et le deuxième entre parenthèses donne la température (en degré Celsius) du bioréacteur au moment de l'échantillonnage.

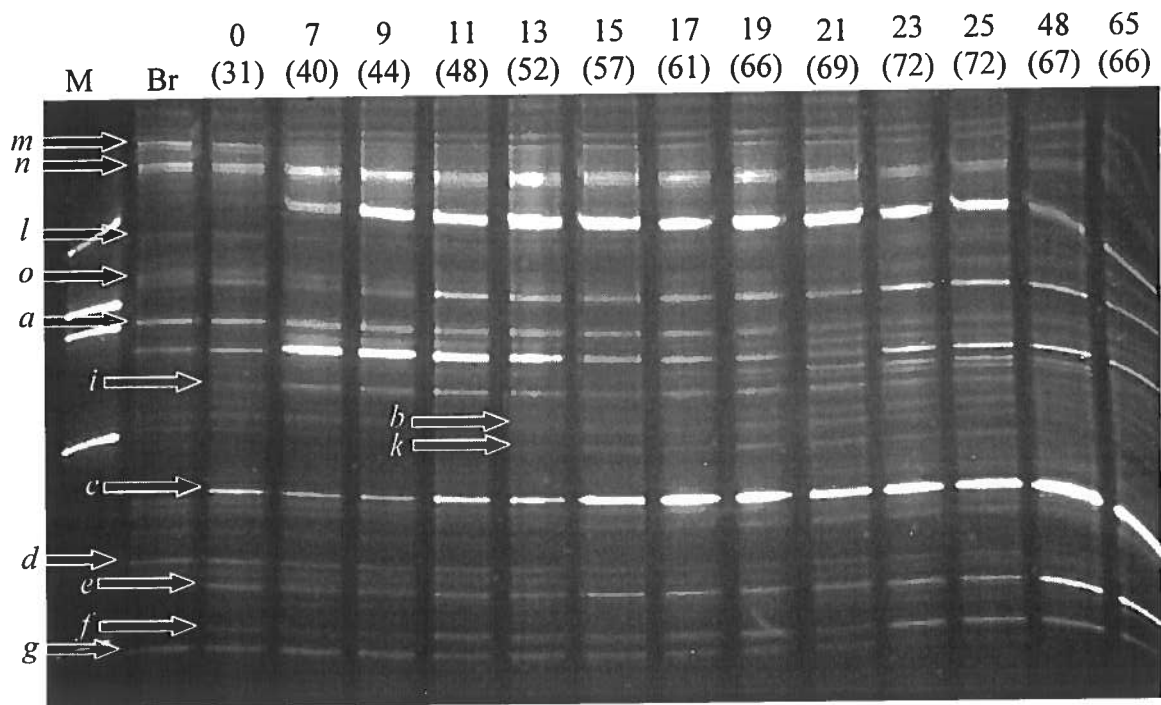
être détectées lorsque les échantillons étaient recueillis une à deux fois par jour de traitement. Les résultats de ce suivi dit "serré" du traitement aérobique thermophile du lisier de porc sont présentés à la Figure 11. Tout d'abord, ce que l'on remarque est la grande diversité de certains échantillons, surtout de l'échantillon t17 jusqu'à t21 inclusivement. Elle paraît même plus élevée que la biodiversité de la biomasse de départ. Ces échantillons ont été prélevés à des températures situées entre 60 et 70°C, dont le temps de traitement était de 17 à 21 heures. Deux heures après, lorsque la température atteignait les 72°C, la diversité était redevenue moindre. De plus, il est à remarquer que la majorité des changements de la population microbienne a eu lieu dans les 24 heures suivant le début du traitement (t0 à t23).

### **3.4. Caractérisation de la flore microbienne**

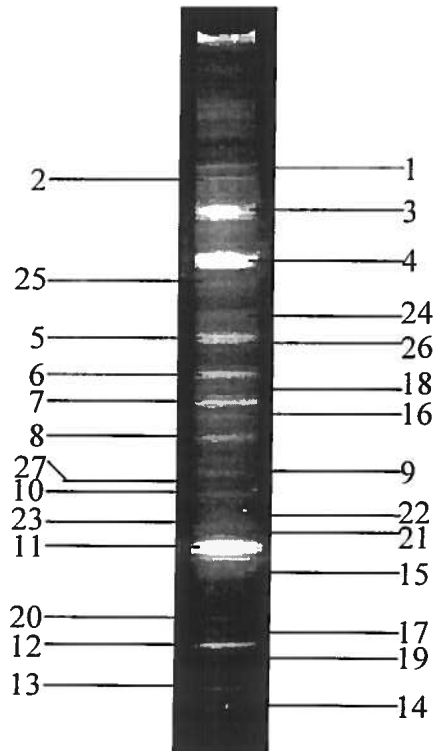
#### **3.4.1. Librairie de clones**

Une librairie de clones a été élaborée à partir de l'ADN provenant de l'échantillon t17 du cycle O. Cet échantillon prélevé à 61°C a été sélectionné parce que l'analyse par DGGE montrait qu'il était représentatif de la microflore dans le réacteur, c'est-à-dire qu'il était constitué des populations (bandes) présentes dans les échantillons qui le précèdent et dans ceux qui le suivent (Figure 11).

Suite à l'amplification de l'ADNr 16S (amorces pA et pH), à la ligation des amplicons dans le vecteur "pGEM®-T Easy" et à leur transformation, 139 colonies blanches, qui pouvaient potentiellement contenir un fragment inséré, ont été mises en bouillon de culture. Suite à l'extraction de l'ADN plasmidique, nous avons déterminé que seulement 86 clones possédaient l'insert de la longueur prévue (1.5kb). Afin de pouvoir cribler ces clones, ceux-ci ont été analysés par DGGE en utilisant les mêmes amorces que celles ayant servi précédemment (PRBA341F-GC et PRUN518R). Les amplicons de chaque clone ont été placés sur un gel de 8% (p/v) polyacrylamide, constitué d'un gradient dénaturant linéaire de 30 à 70%. Les différentes bandes de l'échantillon t17 (d'où proviennent les clones) ont été numérotées et les groupes de clones ont été identifiés sur la base de leur correspondance avec ces bandes (Figure 12). Un représentant des 25 groupes ainsi détecté de même que l'échantillon t17 sont présentés à la Figure 13.

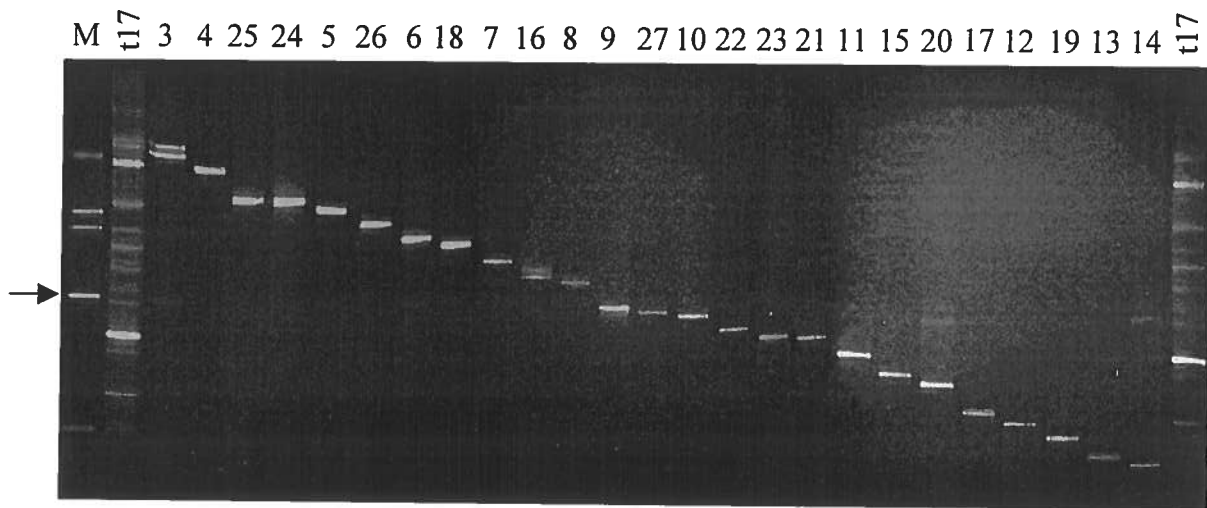


**Figure 11. Cycle O, suivi serré de la variation des populations microbiennes dans le bioréacteur lors du traitement.** Les conditions du DGGE sont de 8% (p/v) polyacrylamide avec un gradient dénaturant de 30 à 70%. M: Marqueur, Br: lisier brut. Les nombres au-dessus de chaque photo identifient les échantillons; le premier nombre indique le temps (en heure) écoulé depuis le début du cycle et le deuxième, entre parenthèses, donne la température (en degré Celsius) du bioréacteur au moment de l'échantillonnage.



**Figure 12. Identification des bandes de l'échantillon de référence t17 du cycle O obtenu par DGGE.** Certaines bandes ne sont pas présentes ou sont très difficiles à observer. Elles ont tout de même été identifiées puisque des clones pour ces positions ont été obtenus.





**Figure 13. Analyse des clones par DGGE.** Cette photo montre un représentant de chaque groupe de clones par rapport aux bandes obtenues avec l'échantillon de référence t17 du cycle O. Les chiffres identifient les groupes auxquels les clones correspondent (Figure 12). Pour certains groupes, aucune bande n'est observée à leur position, ils ont tout de même été considérés et identifiés. M: Marqueur de référence, t17: échantillon de référence.

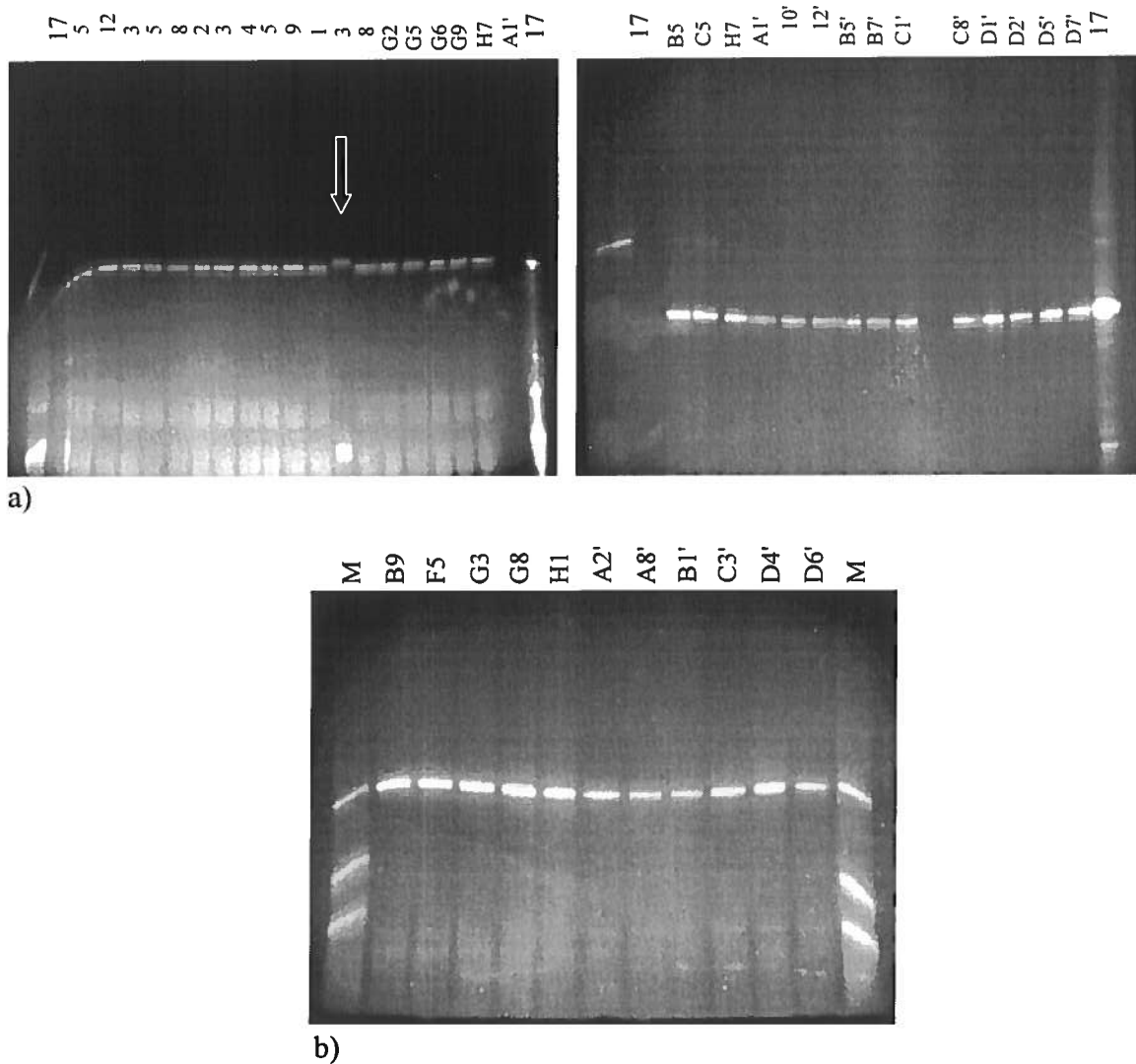
Aucun clone n'a été obtenu pour les bandes désignées 1 et 2 de la Figure 12. Certains groupes ne semblent correspondre à aucune bande particulière, mais ont tout de même été considérés. Pour quelques groupes, une deuxième bande très faible apparaît (Figure 13, groupe 3, 24, 6, 16, 20 et 14, indiqué par la flèche). Cette bande se situe à la même hauteur que la bande de *Escherichia coli* du marqueur de référence. Elle provient de l'ADN de la souche bactérienne *E. coli* DH5 $\alpha$  utilisée pour la transformation. De plus, certains groupes, 3, 12 et 16 présentent une bande double.

Suite au criblage sur DGGE, le groupe 11 est celui qui rassemble le plus de clones (30 clones). Il est ensuite suivi du groupe 4 comptant 11 clones. Tous les fragments des groupes 11 et 4 ont été replacés sur DGGE à 8% (p/v) de polyacrylamide mais le gradient dénaturant a été restreint à des valeurs de 40 à 60% pour le groupe 11 et de 30 à 50% pour le groupe 4. Il est alors plus facile d'observer les bandes qui ont de légères variations dans la distance de migration (Figure 14). Il a ainsi été possible de diviser le groupe 11 en deux, le groupe 11a (1 clone) et 11b (29 clones) (Figure 14, a). Pour le groupe 4, aucune différence n'a été observée entre les clones (Figure 14, b). Un représentant de chaque groupe a été séquencé. Cependant, il a été impossible, après trois essais, de séquencer le représentant du groupe 27. Après l'analyse des séquences obtenues à l'aide des logiciels BLAST, FASTA3 et CHECK\_CHIMERA, les groupes 3, 25 et 26 se sont avérés être des chimères. Donc, au départ, nous avions 25 groupes (incluant les groupes 11a et 11b) dans lesquels étaient répartis 86 clones. En excluant les chimères et le groupe 27 et en incluant les groupes trouvés à la section 3.4.2.4, après laquelle nous avons scindé le groupe 12 en trois (12 a, b, c), nous nous retrouvons avec 24 groupes et 78 clones "valides".<sup>3</sup> Le nombre de clones qui compose chaque groupe est illustré à la Figure 15.

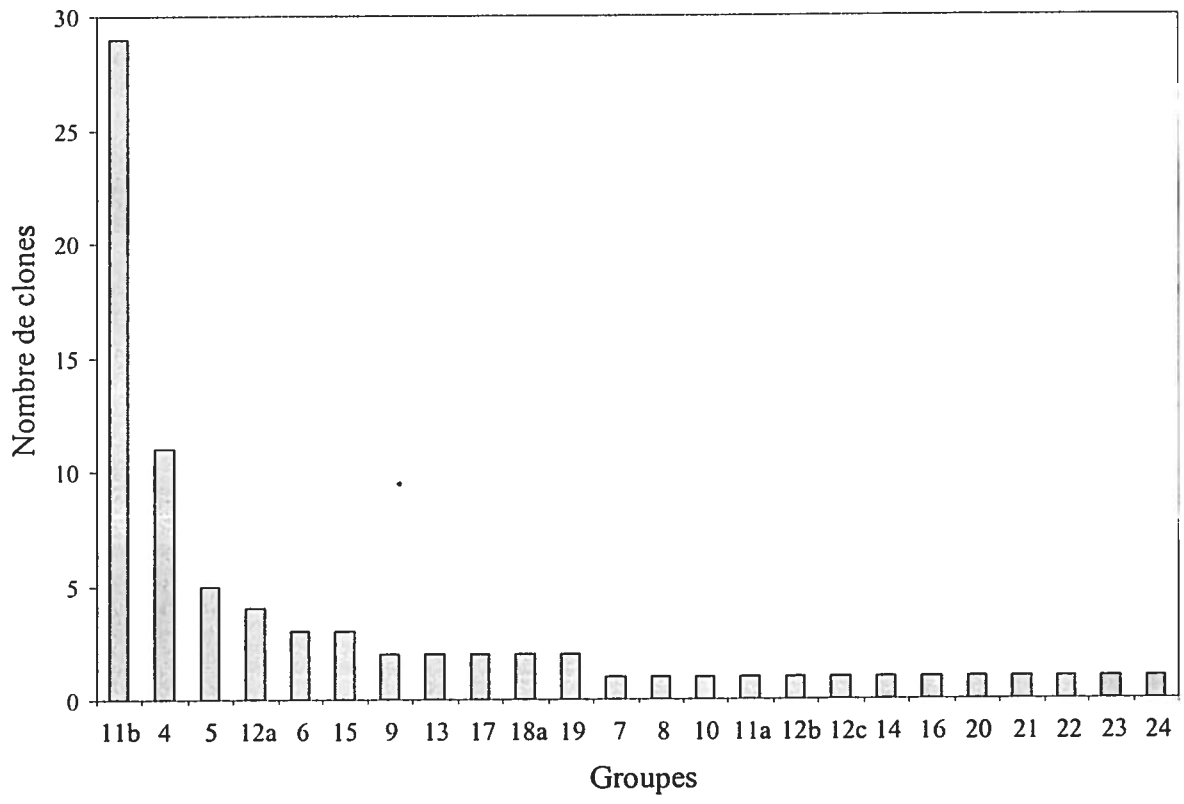
Comme présenté dans le Tableau 11, la majorité des microorganismes qui se retrouvent dans le bioréacteur sont des représentants du groupe des *Clostridium/Bacillus*. La famille la plus représentée est celle des *Bacillaceae*. L'appendice IV contient plus de détails sur l'appartenance de chaque groupe. Les séquences ont aussi fait l'objet d'une analyse phylogénique plus poussée (section 3.4.3).

---

<sup>3</sup> Ici, la division du groupe 18 en deux (18a et 18b) n'a pas été mentionnée et incluse puisque nous ne traitons pas des souches cultivables pour l'instant mais seulement des clones.



**Figure 14. Vérification des membres des groupes de clones les plus importants en nombre.** a) Observation des membres du groupe 11. Le gradient dénaturant est de 40 à 60% et deux gels ont été nécessaires pour observer tous les membres. La flèche blanche indique le clone qui n'a pas migré à la même hauteur sur le gel. b) Observation des membres du groupe 4. Le gradient dénaturant est de 30 à 50%. L'échantillon de référence t17 n'a pu être ajouté à ce gel suite à une mauvaise amplification. Cependant, il est facile d'observer que les bandes sont toutes à la même hauteur. M: marqueur, t17 : échantillon de référence. La lettre suivi d'un chiffre est le numéro du clone qui correspond à sa position dans la première ou la deuxième (identifiée par une apostrophe (')) plaque de 96 puits.



**Figure 15. Distribution du nombre de clones obtenus.** Suite au criblage sur DGGE, les clones obtenus ont été rassemblés dans un groupe selon la bande à laquelle ils correspondent.

**Tableau 11. Classification des clones retrouvés dans le bioréacteur**

		Nombre de groupes	Identité (%)	Proportion de clones
Groupe <i>Clostridium/Bacillus</i>	<i>Bacillaceae</i>	10	89 à 98	57.7%
	<i>Lactobacillaceae</i>	1	99	5.8%
	<i>Clostridiaceae</i>	4	92 à 98	5.8%
	<i>Eubacteriaceae</i>	1	93	1.2%
	Clostridiales non affiliés	3	91 à 94	7.0%
	<i>Peptostreptococcaceae</i>	1	97	1.2%
Gamma- <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonaceae</i>	1	99	1.2%
	Xanthomonadales	1	97	12.8%
Spirochaetales	<i>Spirochaetaceae</i>	1	<90	1.2%
Bacteroïdales	<i>Prevotellaceae</i>	1	91	1.2%

Une analyse de raréfaction et de Chaos a été réalisée afin de déterminer si le nombre de clones obtenus était suffisant pour englober les espèces plus rares présentes dans le bioréacteur. Selon la courbe de raréfaction (Figure 16) la recherche de clones aurait pu se prolonger étant donné qu'un plateau n'a pas été atteint. La courbe de référence démontre une situation où chaque espèce ne posséderait qu'un seul clone et où la recherche pourrait se continuer sans arrêt avant d'obtenir tous les candidats d'un milieu hétérogène. En comparant cette courbe de référence avec celle de nos travaux, le plateau semble bien près d'être atteint et l'obtention des espèces rares aurait été plus difficile vu la présence dominantes de certaines espèces. L'étude de Chaos 1, qui répond à l'équation

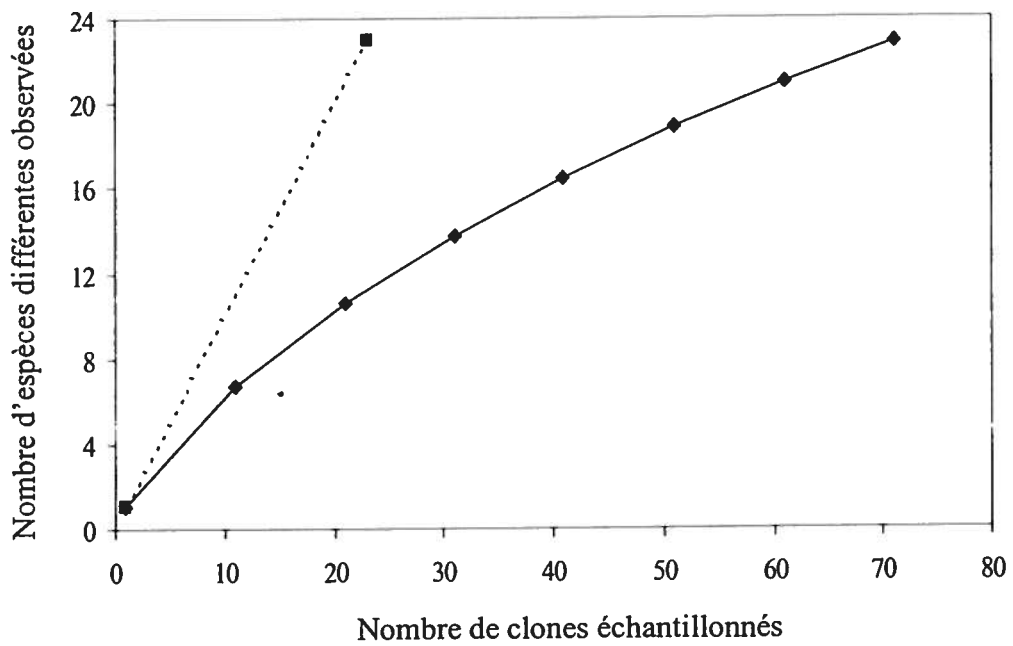
$$\text{Chaos 1} = \text{nb d'espèces observées} + n_1^2/2n_2$$

où  $n_1$  est le nombre de clones obtenus une fois et  $n_2$  le nombre de clones obtenus deux fois, nous indique que nous aurions pu obtenir jusqu'à 41 groupes de clones différents si le clonage avait été continué. Les 24 groupes obtenus représentent donc 58% du total théorique.

### **3.4.2. Microorganismes cultivables à 40 et 60°C**

Lors du suivi serré de l'évolution de la population microbienne du bioréacteur (cycle O), deux échantillons ont été prélevés à des fins de culture bactérienne. Le premier fut recueilli à 40°C et le deuxième à 60°C.

Préalablement, des essais avaient été effectués sur différents milieux de culture soit TSA, BHI agar, R2A, gélose sang Columbia et gélose lisier 50%, tous incubés à 59°C. De ces milieux, la gélose sang Columbia et la gélose lisier permettaient une meilleure croissance de la flore thermophile. La population qui a poussé sur gélose lisier était peu diversifiée et atteignait  $3 \times 10^8$  UFC/mL. Sur gélose sang, la diversité morphologique des colonies était plus importante mais la population était plus faible que celle retrouvée sur gélose lisier (3000 UFC/mL). Ces milieux ont donc été sélectionnés pour les études sur les populations cultivables du bioréacteur.



**Figure 16. Courbe de raréfaction des clones obtenus à partir du bioréacteur.**  
 La courbe —◆— correspond aux résultats obtenus. La droite ---■--- décrit une situation hypothétique où chaque espèce observée correspondrait à un clone obtenu.

#### ***3.4.2.1. Culture des microorganismes à 40°C***

Pour les deux milieux, 24 heures d'incubation à 40°C ont été suffisantes pour obtenir une croissance intéressante. Le compte bactérien sur la gélose sang Columbia s'établissait à  $1.15 \times 10^8$  UFC/mL. À ce moment, sept colonies différentes d'après leurs morphologies ont été observées. Sur milieu lisier (50%), nous avons dénombré  $1.33 \times 10^8$  UFC/mL et obtenu seulement trois colonies différentes. La description de ces colonies est détaillée au Tableau 12. Les souches sont identifiées d'abord par la température à laquelle elles ont été isolées (40 ou 60), suivi de la première lettre du milieu sur lequel elles ont été recueillies c'est-à-dire L pour le milieu lisier et S pour la gélose sang, et finalement d'un chiffre pour les différencier les unes des autres. Les colonies ont ensuite été isolées par un ou deux repiquages sur leur milieu respectif. Après un passage sur leur milieu, les bactéries étaient observées au microscope pour une description de leur aspect cellulaire (Tableau 12). Il est à remarquer que dans certains cas ( 40S1, 40S3 ) beaucoup de diversité morphologique était observée malgré que ces colonies apparaissent bien pures sur milieux solides. Suite aux repiquages, nous avons remarqué pour certaines colonies isolées sur gélose sang que leur morphologie macroscopique changeait et qu'elles devenaient de plus en plus semblables entre elles. Plus particulièrement, après deux repiquages les souches 40S4 et 40S6, présentaient la même morphologie coloniale que 40S2. Pour ce qui est de leur morphologie cellulaire, elles étaient identiques dès le premier repiquage.

#### ***3.4.2.2. Culture des microorganismes à 60°C***

Il a été impossible de réaliser un dénombrement pour les cultures à 60°C autant sur la gélose sang que sur le milieu lisier 50%. Après 24 heures d'incubation des géloses sang, seules celles inoculées avec les dilutions  $10^0$  montraient de la croissance mais cette dernière était confluite. Il a fallu une journée de plus pour obtenir des colonies sur les géloses inoculées avec la dilution  $10^{-1}$ , mais le nombre de colonies dépassait alors 300. Aucune croissance n'était alors visible sur les géloses sang où les dilutions de l'échantillon étaient supérieures à  $10^{-2}$ . Jusqu'à 72 heures d'incubation ont été nécessaires



**Tableau 12. Description de la morphologie coloniale et cellulaire des colonies isolées à 40°C.**

Colonies	Description coloniale	Description cellulaire	Proportions de colonies
40S1	Rondes; contours rouges translucides et réguliers; centres roses opaques; lisses; crémeuses; bombées.	Gram -; bâtonnets moyens; paires de petits bâtonnets; en chaînes; Coccobacilles; grands bâtonnets.	74%
40S2	Rondes; vertes pâles; centres pâles opaques; contours translucides.	Gram +/-; bâtonnets moyens; paires de petits bâtonnets.	21%
40S3	Étendues; vertes-beiges; opaques; grosses; plates avec centres surélevés.	Gram -; petits bâtonnets en chaînes; groupes de coccobacilles; bâtonnets moyens et grands.	4%
40S4	Beiges.	Gram +/-; 1 Gram+ pour 100 Gram-; petits et moyens bâtonnets; parfois en paires.	<1%
40S5	Transparentes avec centres opaques beiges; granuleuses.	Gram +/-; 1 Gram+ pour 20 Gram-; longs bâtonnets minces; spores ovales subterminales déformantes.	<1%
40S6	Beiges opaques.	Gram +/-; bâtonnets moyens; petits bâtonnets, parfois en paires ou en chaînes.	<1%
40S7	Rouges.	Gram -; bâtonnets moyens parfois en paires ou en chaînes; petits bâtonnets en chaînes.	<1%
40L1	Rondes; beiges translucides; petites; bombées.	Gram -; bâtonnets moyens; parfois en paires.	89%
40L2	Étendues; crèmes; point opaque au centre.	Gram +; bâtonnets moyens; parfois en paires; parfois déformés au bout (massue); parfois incurvés (boomerang).	10%
40L3	Étendues; beiges; nervurées.	Gram +; longs bâtonnets minces; parfois en paires.	1%

pour observer de la croissance sur les géloses inoculées avec la dilution  $10^{-2}$ . Tous les décomptes étaient non représentatifs, c'est-à-dire qu'il a été impossible d'obtenir une culture où le nombre de colonies se situait entre 30 et 300. Sur milieu lisier 50%, une croissance confluyente semblait occuper toutes les boîtes de Pétri ( $10^0$  à  $10^{-6}$ ) après 24 heures d'incubation. Après une journée de plus, quelques colonies se sont distinguées du reste de la croissance. Tout ce qui semblait être de la croissance a été repiquée sur leur milieu respectif de manière à obtenir des colonies isolées. Les caractéristiques des différentes souches repiquées et leur morphologie cellulaire sont présentées au Tableau 13. La diversité semble être aussi élevée sur les deux milieux. Cependant, puisque certaines populations étaient confluyentes sur les milieux lisier 50%, des inoculums ont été prélevés à plusieurs endroits sur la gélose où la croissance montrait une apparence différente. Plusieurs repiquages ont été faits pour permettre d'isoler les souches thermophiles. Les cultures demandaient entre 48 et 72 heures d'incubation à 60°C. Encore une fois, plus les souches étaient repiquées, plus elles se ressemblaient. Les souches 60S2, S3 et S5 sont toutes trois devenues vertes avec un contour rose.

Toutes les souches isolées à 40 et à 60°C ont été conservées sur leur milieu respectif à 4°C, protégées par une membrane de "parafilm".

#### ***3.4.2.3. Identification des différentes souches bactériennes cultivables isolées à 40 et 60°C***

Les souches isolées à 60°C ont été repiquées en bouillon pour obtenir une croissance importante à des fins de conservation et d'extraction d'ADN génomique. Les souches isolées sur gélose sang ont étéensemencées dans un bouillon TSB et celles isolées de la gélose lisier, dans un bouillon lisier 50%. Aucune croissance n'a été obtenue dans ces milieux liquides. Nous avons donc procédé de la même façon qu'avec les souches pures pour obtenir de la biomasse de celles isolées à 40 et 60°C. Plus précisément, les milieux gélosés ont étéensemencés pour obtenir une croissance confluyente et cette biomasse a été récupérée directement du Pétri avec du PBS pH 8.0, 0.02M. De ces suspensions, 1 mL a été conservé à -80°C dans du glycérol (10% (v/v) ) et le reste a été utilisé pour l'extraction de l'ADN génomique. Les souches congelées ont été décongelées puis repiquées sur leurs milieux respectifs afin de vérifier si elles avaient la

**Tableau 13. Description de la morphologie coloniale et cellulaire des colonies isolées à 60°C.**

Colonies	Description coloniale	Description cellulaire
60S1	Vertes.	Gram -; bâtonnets grands et minces.
60S2	Roses-orangées.	Gram+/-; bâtonnets grands et minces, certains granules foncés à l'intérieur.
60S3	Roses.	Gram +; bâtonnets moyens et minces; parfois en chaînes.
60S4	Rondes; vertes-nuageuses; plates; contours réguliers mais pas bien définis (nuageux); opaques; lisses; crémeuses; 1.5 mm.	Gram -; bâtonnets grands et minces.
60S5	Vertes; centres foncés et contours pâles; plates; étendues; lisses; crémeuses.	Gram +; bâtonnets moyens et minces.
60S6	Grandes gluantes.	Gram +; bâtonnets petits et minces, déformés sur les rebords et granules foncées à l'intérieur.
60S7	Vertes; contours granulés.	N.D.
60L1	Rondes; blanches; velours.	Gram -; bâtonnets très grands et minces.
60L2	Grises-blanches; rugueuses; aspect de velours.	Gram -; bâtonnets moyens; spores subterminales et terminales déformantes.
60L3	Rondes; blanches; contours réguliers nuageux (mal définis); plates; lisses; crémeuses; 1.5 mm.	Gram -; bâtonnets moyens et grands; minces; les moyens ont une spore centrale déformante.
60L4	Étendues; granuleuses; transparentes; pas de colonies distinctes.	Gram +/-; bâtonnets petits et moyens; minces.
60L5	Laitieuses; lisses; pas de colonies distinctes.	Gram +/-; grands filaments.
60L6	Rondes; blanches translucides; contours réguliers; bombées; lisses; crémeuses; petites.	Gram +/-; petits bâtonnets minces; coccobacilles minces en paires; longs bâtonnets minces avec spores terminales déformantes.
60L7	Étendues; nervurées.	N.D.
60L8	Étendues; point au centre.	N.D.

N.D.: Non disponible

capacité de croître à nouveau. Plusieurs souches ont été incapables de pousser de nouveau autant pour celles qui avaient été isolées à 40°C que celles obtenues à 60°C. Les différentes souches qui ont été aptes à croître suite à la congélation ainsi que leurs caractéristiques morphologiques sont présentées au Tableau 14. Suite à l'extraction de l'ADN total de ces souches et à l'amplification de la même région de l'ADNr 16S effectuée sur les échantillons lors du suivi des populations (région hypervariable V3), les produits de PCR des souches cultivables à 60°C ont été analysés sur DGGE afin de faire une première classification (Figure 17, a). On peut remarquer que la moitié des souches isolées à partir du milieu contenant du sang correspondent au groupe 11b et que cinq souches sur neuf isolées sur gélose lisier appartiennent au groupe 12a. Les souches 60S4b, 60L7 et 60L8 ne semblent pas correspondre aux bandes préalablement identifiées dans l'échantillon de référence t17 (cycle O). Une nouvelle extraction d'ADN génomique des souches 60S1 et 60L6 a été réalisée et une nouvelle amplification aussi a été faite pour vérifier si nous obtenions toujours plus d'une bande lors de leur analyse sur DGGE. La souche 60L8 a pu être regroupée avec les souches appartenant au groupe 12a. Cependant, la souche 60S1 montrait toujours plus d'une bande. Pour faciliter le séquençage, cette souche et toutes les autres, possédant plus d'une bande, ont été mises de côté.

Les souches isolées à 40°C ont également été analysées par DGGE. Contrairement aux souches isolées à 60°C, seule la souche 40S1e correspond à une bande observable dans l'échantillon t17 (Figure 17, b) c'est-à-dire au groupe 18b. Plusieurs souches apparemment pures présentaient plus d'une bande. Une fois encore, ces souches n'ont pas été retenues pour le séquençage. La figure 18 montre les positions des bandes correspondantes aux souches retenues mais qui n'apparaissent pas dans l'échantillon de référence t17. Le tableau 14 précédemment cité donne le numéro de groupe de chacune des souches retenues. Le nombre de souches cultivables obtenues selon le groupe auquel elles semblent correspondre est illustré à la Figure 19. La souche 40S5 qui correspond à la bande 30 de la Figure 19 n'a pas été séquencée en raison d'un oubli.

**Tableau 14. Caractéristiques des souches cultivables qui ont survécu à la congélation et leur appartenance au groupe de référence sur DGGE**

Colonies	Description coloniale	Description cellulaire	Groupe DGGE
40S1a	Rondes; blanches; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; légèrement surélevées; 1 mm et -.	Gram -; petits coccobacilles; en grappes; n.m.; n.sp.; 1.35 µm x 0.7 µm.	31
40S1b	Rondes; blanches; opaques; contours plus pâles et réguliers; lisses; crémeuses; légèrement surélevées; 2mm et -.	Gram +; Coccis; en grappes ou en paires; n.m.; n.sp.; 1.35 µm.	-
40S1c	Rondes; centres blancs opaques; contours transparents réguliers; lisses; crémeuses; 0.5 mm et -.	Gram +; coccobacilles; n.m.; n.sp.; 1.35 µm x 0.7 µm.	-
40S1d	Rondes; blanches; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; bombées; 0.5 mm et -; forment un halo verdâtre sur gélose sang autour et sous les colonies.	Gram +; coccobacilles en chaînes ou en grappes; n.m.; n.sp.; 1.35 µm x 0.7 µm.	29
40S1e	Rondes; blanches; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; bombées; 0.5 mm et -; forment un halo verdâtre sur gélose sang autour et sous les colonies.	Gram +; coccobacilles en chaînes; n.m.; n.sp.; 1.35 µm x 0.7µm.	18b
40S2	Irrégulières; blanches; opaques; contours irréguliers; lisses; crémeuses; plates; 1mm. Rondes; grises; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; plates; 0.5 mm et -.	Gram -; bâtonnets; n.m.; n.sp.; 2 µm x 0.7 µm. Gram +; coccis; n.m.; n.sp.; 1.35 µm.	-
40S3	Rondes; blanches-grisâtres; opaques; contours réguliers; ressemblent à une cible, contours et centres blancs, entre les deux gris; lisses; crémeuses; plates; 3 mm.	Gram -; bâtonnets seuls, en paires ou en chaînes; n.m.; n.sp.; 3.4 à 8.1 µm x 0.7 µm.	-
40S4	Rondes; blanches-grisâtres; opaques; contours réguliers; ressemblent à une cible, contours et centres blancs, entre les deux gris; lisses; crémeuses; plates; 3 mm. Rondes; blanches-grisâtres; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; 1 mm et -.	Gram +; petits bâtonnets courts; majoritairement en paires; n.m.; n.sp.; 1.35 µm x moins de 0.7 µm.	-
40S5	Rondes; blanches-rosées; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; plates; 2 mm et -. Irrégulières; translucides; contours irréguliers; surfaces irrégulières; plates; 1 mm et -.	Gram +; bâtonnets droits moyens; mobiles; n.sp.; 4.1 µm x 0.7 µm. Gram +; bâtonnets moyens à longs; en paires, quelques fois en chaînes; n.m.; n.sp.; 5.4 µm x 0.7 µm.	30
40S6	Rondes; grises; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; plates; 0.5 mm et -.	Gram -; bâtonnets très longs et d'autres courts; seuls ou en chaînes; n.m.; 1.35 à 6.1 µm x moins de 0.7 µm.	-
40S7	Microcolonies rondes; translucides.	Gram -; bâtonnets courts; seuls ou en paires; n.m.; n.sp.; 2 µm x 0.7 µm.	-
40L2	Rondes; beiges; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; surélevées; 1mm et -.	Gram -; bâtonnets droits; n.m.; n.sp.; 2.7 µm x 0.7 µm.	29
40L3	Rondes; beiges; transparentes; contours lobés; pas lisses mais pas rugueuses (surface irrégulière); crémeuses; plates; 0.5 mm et -.	Gram +; bâtonnets droits; courts; n.m.; n.sp.; verdâtres (lumineux); 2 µm x moins de 0.7 µm.	29

n.m.: non mobile

n.sp.: non sporulée

**Tableau 14 suite. Caractéristique des souches cultivables qui ont survécu à la congélation et appartenance au groupe de référence sur DGGE**

Colonies	Description coloniale	Description cellulaire	Groupe DGGE
60S1	Rondes; beiges-verdâtres; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; légèrement surélevées; 2 mm <sup>a</sup> et -.	Gram -; bâtonnets; moyens; 5.4 µm de longueur x 1.3 µm de largeur (dans cet ordre pour toutes les autres dimensions)	-
60S1b	Rondes; vertes; opaques; contours crénelés; lisses; crémeuses; plates; 1 à 2 mm.	Gram +/-; bâtonnets longs et minces (filaments); bâtonnets moyens; n.m.; n.sp.; 5.4 µm x moins de 0.7 µm.	12a
60S2	Rondes; beiges-rosées; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; plates; 1.5 mm.	Gram -; bâtonnets droits; n.m.; n.sp.; 2.7 µm x 0.7 µm.	11b
60S3	Rondes; roses et vertes; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; plates; 3 mm et -.	Gram +; bâtonnets droits; certains moins larges et plus longs que les autres; n.m.; 3.4 µm x 0.7 µm	11b
60S4	Rondes; vertes; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; plates; 2 mm et -.	Gram +/-; bâtonnets longs et minces (filaments) et bâtonnets plus courts et plus larges; n.m.; 6.75 µm x moins que 0.7 µm et 2.7 µm x 0.7 µm	12a
60S5	Rondes; vertes et roses; opaques; les vertes ont un contours roses; contours réguliers; lisses; crémeuses; plates; 2 mm et -.	Gram +; bâtonnets moyens; minces; n.m.; n.sp.; 2.7 µm x moins de 0.7 µm.	11b
60S6	N.D.	N.D.	11b
60L1bb	Rondes; beiges-rosées; opaque; contours crénelés; lisses; crémeuses; petit point au centre surélevé; 1.5 mm et -	Gram -; bâtonnets très minces et longs (filaments); plusieurs en chaînes; spores déformantes et ovales; n.m.; 12.1 µm x moins de 0.7 µm	12a
60L1p	Rondes; beiges; transparentes; très petites colonies 0.5 mm et -.	Gram -; bâtonnets courts; droits; en chaînes; n.m.; n.sp.; 2.7 µm x 0.7 µm.	12a
60L2	Rondes; beiges; opaques; contours crénelés; plates; 2 mm et -.	Gram -; longs bâtonnets minces (filaments); en chaînes; sporulées; n.m.; 5.4 µm x moins de 0.7 µm.	12a
60L3	Formes irrégulières; beiges; opaques; contours irréguliers; plates; rugueuse; crémeuses; 2 mm diam et -	Gram -; longs bâtonnets minces (filaments); n.m.; n.sp.; 9.5 à 23.6 µm x moins de 0.7 µm.	12a
60L4	Rondes; roses; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; plates; plus foncées au centre; 1 à 4 mm.	Gram +; Bâtonnets; droits; courts; n.m.; n.sp.; 2.7 µm x 0.7 µm.	11b
60L5	Rondes; beiges; opaques; contours réguliers; lisses; crémeuses; légèrement surélevées; 1 mm et -.	Gram -; Bâtonnets longs et minces (filaments); quelques uns en chaînes; spores déformantes; n.m.; 10.1 µm et plus x moins de 0.7 µm.	12a
60L7 <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	28
60L8 <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	28

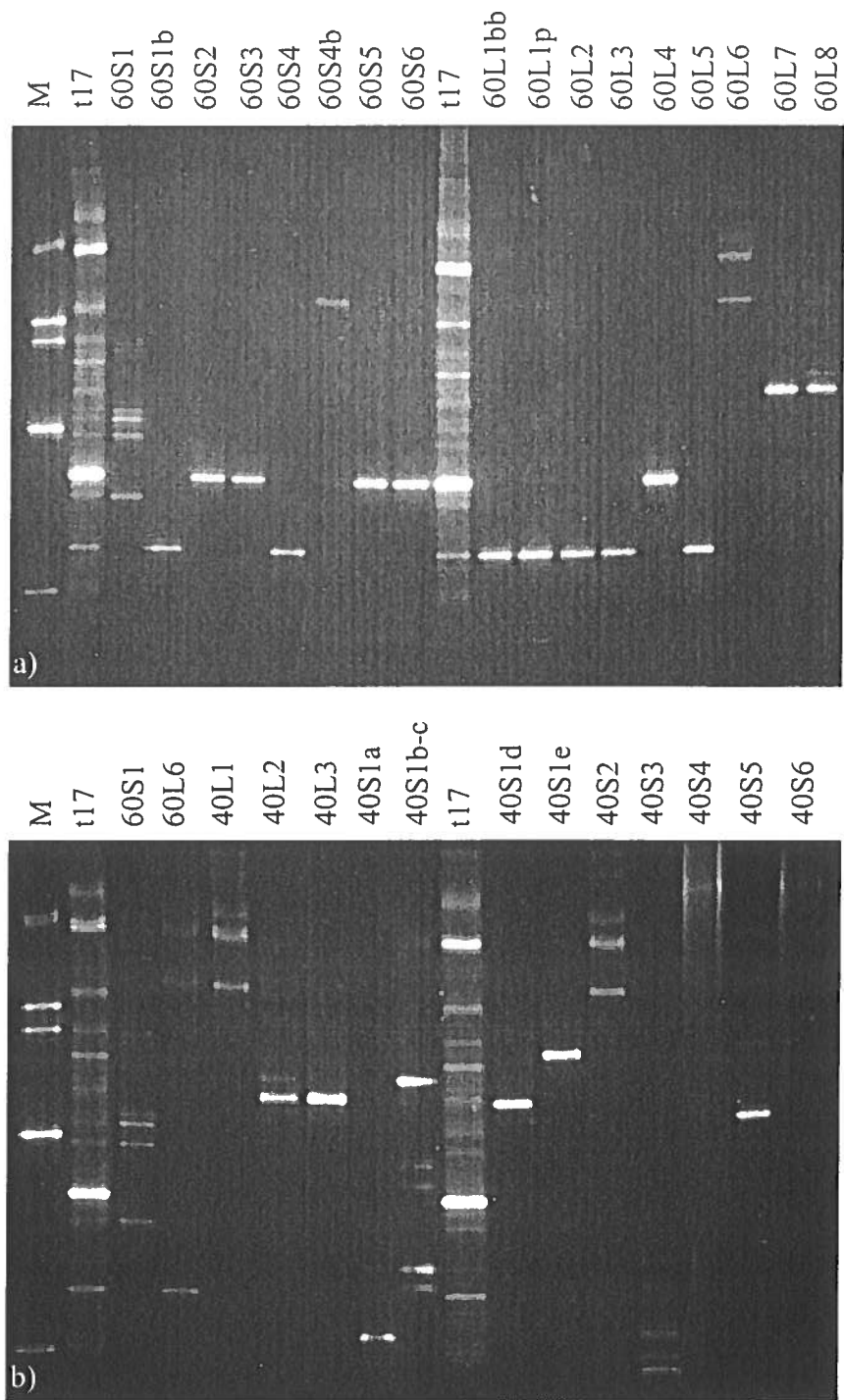
<sup>a</sup>: Dimension du diamètre de la colonie

<sup>b</sup>: Ces souches n'ont pas été apte à croître suite à leur congélation, ADN des cultures initiales (avant congélation) utilisé pour PCR-DGGE

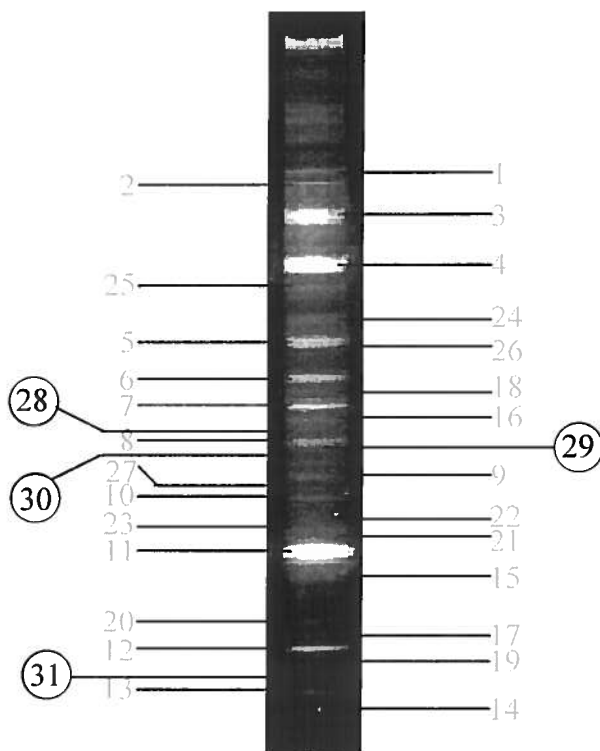
-: Lorsque ce symbole dans la colonne pour leur groupe sur DGGE, signifie que bandes multiples sur le gel

n.m.: non mobile

n.sp.: non sporulée

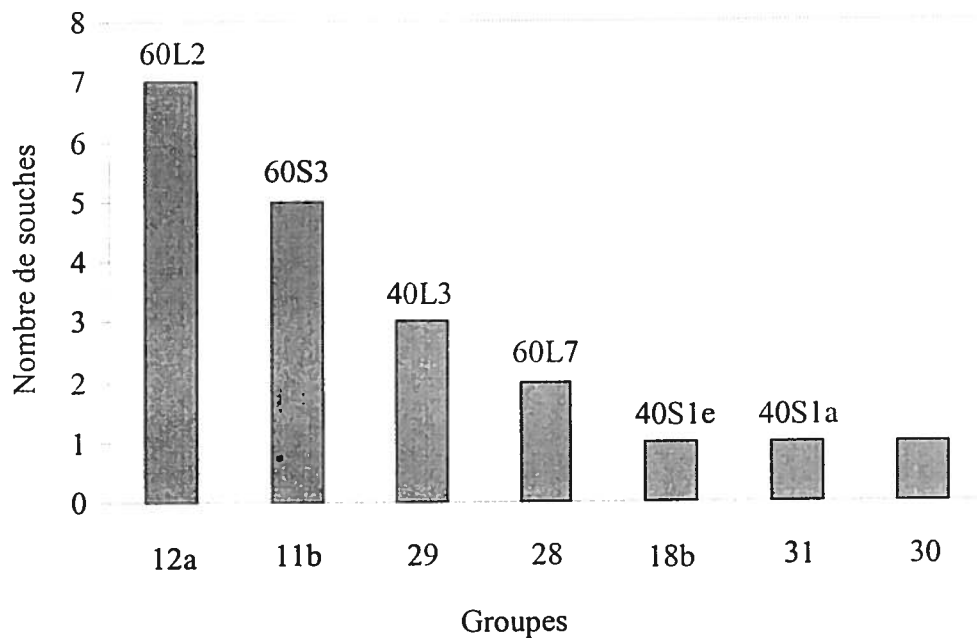


**Figure 17. Correspondance des souches cultivables avec l'échantillon de référence t17 (cycle O).** La correspondance a été effectuée à l'aide d'un gel DGGE. a) Souches cultivables à 60°C b) Souches cultivables à 40°C et deux de celles cultivables à 60°C.



**Figure 18. Nouvelles positions obtenues suite à l'analyse des souches cultivables par DGGE.** Les groupes encerclés correspondent aux nouvelles positions obtenues par observations des souches cultivables sur DGGE. Les autres groupes sont ceux qui ont été préalablement déterminés lors de l'évaluation de l'échantillon t17.





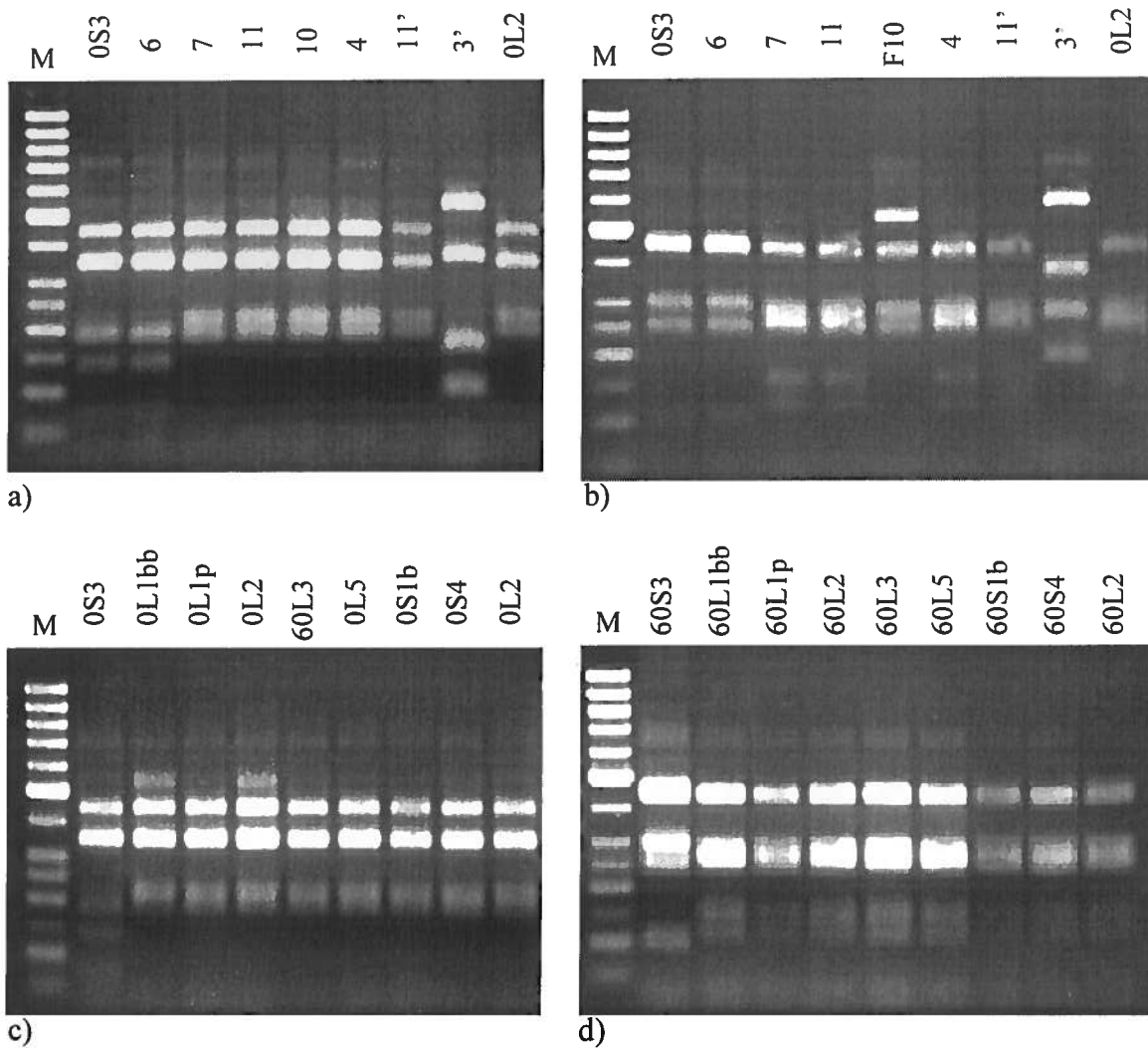
**Figure 19. Nombres de souches cultivables obtenues par rapport à leur appartenance à un des groupes de référence.** Suite à l'analyse sur DGGE des différentes souches bactériennes isolées, elles ont été rassemblées selon les groupes de l'échantillon t17 auxquels elles semblent correspondre. La souche identifiée au-dessus de chaque bande de l'histogramme est celle qui a été séquencée. Pour le groupe 30, la souche correspondante 40S5 n'a pas été séquencée.

Lorsque plusieurs souches sont apparentées (même groupe) un seul représentant a été séquencé. Les souches suivantes ont été retenues pour le séquençage: 60S3, 60L2, 60L7, 40S1a, 40S1e et 40L3. Les souches 40S1a et 40S1e ont été obtenues suite à un repiquage d'une colonie de la souche 40S1. Cependant, cinq morphologies coloniales différentes avaient été observées (40S1a, b, c, d et e) suite à ce repiquage (Tableau 14).

Suite à l'analyse des séquences obtenues, 75% (15/20) des souches isolées appartiennent à la famille des *Bacillaceae* tandis que quatre autres souches sont plus ou moins apparentées à des espèces de la famille des *Micrococcaceae*. L'appendice IV contient plus de détails sur l'appartenance de chaque groupe. Les séquences ont aussi fait l'objet d'une analyse phylogénique plus poussée (section 3.4.3.).

#### **3.4.2.4. Analyse des groupes 12 et 18**

Suite au séquençage, deux représentants du groupe 12, soit le clone A6 et la souche 60L2, se sont avérés assez différents (homologie de 79%) . Tous les membres du groupe 12 (clones et souches cultivables) ont donc été analysés par une autre méthode de criblage, le RFLP avec deux enzymes de restriction, afin de confirmer leur groupe d'appartenance et de vérifier la présence potentielle d'une erreur. Au total, sept clones et sept souches cultivables ont été analysés de cette façon. La souche 60S3, représentant le groupe 11b, a aussi été incluse dans ces expériences car sa séquence était très apparentée au clone A6 (homologie de 99%). Les patrons de restriction de A6 et 60S3 sont effectivement identiques. Une re-vérification par DGGE a montré que le clone A6 avait été mal classé initialement et faisait en fait partie du groupe 11b (résultats non présentés). Par contre, les six autres clones sont différents. Ceux-ci se divisent en trois groupes. Le groupe 12 a donc été scindé en trois, soit 12a (A7, A11, H4, A11'), 12b (F10) et 12c (B3'). Pour les souches cultivables, les patrons de digestion n'indiquent pas de différence, chacun étant similaire à ceux du groupe 12a. Il est à noter que la bande supplémentaire visible pour 60L1bb et 60L2 est un artéfact dû à une digestion partielle, ce qui a été confirmé par une autre digestion avec la même enzyme (résultat non présenté). Des clones additionnels ont donc été séquencés en tant que représentant des



**Figure 20. Patrons de restriction pour les clones et les souches cultivables membre du groupe 12.** Les digestions ont été effectuées sur les clones du groupe 12 avec a) HhaI et b) DdeI et sur les souches cultivables du groupe 12 avec c) HhaI et d) DdeI. M : marqueur. Pour les gels avec les digestions de clones, la lettre et le chiffre indiquent la position du clone sur la plaque de 96 puits, l'apostrophe (') indique que le clone est sur la deuxième plaque de 96 puits.

nouveaux groupes créés. Il s'agit du clone A7 et de la souche 60L1bb pour le groupe 12a, du clone F10 pour le groupe 12b et du clone B3' pour le groupe 12c. L'analyse des séquences a montré que ces souches étaient homologues à 99% à l'exception de B3' (groupe 12c). Une DGGE a donc été refait avec B3'. La bande principale était bien vis-à-vis celle du groupe 12 mais une bande secondaire relativement importante était visible entre la bande du groupe 27 et celle du groupe 10 (résultats non présentés).

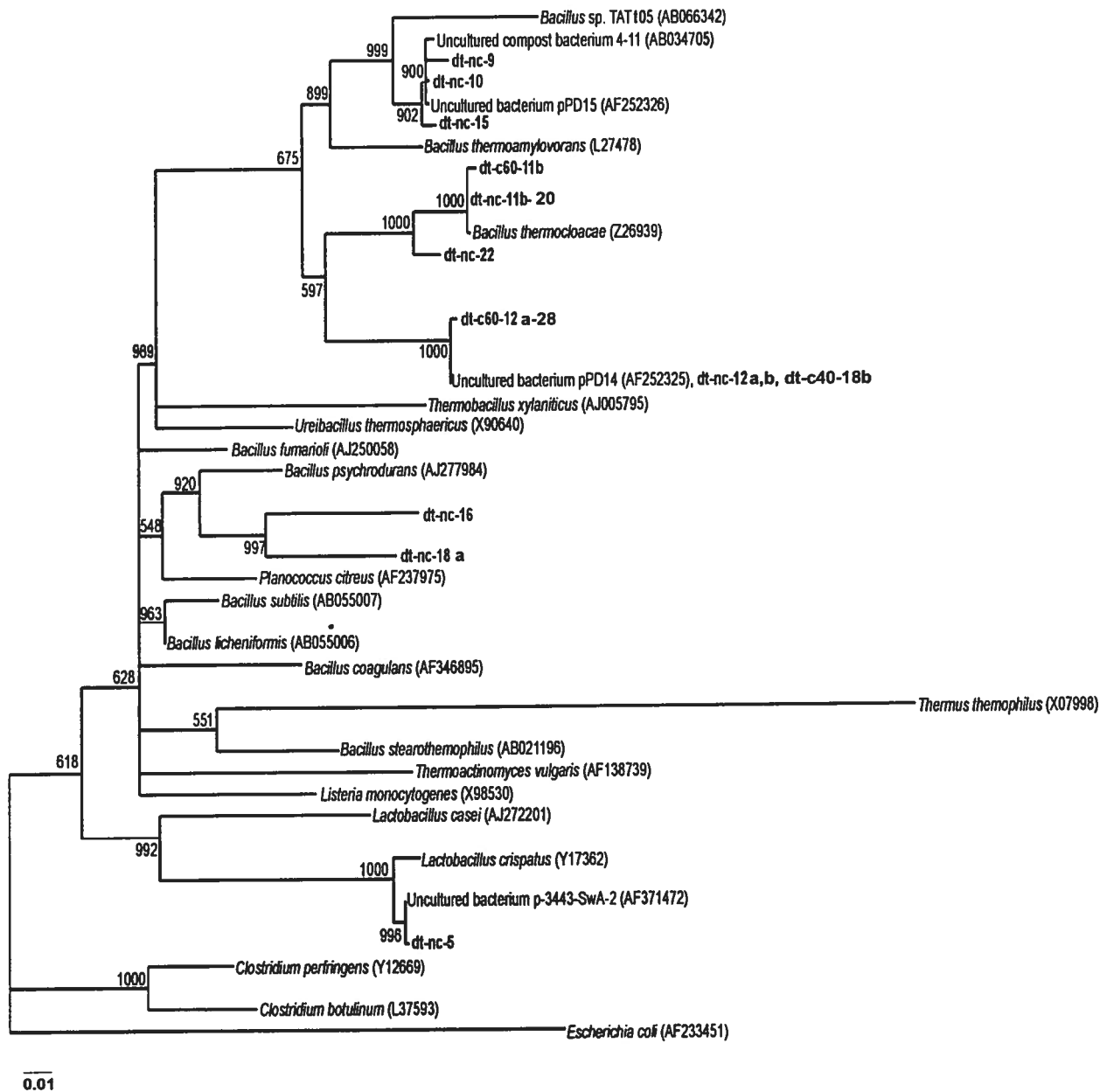
Un autre problème de classement a été détecté pour le groupe 18 qui contient deux clones (H11 et C7') et une souche cultivable (40S1e). Les deux représentants séquencés (H11 et 40S1e) montraient une homologie de seulement 83% et ne devraient donc pas être dans le même groupe. Le groupe 18 a donc été scindé en deux, soit 18a (H11 et C7') et 18b (40S1e). L'appartenance de C7' au groupe 18a n'a cependant pas été confirmée par une autre méthode (RFLP ou séquençage)

### **3.4.3. Étude phylogénique des microorganismes présents dans le bioréacteur (cultivables et non cultivables)**

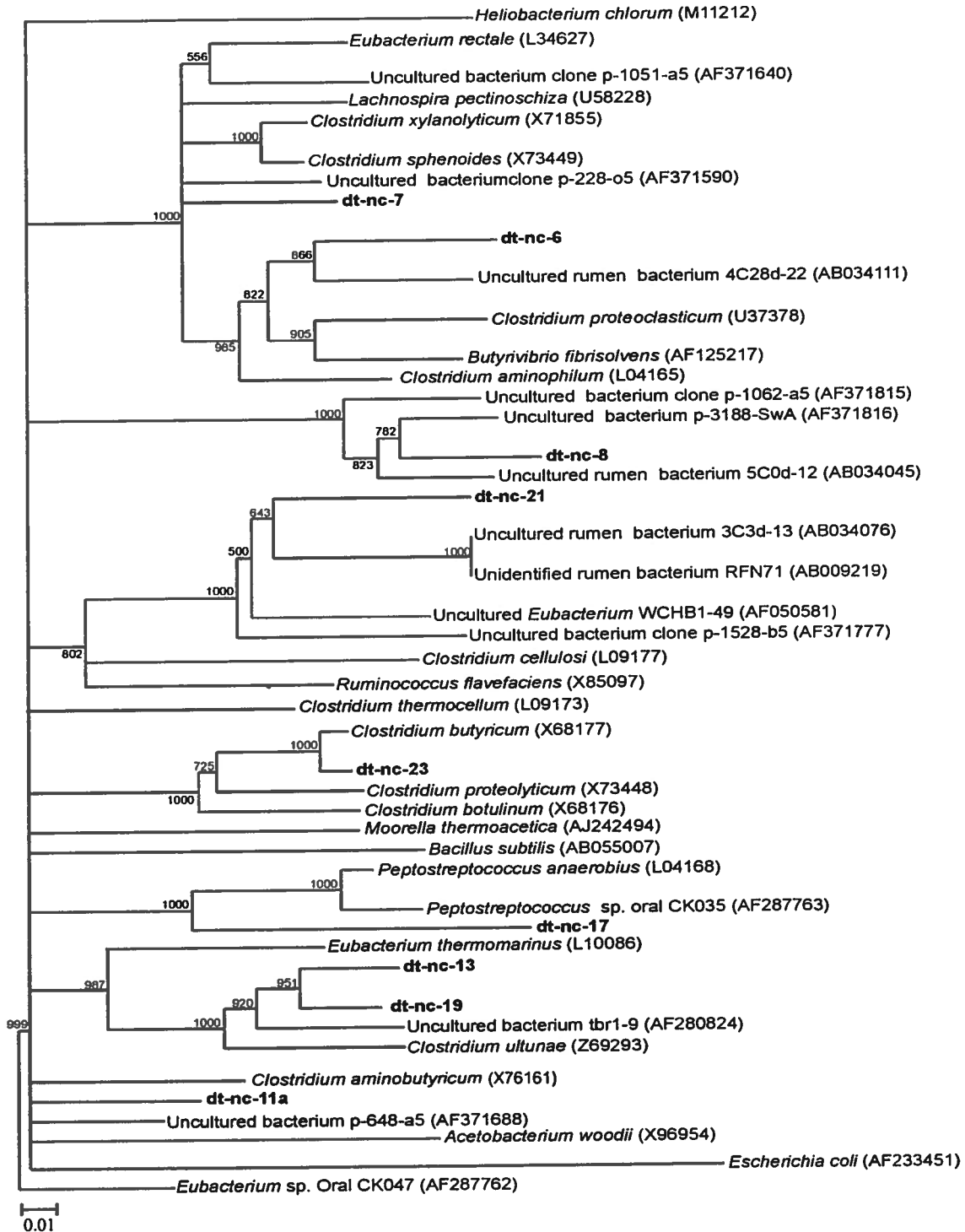
Toutes les séquences obtenues ont été analysées afin de pouvoir élaborer des arbres phylogéniques. Il est alors possible d'observer la diversité des microorganismes présents dans un environnement aérobie thermophile où le substrat est le lisier de porc (Figures 21, 22, 23, 24).

Les séquences obtenues pour les représentants des groupes de clones sont identifiées par les lettres "dt-nc-#", où "nc" correspond au terme "non cultivée" et "#" au groupe correspondant sur DGGE. Les séquences des représentants des souches isolées en culture pure sont identifiées par les chaînes de caractères "dt-c40-#" et "dt-c60-#", où "c" signifie "cultivée", les nombres 40 et 60 désignent la température à laquelle les souches ont été isolées et "#" est le numéro du groupe sur DGGE.

Selon les espèces répertoriées dans les arbres phylogéniques suivants, une grande partie (6/20) des espèces retrouvées dans le bioréacteurs sont apparentées à la famille des Bacillales (Figure 21) dont 75% (15/20) des souches obtenues par culture. Pour faciliter la lecture de cet arbre, les séquences montrant 99% d'homologie ou plus ont été considérées comme identiques. Une autre partie importante (8 espèces sur 19) des

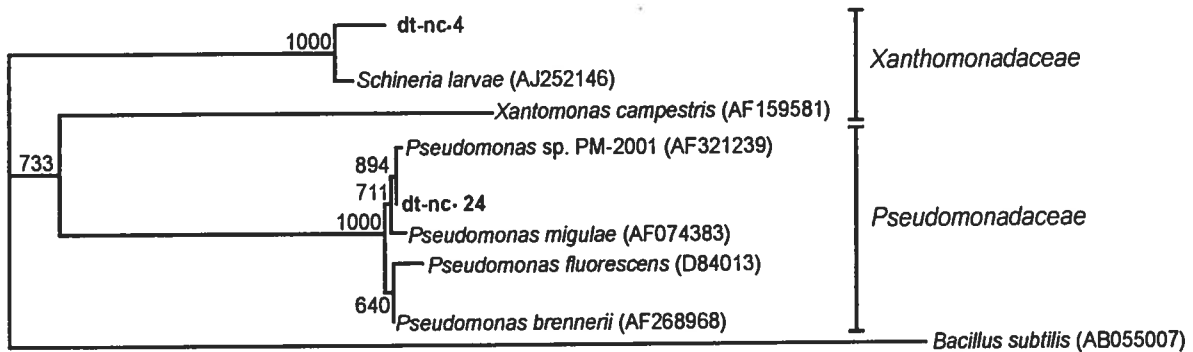


**Figure 21. Relation phylogénique des clones et des souches cultivables du bioréacteur aérobique thermophile avec des membres de la famille des *Bacillaceae* et des *Lactobacillaceae*. L'ADN ribosomal 16S a servi d'outil de comparaison. L'analyse statistique de type "bootstrap" a été effectuée à partir de 1000 réarrangements aléatoires des séquences. Seules les embranchements dont les valeurs "bootstrap" sont de plus de 500 ont été illustrés.**



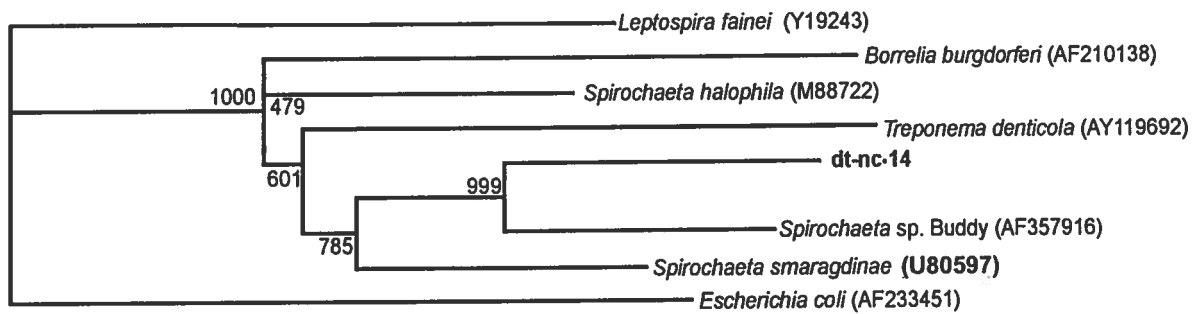
**Figure 22. Relation phylogénique des clones du bioréacteur aérobie thermophile avec des membres de la famille des *Clostridiaceae*.** L'ADN ribosomal 16S a servi d'outil de comparaison. L'analyse statistique de type "bootstrap" a été effectuée à partir de 1000 réarrangements aléatoires des séquences. Seules les embranchements dont les valeurs "bootstrap" sont de plus de 500 ont été illustrés

a)



0.01

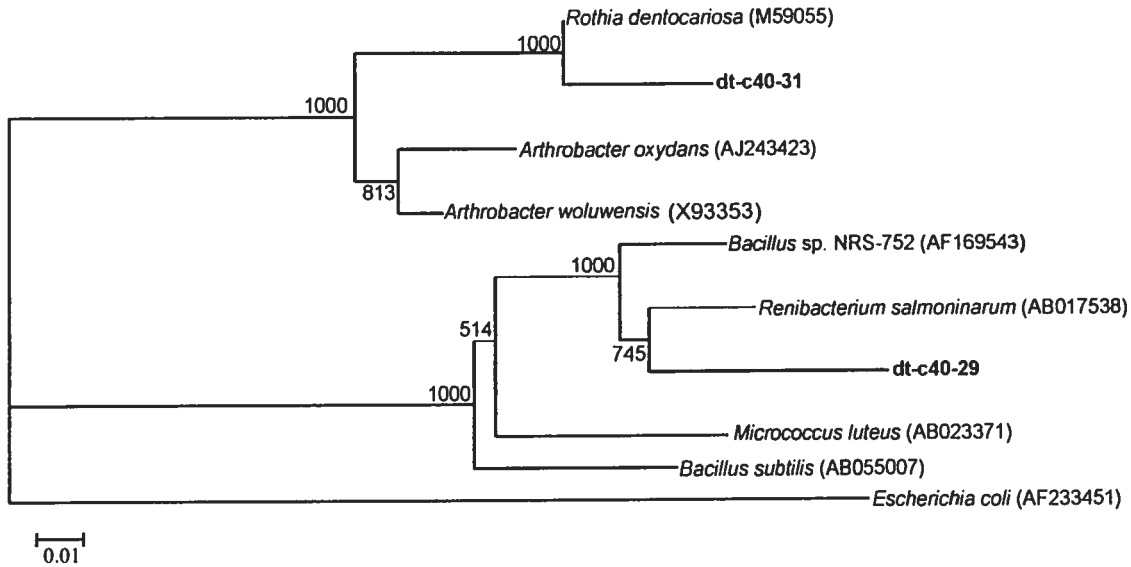
b)



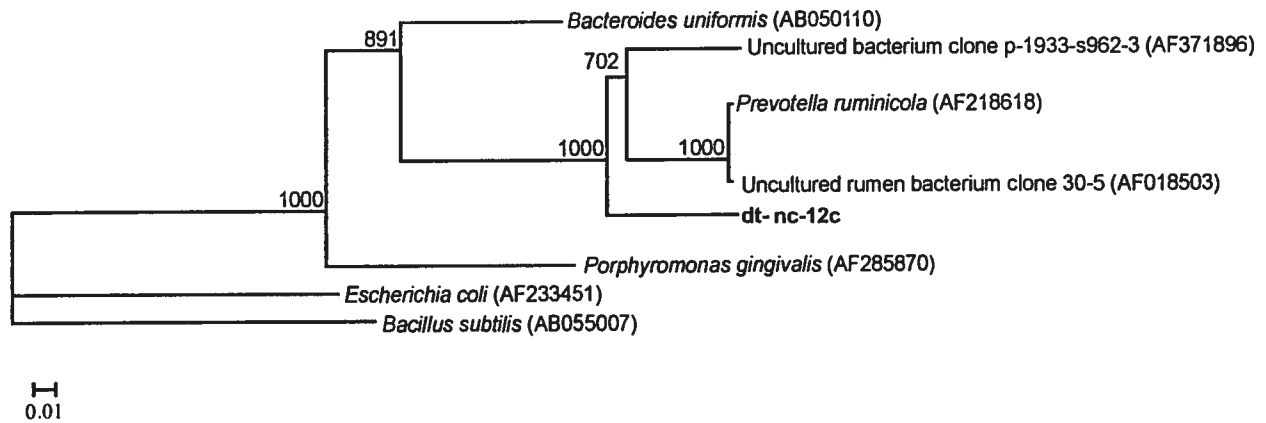
0.01

**Figure 23. Relation phylogénique des clones du bioréacteur aérobique thermophile avec des membres du sous-groupe des gamma-Proteobacteria et de la famille des Spirochetaceae.** a) gamma-Proteobacteria, b) Spirochetaceae. L'ADN ribosomal 16S a servi d'outil de comparaison. L'analyse statistique de type "bootstrap" a été effectuée à partir de 1000 réarrangements aléatoires des séquences. Seules les embranchements dont les valeurs "bootstrap" sont de plus de 500 ont été illustrés.

a)



b)



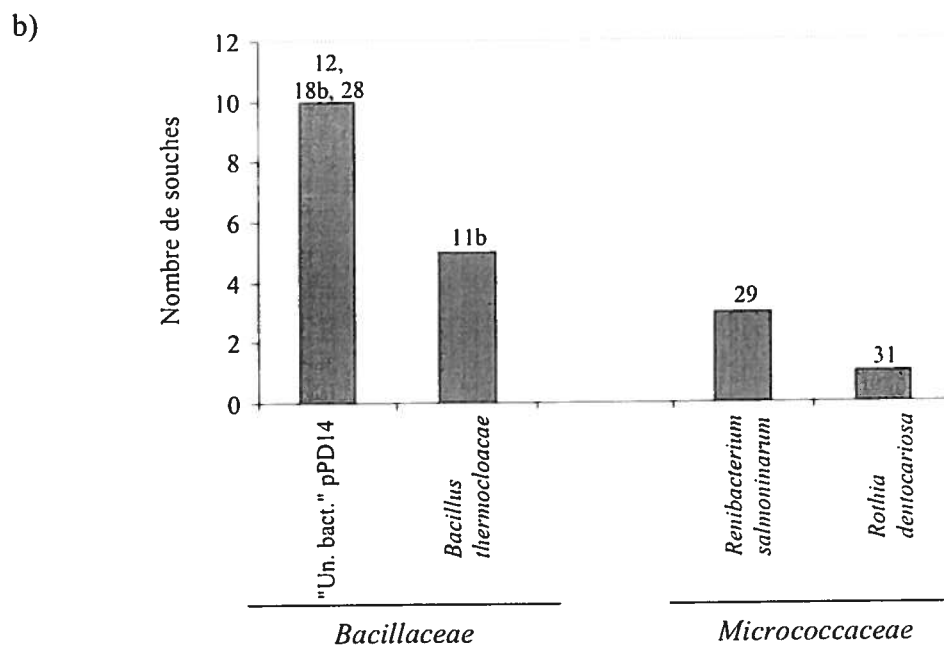
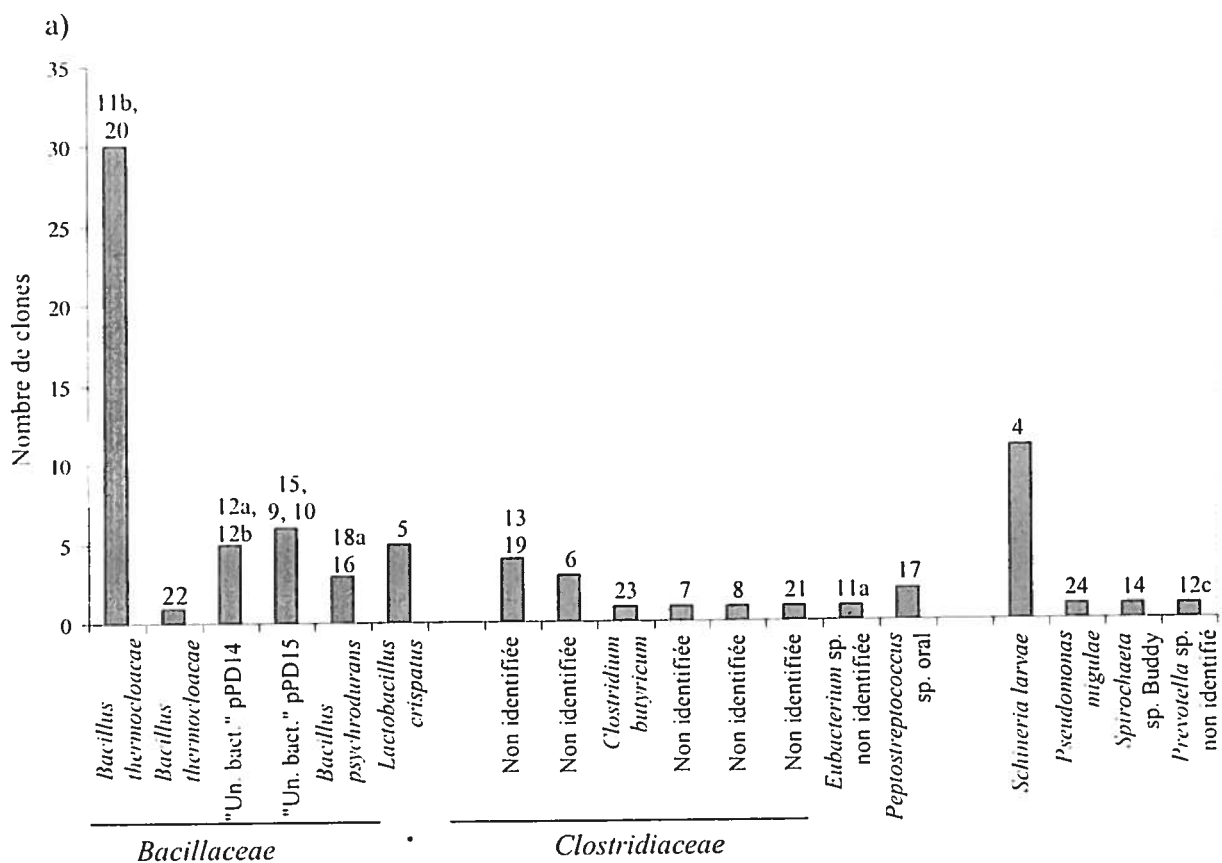
**Figure 24. Relation phylogénique des clones et des souches cultivables du bioréacteur aérobique thermophile avec de la famille des *Micrococcaceae* et des *Bacteroidales*. a) *Micrococcaceae* b) *Bacteroidales*. L'ADN ribosomal 16S a servi d'outil de comparaison. L'analyse statistique de type "bootstrap" a été effectuée à partir de 1000 réarrangements aléatoires des séquences. Seules les embranchements dont les valeurs "bootstrap" sont de plus de 500 ont été illustrés.**



microorganismes retrouvés dans le bioréacteur se rapprochent des Clostridiales (Figure 22). Finalement, les autres bactéries correspondent de près ou de loin au sous-groupe des gamma-*Proteobacteria* (Figure 23) et aux familles des *Spirochaetaceae* (Figure 23), des *Micrococcaceae* (Figure 24) ou des Bacteroïdes (Figure 24).

La figure 25 récapitule l'appartenance et la proportion de chaque groupe, qu'ils proviennent de la librairie de clones ou des souches isolées sur milieux de culture. Suite au séquençage et aux recherches dans les bases de données informatiques, les clones se sont répartis dans 18 espèces différentes.

Pour les souches cultivables, quatre espèces différentes ont été trouvées dont deux n'étaient pas présentes dans la banque de clones. La biodiversité du bioréacteur s'étend donc à 20 espèces différentes.



**Figure 25. Représentation des différentes espèces obtenues dans le bioréacteur aérobique thermophile.** a) Espèces retrouvées lors de l'élaboration de la génothèque. b) Espèces retrouvées chez les souches cultivables. Les bandes sont regroupées selon l'espèce et elles sont identifiées par leur groupe respectif (nombres au-dessus).

### 3.5. Destruction des pathogènes

La recherche de certains microorganismes pathogènes a été effectuée sur le lisier brut et sur l'effluent sortant des bioréacteurs afin de déterminer si ces derniers sont détruits par le traitement thermophile subit par le lisier. Pour ces essais, les deux bioréacteurs opéraient à des températures différentes. La température du premier réacteur (R1) était non contrôlée et atteignait 75°C tandis que celle du réacteur deux (R2) était limitée à 50°C. Les résultats préliminaires obtenus sont résumés au Tableau 15.

Les premiers tests pour la détection des coliformes fécaux nous ont tout d'abord permis d'observer la destruction de ces microorganismes suite au traitement thermophile. Deuxièmement, nous avons observé la croissance de colonies couleur crème suivant le traitement. Cependant, ces bactéries ne sont pas des coliformes fécaux, ces derniers se caractérisant par une pigmentation bleue sur mFC. Le nombre des colonies crèmes était plus abondant dans les échantillons provenant du réacteur maintenu à 50°C (R2), ces colonies ayant été détectées jusqu'à une dilution de  $10^{-3}$ . Pour le réacteur ayant atteint une température de 75°C (R1), elles ont poussé suite à l'inoculation effectuée avec de l'échantillon concentré et celui dilué 1/10 seulement.

Aucune espèce de *Salmonella* n'a été détectée dans le lisier brut. Certaines populations bactériennes ont réussi à croître sur le milieu sélectif XLT4, comme *E. coli* et *Pseudomonas*. La présence de *E. coli* a d'abord été détectée par inoculation d'une colonie sur un milieu EMB. Sur cette gélose, les colonies de *E. coli* ont la particularité d'avoir un reflet vert métallique. Son identité a été confirmée par galerie API. Pour *Pseudomonas*, la colonie a été ensemencée sur un milieu sélectif pour *Pseudomonas* et possédait les caractéristiques propres à ce genre bactérien, c'est-à-dire une coloration verte pâle. Suite au traitement thermophile dans les réacteurs R1 et R2, aucune colonie n'a été observée sur milieux XLT4.

*Yersinia enterocolitica*, n'a pas été détectée dans le lisier brut. Plusieurs colonies étaient présentes sur le milieu CIN et beaucoup sur MacConkey mais suite à la suspension de l'échantillon dans une solution alcaline-saline, peu de croissance était visible sur milieu CIN et légèrement plus sur milieu MacConkey. Cette suspension a été

**Tableau 15. Détection de microorganismes pathogènes dans le lisier de porc brut et vérification de leur destruction suite au traitement aérobique thermophile**

Microorganismes	Nombre détecté (UFC/mL)			Taux de destruction	
	lisier brut	effluents traités		R1 <sup>a</sup>	R2 <sup>b</sup>
		R1 <sup>a</sup>	R2 <sup>b</sup>		
Coliformes fécaux <sup>c</sup>	9.60x10 <sup>2</sup> ± 452	<1 <sup>d</sup>	<1 <sup>d</sup>	99.99%	99.99%
<i>Clostridium perfringens</i>	1.99x10 <sup>3</sup> ± 28	1 ± 1.4	14 ± 2.1	99.95%	99.30%
<i>Campylobacter</i> , spp.	4.36x10 <sup>2</sup> ± 12 <sup>e</sup>	<1 <sup>d</sup>	<1 <sup>d</sup>	99.99%	99.99%

<sup>a</sup> Réacteur 1 (R1): pas de contrôle de température, atteint environ 75°C

<sup>b</sup> Réacteur 2 (R2): température du réacteur limitée à 50°C

<sup>c</sup> Nombre établi suite aux confirmations et consiste en la moyenne du duplicata

<sup>d</sup><1: inférieur au seuil de détection

<sup>e</sup>: moyenne de deux essais qui ont été effectués en triplicata

réalisée pour permettre une deuxième sélection, puisque le genre *Yersinia* est tolérant aux pH alcalins. Cependant, aucune colonie ne présentait la morphologie propre à *Y. enterocolica* c'est-à-dire petite (1-2 mm de diamètre), plate, sans couleur ou rose pâle sur gélose MacConkey ou bien petite (1-2 mm de diamètre), avec un centre rouge foncé, un contour régulier et entourée d'une zone claire sans couleur sur milieu CIN. Suite à l'enrichissement de dix jours, le nombre de colonies présent sur les milieux avait augmenté mais aucune ne possédait les caractéristiques propres à *Y. enterocolitica*. Des tests de confirmation ainsi que des galeries API 20E ont été réalisés sur les colonies qui semblaient se rapprocher le plus des caractéristiques de *Y. enterocolitica*. Tous se sont avérés négatifs, les souches détectées étant *E. coli*, *Providencia rettgeri* (profil non acceptable) et *Proteus vulgaris* (profil douteux).

Le traitement thermophile semble apte à réduire de façon importante *Clostridium perfringens* qui se reconnaissait par la couleur noire de ses colonies sur milieu TSC. De plus, le genre *Campylobacter* spp., se caractérisant par une coloration grise sur gélose CCDA et présentant une mobilité en zigzag au microscope (catalase +, oxydase +) a été détruit à 99.99% par le traitement.

Pour ce qui concerne *Cryptosporidium parvum* et *Giardia lamblia*, ils n'ont pas été détectés dans le lisier brut. Il nous a donc été impossible de vérifier leur élimination suite au traitement.

## **Chapitre 4. DISCUSSION**

#### 4.1. Évaluation des méthodes utilisées

Tel que soutenu par Amann *et al.* (1995) et par plusieurs autres chercheurs, une diversité microbienne beaucoup plus importante a été détectée à l'aide des outils de biologie moléculaire comparativement à celle observée suite à l'utilisation des méthodes de cultures bactériennes. Quatre espèces microbiennes différentes ont été obtenues par culture et ces dernières appartenaient à seulement deux familles, les *Bacillaceae* qui comptaient 75% (15/20) des souches et les *Micrococcaceae* avec 20% (4/20). Les autres souches n'ont pu être classées dû à la présence de plus d'une bande sur DGGE. Suite à l'utilisation de la biologie moléculaire, c'est-à-dire par clonage et par séquençage d'un membre de chaque groupe, jusqu'à 18 espèces différentes ont été observées. Ces espèces se répartissaient dans six familles microbiennes, les *Bacillaceae*, les *Lactobacillaceae*, les *Clostridiaceae*, les *Eubacteriaceae*, les *Spirochaetaceae* et les *Peptostreptococcaceae*, ainsi que dans le sous-groupe des *gamma-Proteobacteria*. Comme pour les bactéries cultivées, c'est la famille des *Bacillaceae* qui est la mieux représentée avec sept espèces différentes. Les résultats obtenus prouvent effectivement que les techniques utilisant l'ARN ribosomal 16S chez les bactéries comme cible pour observer les populations sont beaucoup plus précises que les méthodes traditionnelles de microbiologie (Amann *et al.*, 1995) vu l'étendu de la biodiversité obtenue.

L'utilisation du PCR-DGGE s'est avérée fort utile pour l'observation des changements de populations microbiennes à l'intérieur d'un cycle de dégradation du lisier de porc mais aussi pour déterminer le moment où une flore stable s'installe dans le bioréacteur. Cependant, certains paramètres sont à respecter pour l'obtention de gels qui donneront le maximum d'information. Tout d'abord, l'application de fragments de 600 pb sur DGGE n'a pas donné une résolution adéquate qui nous aurait permis de distinguer les bandes correspondant aux souches pures et aux différents membres des populations microbiennes complexes. Selon Myers *et al.* (1989), la longueur idéale pour les fragments d'ADN à faire migrer sur ce type de gel se situe entre 100 et 500 pb. La résolution des gels suite à l'application d'amplicons de 200 pb obtenus à l'aide des amorces PRBA341F-GC et PRUN515R, semblait être acceptable mais beaucoup d'artéfacts, c'est-à-dire des bandes supplémentaires qui migraient à la même hauteur pour tous les échantillons purs ou hétérogènes, étaient alors observées. Selon Kowalchuk *et*

*al.* (1997), ces artéfacts ont pu être générés lors de l'amplification. La cause principale serait la position dégénérée (K c'est-à-dire soit T ou G) qui se retrouve dans l'amorce PRUN515R (Kowalchuk *et al.*, 1997). Suite à l'utilisation d'une amorce visant la même région mais qui n'était pas dégénérée, PRUN518R (la position du K est ici occupée par un T), la résolution des DGGE était excellente et les artéfacts n'étaient plus observés sur les gels. Cependant, l'utilisation d'une amorce non-dégénérée peut devenir plus spécifique à certaines populations microbiennes et pourrait faire en sorte que ces dernières seraient favorisées par rapport à d'autres lors de l'amplification. En enlevant la dégénérescence, il est possible que l'abondance relative des différents amplicons soit moins représentative. Nous avons d'ailleurs observé ce phénomène lors de l'élaboration de notre marqueur de référence. Lorsque les ADN génomiques des différentes souches bactériennes pures sélectionnées étaient mélangés ensemble puis amplifiés, l'amplification de *Staphylococcus aureus* était favorisée au dépend des autres souches. Afin d'éviter cette ambiguïté, le remplacement du ou des nucléotides de la position dégénérée par un résidu inosine (Watanabe *et al.*, 2001) aurait pu être envisagé. De cette manière, il aurait été plus facile de rejoindre un plus grand nombre d'espèces microbiennes en évitant de favoriser certaines autres.

Suite au criblage sur DGGE des souches cultivables, nous avons observé, pour quelques-unes d'entre elles, la présence de bandes multiples (Figure 17 b). D'ailleurs, afin d'éviter des problèmes d'interprétations, les souches cultivables possédant plusieurs bandes n'ont pas été séquencées. Ce phénomène pourrait d'abord s'expliquer par l'impureté de ces cultures. Une deuxième hypothèse envisagée est la présence de plus d'une copie des gènes codant pour les petites sous unités de l'ADNr (SSU). Des mutations peuvent s'introduire sur les différentes copies des ADNr lors de la réplication et pourraient expliquer la présence de plusieurs bandes sur DGGE pour la même souche ou pour le même clone. Selon Myers *et al.* (1989), une différence aussi minime qu'un nucléotide peut être détectée par DGGE. Ceci pourrait d'ailleurs expliquer le cas des clones appartenant à l'espèce *Bacillus thermocloacae*. Dt-nc-11b et 20 sont deux groupes de clones qui se retrouvent dans la même région du gel, c'est-à-dire le bas, mais ils migrent à des distances différentes (Figure 12). Pourtant, ils sont tous deux homologues à 99% entre eux et avec l'espèce *Bacillus thermocloacae*. Évidemment, il peut s'agir de



différentes souches de *Bacillus thermocloacae*, où les quelques différences dans la séquence en acides nucléiques sont suffisantes pour que les souches soient ainsi distinguées sur DGGE. Mais la présence de copies multiples des ADNr pourrait facilement s'appliquer. En effet, deux espèces de bacilles, *Bacillus cereus*, qui selon les souches peut contenir entre dix et douze copies de SSU, et *Bacillus subtilis*, qui en possède dix (Fogel *et al.*, 1999) sont des exemples qui pourraient nous laisser croire à la présence de copies multiples chez certaines espèces de ce genre. Il est alors possible d'imaginer que *B. thermocloacae* pourrait elle aussi posséder plus d'une copie de ses ADN ribosomiaux. Ainsi, le simple fait de compter les bandes d'un échantillon peut surestimer la diversité de la population puisque dans ces cas, plus d'une bande correspond à une seule espèce (LaPara *et al.*, 2000c). Le cas contraire peut aussi survenir lors de la co-migration d'espèces, c'est-à-dire que deux communautés bactériennes différentes migrent au même endroit sur DGGE. Malgré leurs différences au niveau de la séquence en acides nucléiques, ces ADN peuvent montrer le même comportement de dénaturation. La diversité de la population microbienne risque alors d'être sous-estimée.

Lors de l'analyse de la population bactérienne du bioréacteur par clonage-séquençage, nous avons obtenu 25 groupes qui sont apparentés de près ou de loin à 18 espèces différentes. Théoriquement, le nombre de groupes aurait dû atteindre 41. Le fait de ne pas avoir atteint ce nombre peut être en partie relié à la proportion qu'occupe certaines communautés dans la population thermophile. Des espèces microbiennes peuvent être dominantes à un point tel qu'il est particulièrement difficile de détecter celles plus rares et en importance restreinte. Afin d'obtenir la majorité des différents membres de la population, le clonage-séquençage aurait pu être continué. Cependant, les populations dominantes obtenues sont probablement celles qui occupent une place importante dans les différentes réactions de dégradation du lisier de porc en conditions thermophiles. De plus, la banque de clone couvrait toutes les bandes de l'échantillon de référence t17, excepté deux.

## 4.2. Analyse de la microflore dominante

La biodiversité de la population thermophile que nous avons obtenue dans le bioréacteur par clonage ou par culture (21 espèces) est beaucoup plus élevée que celle observée par LaPara *et al.* (2000c) dans les unités thermophiles d'une chaîne de traitement thermophile et mésophile pour les eaux usées pharmaceutiques. Lors de cette analyse, l'équipe de LaPara a obtenu 11 espèces différentes, dont 6 sont anaérobies et considérées comme inactives. Elle est aussi plus élevée que les quatorze espèces qui ont été détectées par Kurisu *et al.* (2002) dans un compost synthétique à haute température. Cependant, si l'on compare avec la biodiversité que LaPara *et al.* ont obtenu dans les réservoirs mésophiles (31 espèces), cette dernière dépasse celle que nous avons observée dans les conditions thermophiles. De plus, parmi les 21 espèces recensées, huit font partie du groupe des Clostridiales. Ceci diminue la diversité des groupes de bactéries qui pourraient être actifs au sein du bioréacteur.

Comme décrit dans plusieurs publications portant sur le traitement thermophile de matières résiduelles polluantes, le genre dominant dans notre système pour le traitement du lisier de porc est *Bacillus* (Beaudet *et al.*, 1990; Sonnleitner et Bomio, 1990; Malladi et Ingham, 1993; Ishii *et al.*, 2000; LaPara *et al.*, 2001; Kurisu *et al.*, 2002). Lors de l'utilisation des méthodes traditionnelles de culture microbienne pour caractériser la flore de procédé thermophile, Beaudet *et al.* (1990) ainsi que Sonnleitner et Bomio (1990) ont détecté exclusivement des bactéries appartenant au genre *Bacillus*. Les espèces rencontrées étaient *B. licheniformis* (Beaudet *et al.*, 1990), *B. stearothermophilus* (Sonnleitner et Bomio, 1990) mais en général, les espèces étaient non définies. Dans les deux cas, les systèmes traitaient des rejets animaux. Une troisième équipe, qui étudiait le traitement de rejets alimentaires (pomme de terre), a quant à elle détecté plusieurs espèces de *Bacillus* (*B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. acidocaldarius*), et des bactéries du genre *Lactobacillus* (Malladi et Ingham, 1993). Aucune des espèces décrites plus haut n'ont été obtenues à partir du bioréacteur aérobie thermophile étudié ici. La seule espèce connue détectée sur milieu de culture est *Bacillus thermocloacae*. Jusqu'à 60% (3/5) des groupes obtenus par culture et 42% (10/24) des groupes identifiés par clonage-séquençage sont apparentés aux *Bacillus*. Ces bactéries sont ubiquitaires et ont la capacité de croître sur des substrats variés, souvent complexes

et même sur certains acides gras de faibles poids moléculaire comme l'acétate et le propionate (Sneath, 1984). Les analyses par DGGE suggèrent que leur abondance relative augmente lorsque les températures atteignent 50 et 65°C et demeurent élevées jusqu'à la fin du traitement (Figure 11 *b, c, d, e, et k*). Les *Bacillus* sont reconnus pour sécréter des protéases extracellulaires thermostables (Kume et Fujio, 1990) et le clivage des liens peptidiques par ces enzymes est l'une des principales réactions retrouvées lors de la digestion de déchets résiduels en conditions thermophiles (Kim *et al.*, 2002). Si nous prenons l'exemple de protéases sécrétées par un bacille thermophile comme *Bacillus stearothermophilus*, Kim *et al.* (2002) ont démontré que l'activité de ces enzymes est croissante à partir de 55°C et atteint son optimum à 75°C. Le pH où l'activité protéolytique est à son maximum est de 7.5 mais elle demeure élevée jusqu'à un pH de 9 (Kim *et al.*, 2002). Même si aucun essai sur l'activité protéolytique n'a été fait sur les bactéries du bioréacteur à l'étude, nous pouvons imaginer que, pour plusieurs protéases sécrétées par les espèces thermophiles de *Bacillus* présentes, ces intervalles de températures et de pH sont relativement semblables. Si cette dernière hypothèse s'applique, dans les heures suivant le début des cycles de traitement, l'activité des protéases extracellulaires des *Bacillus* ne ferait que s'accroître à mesure que la température s'élèverait et participerait à une partie de la dégradation de la matière organique du lisier. De plus, il est reconnu que la présence de minéraux ou de métaux traces sous forme d'ions divalents, comme le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ), le zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) ou le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) stimule l'activité protéolytique. Des concentrations de 100  $\mu\text{M}$  pour le  $\text{Fe}^{2+}$  et le  $\text{Zn}^{2+}$  sont nécessaire tandis que pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , les protéases demeurent actives jusqu'à 2000  $\mu\text{M}$  (Kim *et al.*, 2002). Ces éléments se retrouvent dans le lisier de porcs à des concentrations de 1.8 g/kg de lisier, 115 mg/kg et 93 mg/kg pour le calcium, le zinc et le fer respectivement (communication personnelle, IRDA). Ces éléments sont souvent ajoutés dans les rations alimentaires des porcs à des concentrations beaucoup plus élevées que celles absorbées par le métabolisme de l'animal (Donham, 2000). Ils demeurent donc disponibles pour certaines activités microbiennes.

Les clones dt-nc-11b et 20 sont particulièrement intéressants. La bande 11b est considérablement importante, particulièrement à partir du cycle F. Elle est présente dans

la biomasse de départ et son intensité relative augmente avec le temps de traitement et la hausse des températures. La population représentée par la bande 11b est, après la bande 4, celle dont l'intensité relative sur DGGE est la plus élevée. Un autre élément intéressant est l'abondance de clones obtenus pour le groupe 11b, qui constitue 37% (29/78) de la totalité des clones. Une corrélation peut plus ou moins être établie entre l'intensité de cette bande et sa dominance dans le système. C'est que la bande la plus intense, celle du groupe 4, est le deuxième groupe en importance pour le nombre de clones, tandis que l'inverse s'applique pour le groupe 11b. Pourtant, la différence en nombre entre les deux groupes est relativement élevée, les clones obtenus appartenant au groupe 11b étant deux fois plus nombreux que ceux du groupe 4. Quant à la bande 20, elle est très faible sur DGGE et un seul clone a été obtenu. Ces deux groupes de clones, dt-nc-11b et 20 appartiennent à la même espèce bactérienne, *Bacillus thermocloacae*, un microorganisme qui a été isolé d'un digesteur thermophile (60°C) de boues d'épuration et sur lequel encore peu d'éléments sont connus (Demharter et Hensel, 1989; Rainey *et al.*, 1994). L'optimum de température pour la croissance de cette bactérie se situe entre 55 et 60°C et le pH optimal est de 8 à 9 (Demharter et Hensel, 1989). Nous pouvons remarquer que ces conditions sont celles rencontrées dans le bioréacteur lors du traitement. Il n'est donc pas surprenant de retrouver les clones de *Bacillus thermocloacae* le plus fréquemment lors de l'élaboration de la génothèque mais aussi lors de l'observation des bactéries cultivables à 60°C. Plus précisément, 40% (31/78) des clones criblés sur DGGE appartiennent à l'espèce *B. thermocloacae* et pour les souches cultivées à 60°C, elle représente 25% (5/20) des isolats. D'ailleurs, Kurisu *et al.* (2002) avaient détecté ce microorganisme par DGGE dans leur traitement aérobic thermophile des boues d'eaux usées. Ils ont par la suite observé que *B. thermocloacae* était représenté en proportion considérable suite à l'analyse des boues par FISH ("Fluorescent *InSitu* Hybridization"). Dans notre traitement aérobic thermophile, cette bactérie n'a pas été retrouvée lors de l'échantillonnage à 40°C. Même si cette température est incluse dans sa limite de croissance, qui se situe entre 37 et 70°C, elle est probablement trop près de sa limite inférieure pour permettre son installation au sein du bioréacteur de manière dominante. D'autres microorganismes sont alors favorisés et laissent moins de place pour *B. thermocloacae*. Le clone dt-nc-22 est

un proche parent de *B. thermocloacae* avec 95% d'identité, et pourrait être une souche différente de dt-nc-11b et 20 ou une espèce légèrement différente encore non définie.

On s'explique mal encore la présence d'un microorganisme comme *Schineria larvae* auquel le clone dt-nc-4 est fortement apparenté (97% d'identité). Pourtant, il représente une fraction significative de la population puisqu'il est le deuxième groupe en importance de la banque de clones. Ce microorganisme a été isolé des deux premiers stades larvaires d'une mouche, *Wohlfahrtia magnifica*, qui parasite certains animaux de ferme d'Europe et d'Asie, comme les moutons, les chèvres, les oies et les dindons (Tóth *et al.*, 2001). Le pH optimal pour sa croissance est alcalin (entre 7.5 et 9), ce qui lui permet d'ailleurs de survivre dans les larves de mouches. Il peut croître à des températures qui atteignent 45°C mais il est possible que sa capsule externe lui permette de survivre dans le bioréacteur thermophile à des températures au-delà de sa limite. Jusqu'à maintenant, une seule publication est disponible sur *Schineria larvae* et la bactérie n'a pas encore été détectée dans un autre environnement. L'ADN de *Schineria larvae* n'est pas détecté dans le lisier brut et dans l'échantillon de départ du réacteur (t0, lisier brut + biomasse) (Figure 10, Br et t0). Par la suite, cette bactérie est présente jusqu'à la fin du traitement et l'intensité relative de la bande de dt-nc-4 demeure importante. Ceci semble indiquer que ce microorganisme pourrait être actif au sein du bioréacteur. Tóth *et al.* (2001) ont démontré que leur souche possède une activité chitinase. Nous n'avons pas vérifié la présence d'une telle activité dans le réacteur mais quoiqu'il en soit, il s'agit probablement d'une souche différente de celle isolée de *W. magnifica* compte tenu de leur température de croissance.

Plusieurs des groupes obtenus, en particulier dt-nc-9, 10, 12a et 15, sont fortement apparentés avec des microorganismes qui ont été détectés dans des échantillons provenant de procédés de compostage à hautes températures (Dees et Ghiorse, 2001; Karita *et al.*, non publié) mais qui ne semblent pas se rapprocher d'une espèce connue. De plus, 50% (10/20) des souches obtenues par culture ainsi que les clones membres du groupe dt-nc-12a correspondent, avec 99% d'identité, à la souche pPD14, un microorganisme dominant dans un échantillon thermophile de compost synthétique et détecté par clonage et séquençage. Tout comme l'équipe de Dees et Ghiorse (2001) nous avons obtenu l'ADN de ce microorganisme par clonage et séquençage, mais nous l'avons

également isolé en culture pure ce qu'ils ont été incapables d'effectuer. Il est possible que l'on retrouve dans le lisier de porc et dans la gélose sang "Columbia" des éléments essentiels ou des facteurs de croissance qui ne sont pas présents dans les milieux utilisés par l'équipe de Dees et Ghiorse (2001). D'ailleurs, deux des milieux qu'ils ont utilisés, le milieu TSA et R2A, ont été mis de côté lors de nos essais puisque la croissance obtenue à partir des échantillons du bioréacteur thermophile était faible et peu diversifiée. Plus précisément, nous avons obtenu entre 20 et 3000 UFC/mL sur TSA et R2A, comparativement à des valeurs atteignant  $1 \times 10^8$  UFC/mL pour les milieux lisier 50% et gélose sang Columbia. Lors de nos études de la population par l'élaboration de la librairie de clones, ce microorganisme représentait 6% (5/78) des clones, tandis que le clone de la souche pPD14 était celui retrouvé en plus grand nombre lors de l'étude de la diversité microbienne d'un compost synthétique (Dees et Ghiorse, 2001). Cette étude des populations avait été effectuée avec des amorces légèrement différentes des nôtres. Mais la différence entre les communautés dominantes réside principalement dans le fait que des systèmes différents ont été étudiés. D'un côté nous avons un procédé de traitement aérobie thermophile de déjections animales liquides et de l'autre une unité de compostage de déchets alimentaires solides (Dees et Ghiorse, 2001). Le séquençage de la souche cultivable 40S1e nous a permis de l'identifier comme appartenant à l'espèce pPD14. Pourtant, lors de son observation sur DGGE, cette souche semblait appartenir au groupe 18a, (*Bacillus psychrodurans*). Le groupe 18b a donc été formé pour accommoder 40S1e. Il est possible que 40S1e n'ait pas migrée tout à fait à la même hauteur que la bande 18a. Afin de confirmer cette hypothèse, le clone du groupe 18a et la souche 40S1e auraient dû être placés ensemble sur un gel DGGE ayant un gradient de dénaturant moins grand, comme cela a été fait pour les groupes 4 et 11.

L'espèce microbienne qui se rapproche le plus des souches dt-nc-16 et 18 est *Bacillus psychrodurans*, une bactérie sur laquelle très peu d'informations sont présentement disponibles. Son classement taxonomique est sur le point d'être validé (Abd El-Rahman *et al.* 2002) puisque le manuscrit est sous presse dans "International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology" (IJSEM). En fait, elle faisait partie d'un sous-groupe de *Bacillus* dont le principal membre était *Bacillus insolitus* qui, d'après l'équipe de Abd El-Rahman *et al.* (2002), devrait être différenciée vu sa capacité à

croître à des concentrations de NaCl de 5% et son aptitude à réduire les nitrates en nitrites. À 93 et 92% d'identité avec cette souche bactérienne reclassée, il y a de faibles chances que dt-nc-16 et 18 appartiennent à cette espèce bactérienne. Quoiqu'il en soit, elles demeurent tout de même dans le genre *Bacillus*.

Avant que les microorganismes thermophiles débutent leur travail de protéolyse et de dégradation de la matière organique du lisier, certaines bactéries, plus aptes à croître à des températures mésophiles (35 à 45°C), peuvent commencer la dégradation de la matière résiduelle. Les clones et les souches qui suivent entrent dans cette catégorie.

Tout d'abord, le clone dt-nc-5 s'apparente à un microorganisme dont le genre et l'espèce n'ont pas été définis, c'est-à-dire p-3443-Swa-2, avec 99% d'identité. L'espèce connue la plus apparentée est *Lactobacillus crispatus*. Avec 98% d'identité, les clones p-3443-Swa-2 et dt-nc-5 appartiennent probablement à une souche différente de cette espèce bactérienne. Les membres du genre *Lactobacillus* sont des microorganismes aéro-tolérants ou anaérobies qui font partie de la flore normale du système digestif du porc et que l'on peut retrouver dans les déjections porcines (Pryde *et al.*, 1999; Zhu, 2000). Les lactobacilles ont la capacité de croître sur une échelle très étendue de températures allant de 2 à 53°C (Zhu, 2000). Il est donc plausible de retrouver certaines espèces dans le bioréacteur thermophile et ce malgré l'aération du système. Certaines zones du bioréacteur sont déficientes en oxygène et créent des conditions micro-aérophiles, voir même anaérobies. La présence de ces zones s'explique entre autre par la consommation immédiate de l'oxygène par les bactéries aérobies thermophiles dès son entrée dans le système. Ceci est confirmé par le fait qu'il n'y a pas d'oxygène dissout mesuré dans le réacteur pendant une longue période (résultats non présentés). La Figure 11 suggère que la bactérie dt-nc-5 serait active au sein du bioréacteur puisque l'intensité de sa bande sur DGGE augmente pendant le cycle de traitement. L'activité que *Lactobacillus* pourrait amener serait probablement fermentaire (Zhu, 2000).

Avec 90% d'identité avec la souche bactérienne *Spirochaeta* sp. Buddy, il est difficile de confirmer l'appartenance du clone dt-nc-14 au genre *Spirochaeta*. Pourtant, si nous nous référons à l'arbre des Spirochaetales à la Figure 19, c'est le genre avec lequel dt-nc-14 s'apparente le plus. Ces bactéries sont anaérobies facultatives et pourraient alors coloniser les zones micro-aérophiles ou anaérobies du bioréacteur. Les spirochètes ont la

capacité de croître à des températures variant entre 35 et 40°C (Canale-Parola, 1984). Ces températures sont rapidement atteintes lors du traitement, c'est-à-dire en moins de dix heures. Pourtant, la bande de dt-nc-14 continue d'être détectée à des températures trop élevées (70°C) pour qu'un spirochète soit actif (Figure 10, t19 et t21). Comme dt-nc-14 était présent dans le lisier brut et que la bande correspondante n'augmente pas d'intensité durant le cycle de traitement, il est même possible que cette bactérie n'ait jamais été active dans le bioréacteur. L'ADN pourrait provenir de cellules intactes mais inactives. Ou bien, puisque l'ADN est une molécule relativement résistante, il a pu se retrouver sous forme libre dans le système et être détecté lors de nos analyses.

Nous avons trouvé dans le système thermophile une espèce non définie de *Pseudomonas*, l'espèce PM-2001 qui dans l'arbre de la Figure 23 correspond à dt-nc-24. L'espèce bactérienne connue ayant la plus forte homologie est *Pseudomonas migulae*, avec 99% d'identité. Ce microorganisme est encore peu connu. Il a d'abord été isolé à partir de sources d'eaux minérales naturelles (Verhille *et al.*, 1999). Par la suite, *P. migulae* a été retrouvé dans des résidus de mines d'uranium et des recherches sont en cours afin de vérifier si cette bactérie a des aptitudes pour l'utilisation de l'uranium (Merroun *et al.*, 2002). De plus, ce pseudomonade pourrait être impliqué dans l'arthrite réactive puisqu'il a été détecté chez des patients atteints de ce dérèglement (Cuchacovich *et al.*, 2002). On peut remarquer dans l'arbre phylogénique de la page 110 (Figure 23) qu'un groupe de *Pseudomonas* de différentes espèces semblent très proche les unes des autres et que le clone dt-nc-24 obtenu et sont parent *Pseudomonas* PM-2001 font partie de ce groupe. Cette souche est probablement peu importante puisque, dans la librairie de clones, elle n'a été obtenue qu'une seule fois.

Deux microorganismes, isolés à 40°C du bioréacteur, semble faire partie de la famille des *Micrococaceae*. Le premier groupe d'isolats, dt-c40-29 (40L3, 40L2 et 40S1d) possède 93% d'identité avec l'actinomycète *Renibacterium salmoninarum* (AB017538). Cependant, il est peu probable pour qu'un actinomycète se retrouve aussi rapproché d'un *Bacillus* lors d'une analyse phylogénique (Figure 21a). La séquence de *R. salmoninarum* à laquelle dt-c40-29 semble apparenté n'a été publiée dans aucun



journal mais est toutefois disponible dans GenBank. Lors d'un nouvel alignement comprenant la séquence de AB017538, d'autres séquences de *R. salmoninarum*, publiés dans différents journaux, celle de dt-c40-29, de *Bacillus* et d'actinomycètes, il semble que la séquence AB017538 ne provient pas de *R. salmoninarum* (données non disponibles). Les isolats de dt-c40-29 ne sont donc pas associés à cet actinomycètes mais plutôt à la famille des *Bacillaceae* et aurait dû se retrouver à la Figure 21.

L'isolat dt-c40-31 appartient à l'espèce *Rothia dentocariosa* (97% d'identité) un actinomycète coccoïdale en milieux liquide mais sur gélose, il prend une forme plus allongée. Il est apte à croître à des températures allant jusqu'à 37°C, mais nous l'avons tout de même obtenu suite à une incubation à 40°C. *R. dentocariosa* possède un métabolisme essentiellement fermentaire (Jones et Collins, 1984). Il est à noter que le suivi de ces deux bactéries n'est pas possible à la Figure 11 puisque les bandes correspondantes n'apparaissent pas. Il est alors difficile de s'avancer sur le rôle que pourraient occuper ces microorganismes dans ce traitement thermophile.

Les microorganismes appartenant aux familles de *Lactobacillaceae* (dt-nc-5), des *Spirochaetaceae* (dt-nc-14), des *gamma-Proteobacteria* (dt-nc-4 et 24) et des *Micrococcaceae* (dt-c40-29 et dt-c40-31) ont probablement un rôle à jouer au tout début du cycle de traitement selon leur métabolisme, souvent fermentaire et pourraient rendre disponible certains intermédiaires de dégradation qui favoriseraient alors la croissance et l'activité des microorganismes thermophiles.

Un autre microorganisme détecté dans le bioréacteur est dt-nc-17 qui est du genre des *Peptostreptococcus* (Figure 22). Le genre *Peptostreptococcus* est un colonisateur normal de la bouche et se retrouve particulièrement dans les endroits sans oxygène puisqu'il est anaérobie obligatoire (Schleifer, 1984). Quelques espèces ont été isolées du tractus intestinal du porc et du lisier de porc (Spoelstra, 1978; Iannotti *et al.*, 1982; Zhu, 2000). Cependant, ce microorganisme croît difficilement à des températures au-dessus de 45°C (Schleifer, 1984). Nous avons de la difficulté à expliquer sa présence dans un échantillon de 60°C même si la bande qui le représente est très faible à la Figure 12. C'est que cette bande est présente du début jusqu'à la fin du traitement. L'hypothèse la plus probable est la détection de l'ADN libre dans le bioréacteur suite à la lyse cellulaire du microorganisme.

La présence de représentants de la famille des Clostridiales (18% des clones obtenus) peut sembler surprenante du fait que le système est aérobie. Ces bactéries sont des organismes endogènes de la flore intestinale du porc (Leser *et al.*, 2002) ou d'autres isolés de milieux anaérobies, comme le rumen des bovins (Tajima *et al.*, 2000) et elles ont séjourné dans la préfosse avant le prélèvement pour le traitement. Leung et Topp (2001) ont démontré que, lors de l'entreposage du lisier dans la préfosse et dans la fosse, les bactéries sont incorporées à l'intérieur de biofilms ou d'agrégats qui les protègent contre l'aération. De plus, ce sont des microorganismes qui, lorsque leur environnement devient défavorable à leur subsistance, sporulent et deviennent ainsi thermorésistants. Aussi, comme mentionné précédemment, l'oxygène dissous est rapidement consommé et la présence de zones microaérophiles auraient pu permettre l'installation de populations de *Clostridium*. Il est donc possible qu'une activité anaérobie ait pu avoir lieu dans le réacteur aérobie thermophile, mais cette dernière demeure marginale par rapport à l'activité aérobie.

Sur les sept groupes de clones apparentés aux Clostridiales, deux disparaissent (dt-nc-6 et dt-nc-8) suite à 24 heures de traitement où les températures atteignaient entre 65 et 72°C tandis que dt-nc-7 et dt-nc-13 demeurent. Trois autres représentants n'apparaissent pas sur le DGGE (dt-nc-19, 21 et 23) lors du suivi de l'évolution des populations. La cause pour laquelle des clones ne sont pas visibles dans l'échantillon de référence t17 pourrait être la spécificité des paires d'amorces utilisées pour le PCR-DGGE.

Suite à l'observation de la destruction de *Clostridium perfringens* de 3 à 4 log (99%) lors de la vérification de l'efficacité du bioréacteur sur la destruction des microorganismes pathogènes (section 4.3), nous pouvons facilement reporter ces résultats à la majorité des membres de ce genre. Pourtant, si l'on observe attentivement la Figure 11, les bandes dt-nc-7 (bande d'intensité importante entre *a* et *i*) et dt-nc-13 (*f*) s'atténuent (t21), pour ensuite reprendre en intensité au temps 23. L'augmentation de l'intensité relative des bandes des groupes dt-nc-7 et dt-nc-13 ne prouve en rien leur activité et leur viabilité jusqu'à la fin du traitement puisque la technique du PCR-DGGE détecte l'ADN présent dans l'environnement étudié. Il est à envisager que des spores, qui n'ont pu être détruites lors de l'extraction d'ADN des échantillons recueillis à des températures sous

70°C, auraient été brisées sous les hautes températures (t23, 72°C). L'ADN se serait alors retrouvé libéré dans le système. Ainsi, beaucoup plus d'ADN correspondant à ces microorganismes aurait pu être détecté et augmenter l'intensité des bandes de dt-nc-7 et dt-nc-23 à partir de t23.

Les microorganismes actifs dans un procédé thermophile représentent des atouts intéressants pour différents secteurs industriels. Les enzymes sécrétées par les bactéries thermophiles, les thermozymes, se caractérisent particulièrement par leur stabilité à hautes températures mais aussi sous différentes conditions extrêmes comme des pH élevés ou la présence de solvants organiques. Les protéases, les amylases, les xylanases et les cellulases en sont quelques exemples. Elles sont entre autre utilisées dans le secteur alimentaire pour la production de sirops ou ajoutées à différents détergents. Elles peuvent aussi participer à l'amélioration des conditions environnementales en remplaçant des agents chimiques pour le blanchissage de vêtements ou du papier (Bruins *et al.*, 2001). C'est pour leur potentiel industriel et fondamental (compréhension de la stabilité des thermozymes vs les enzymes mésophiles) que l'acquisition de connaissances sur les différentes souches thermophiles isolées, et sur celles qui pourraient éventuellement l'être, doit être poursuivie. La compréhension de leur mécanisme de stabilité et les différentes options qu'elles pourraient offrir sont des enjeux économiques, industriels et environnementaux intéressants.

### **4.3. Destruction des pathogènes**

La présence de *Clostridium* viables dans l'effluent rejeté dans l'environnement serait inquiétante puisque ces derniers sont persistants dans l'environnement grâce à leur forme sporulée et que certains membres de ce genre représentent un danger potentiel pour la santé comme *C. botulinum* ou *C. difficile*. Ceci dit, nous avons montré que le bioréacteur aérobie thermophile est apte à détruire l'espèce *Clostridium perfringens* à 99%. D'après les travaux de Hill et Sobsey (2001), la réduction des spores de *C. perfringens* par marais filtrants démontrerait une corrélation significative avec la réduction de *Salmonella*, des coliformes fécaux, de *Escherichia coli* et de coliphages somatiques. D'après eux, ces résultats suggèrent que des microorganismes entériques

encore plus stables dans l'environnement comme *Cryptosporidium parvum* et les kystes de *Giardia lamblia*, seraient éliminés efficacement par leur traitement (Hill et Sobsey, 2001). Il est à remarquer que le taux d'élimination de *C. perfringens* en marais filtrants, 93 et 97%, est inférieur à ce que nous avons obtenu dans le bioréacteur thermophile. De plus, Whitmore et Robertson (1995) ont établi qu'une exposition de 24 heures à 55°C est suffisante pour l'élimination des oocystes de *C. parvum*. Malgré le fait que nous n'avons pas détecté le genre *Salmonella* spp. dans le lisier brut, ne nous permettant pas d'évaluer sa destruction par le bioréacteur thermophile, les expériences réalisées par Hill et Sobsey (2001) nous portent à croire que ce genre sera efficacement détruit. Toutefois, les hypothèses émises sur *C. parvum*, *G. lamblia*, et *Salmonella* spp. devront être vérifiées sur le bioréacteur aérobique thermophile (inoculation du lisier à traiter) afin de s'assurer de l'inocuité du lisier suite au traitement.

Pour la majorité des résultats obtenus lors de la vérification de la destruction des microorganismes indicateurs de pathogénéicité comme les coliformes fécaux, ou d'autres fréquemment rencontrés lors de troubles entériques, comme *Campylobacter* spp., les résultats préliminaires appuient nos attentes. Selon plusieurs recherches effectuées sur différents microorganismes pathogènes, bactéries, virus ou parasites, un procédé dont la température atteint 55°C pendant plus de 36 heures et à un pH de 8 est efficace pour la destruction de ces organismes nuisibles (Böhm, 1984; Ugwuanyi *et al.*, 1999; Whitmore et Robertson, 1995; Turner *et al.*, 1999). Le bioréacteur aérobique thermophile atteint des températures de 55°C, souvent pendant plus de 48 heures, à des pH alcalins. La répétition de certaines de ces analyses devra toute fois être réalisée pour confirmer les résultats obtenus.

## Conclusion

La gestion sécuritaire des volumes impressionnants de lisier de porc représente aujourd'hui un défi de taille pour les éleveurs porcins. Un procédé de traitement biologique du lisier de porc est présentement à l'étude dans nos laboratoires et permettrait éventuellement de diminuer l'émission d'odeur et les risques pour l'environnement et la santé. Le procédé est aérobie thermophile et les réactions de dégradation du lisier de porc à l'intérieur du bioréacteur sont entièrement accomplies par les microorganismes présents. Il nous a semblé intéressant d'observer et d'approfondir les connaissances sur les principaux agents responsables de ces activités. Le présent travail a permis d'identifier les principales bactéries jouant un rôle dans la dégradation de la matière organique. Nous avons pu également confirmer la capacité du procédé à détruire des microorganismes indicateurs et pathogènes.

La flore microbienne retrouvée dans le bioréacteur aérobie thermophile est diversifiée et particulièrement intéressante. Jusqu'à 20 espèces bactériennes différentes ont été détectées. Notons que les techniques de biologie moléculaire (PCR-DGGE/clonage/séquençage ) nous ont permis d'observer beaucoup plus de biodiversité que les méthodes basées sur la culture des microorganismes. Les 18 espèces différentes obtenues par biologie moléculaire sont regroupées parmi six familles différentes, les *Bacillaceae*, les *Lactobacillaceae*, les *Clostridiaceae*, les *Eubacteriaceae*, les *Spirochaetaceae*, les *Peptostreptococcaceae* et parmi le sous-groupe des *Gamma-Proteobacteria*. Cependant, à la suite de l'isolement de souches bactériennes par culture sur milieux solides, seulement quatre espèces différentes ont été identifiées, dont deux déjà retrouvées dans la génothèque et elles se classaient soit dans la famille des *Bacillaceae* ou dans celle des *Micrococcaceae*. Dans les deux cas, le genre *Bacillus* est le plus abondant et est relativement diversifié. Les *Clostridium* suivent en abondance mais sont plus diversifiés (8 espèces contre 6). L'espèce *Schineria larvae* arrive en troisième au point de vue abondance mais est beaucoup plus intéressante que *Clostridium*, vu sa possible implication dans l'activité de dégradation du lisier de porc.

La technique du PCR-DGGE nous a permis d'observer la diversité de cette microflore en plus de son évolution tout au long des cycles de dégradation du lisier de porc. Mais cette technique a tout de même ses limites dont certaines ont pu être observées lors de nos expériences. Par exemple, la spécificité de certaines amorces ne permettait pas la détection d'espèces moins bien ciblées.

Les souches bactériennes thermophiles que nous avons obtenues par culture pourront être étudiées plus à fond et pourraient mener à la purification et l'utilisation d'enzymes thermostables potentiellement intéressantes industriellement.

Selon les résultats préliminaires obtenus, le système aérobie thermophile posséderait les conditions idéales pour permettre la destruction de microorganismes indicateurs et pathogènes. Les coliformes fécaux et le genre *Campylobacter* sont éliminés sous le seuil de détection. La réduction importante de l'espèce thermostable *Clostridium perfringens* est particulièrement intéressante et nous porte à croire que plusieurs autres microorganismes résistants dans l'environnement et potentiellement dangereux pour la santé, comme les *Salmonella*, les oocystes de *Cryptosporidium parvum* ou les kystes de *Giardia lamblia* pourraient également être éliminés. Le rejet dans l'environnement d'un tel effluent ne représenterait alors plus aucun risque pour la salubrité des sols, des lacs et des rivières.

## **APPENDICES**

## Appendice I. Milieux de culture

**CIN agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocine)** (peut être substitué par un milieu commercial chez Difco : *Yersinia* selective agar avec son supplément)

Milieu de base

Peser ou mesurer:

Peptone #3	20 g
Extrait de levure	2 g
Mannitol	20 g
Acide pyruvique (sel de Na)	2 g
NaCl	1 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O (10 mg/mL)	1 mL
Agar	12 g

Dissoudre dans 756 mL d'H<sub>2</sub>O milli-Q et amener à ébullition avec agitation

Refroidir à environ 80°C (10 min dans bain-marie à 50°C)

Solution d'Irgasan

Mettre 0.4 g d'Irgasan dans 100 mL d'éthanol 95% (se conserve plus de 4 semaines à -20°C)

Ajouter 1 mL de cette solution au milieu de base et bien mélanger

Refroidir entre 50 et 55°C

Solution de désoxycholaté

Dissoudre 0.5 g de désoxycholate de sodium dans 200 mL d'H<sub>2</sub>O milli-Q

Amener à ébullition sous agitation

Refroidir entre 50 et 55 °C

Ajouter au milieu de base avec la solution d'Irgasan; la solution doit demeurer claire

Ajouter 1 mL de NaOH 5 N, 10 mL de rouge neutre (3mg/mL), 10 mL de crystal violet (0.1 mg/mL) et 10 mL de cefsulodin (1.5 mg/mL, disponible chez Abbott Labs)

Ajuster le pH à 7.4 avec NaOH 5N

Répartir dans des boîtes de Pétri (15 à 20 mL)



### **Infusion cœur-cervele (gélose)**

Si possède milieu déshydraté commercial

Déposer 52 g du milieu déshydraté dans un erlenmeyer de 2 L

Ajouter 1L d'H<sub>2</sub>O milli-Q

Porter à ébullition sur une plaque chauffante à feu moyen avec agitation (agitateur magnétique) jusqu'à dissolution complète

Ajuster le pH si nécessaire à 7.4 à 25°C

Répartir environ 8 mL dans des tubes 16 x 125 mm pour former des géloses inclinées

Stériliser 121°C/15 min

Laisser refroidir environ jusqu'à 50°C

Faire en sorte d'obtenir une gélose inclinée en plaçant les tubes presque à l'horizontal

Conserver à 4°C, à l'obscurité pendant maximum 4 semaines

Milieu déshydraté non disponible, peser et/ou mesurer

Infusion de cervelle de veau 200 g

Infusion de cœur de bœuf 250 g

Protéose peptone 10 g

Bacto dextrose 2 g

NaCl 5 g

Phosphate disodique 2.5 g

Agar 15 g

Suivre les étapes précédentes à partir de la dissolution des produits secs dans 1L d'H<sub>2</sub>O milli-Q

### **Lactose-gélatine (milieu) (pour *C. perfringens*)**

Peser ou mesurer :

Tryptose 15 g

Extrait de levure 10 g

Lactose 10 g

Rouge de phénol 1% 5 g

Gélatine 120 g

Dissoudre le tryptose, l'extrait de levure et le lactose dans 400 mL d'H<sub>2</sub>O milli-Q en chauffant

Suspendre la gélatine dans 600 mL d'H<sub>2</sub>O milli-Q et chauffer entre 50 et 60°C avec agitation pour dissoudre la gélatine

Mélanger les 2 solutions

Ajuster le pH à 7.5

Ajouter le phénol rouge et agiter

Mettre 10 mL dans des tubes vissés 16 x 150 mm

Autoclaver 121°C / 10 min

Avant utilisation (si non utilisé 8 heures après leur confection) chauffer entre 50 et 70 °C pendant 2 à 3 heures

### **MacConkey gélose (disponible commercialement)**

Si dispose du produit commercial

Dissoudre 50 g du produit dans 1L d'H<sub>2</sub>O milli-Q

Chauffer et agiter pour aider la dissolution

Ajuster le pH à 7.1

Autoclaver 121°C / 15 min

Laisser refroidir entre 45 et 50°C

Répartir 20 mL dans les boîtes de Pétri

Laisser sécher à température pièce avec les couvercles fermés

**Ne pas utiliser les milieux humides**

Si le milieu commercial n'est pas disponible

Peser :

Protéose peptone 3 g

Peptone 17 g

Lactose 10 g

Sels biliaires #3 1.5 g

NaCl 5 g

Rouge neutre 0.03 g

Crystal violet 0.001g

Agar 13.5 g

Suspendre les éléments dans 1L d'H<sub>2</sub>O milli-Q

Chauffer et agiter pour dissoudre

Laisser bouillir 1 à 2 minutes

Suivre les étapes ci-haut à partir de l'ajustement de pH

### **m-FC (milieu)**

Lorsque possède le produit déshydraté commercial

Dissoudre 37 g du milieu déshydraté dans 1L d'H<sub>2</sub>O milli-Q

Porter à ébullition avec agitation jusqu'à dissolution complète

Ajouter 10 mL d'une solution d'acide rosolique 1% (p/v); laisser bouillir 1 min.

Ajuster le pH si nécessaire à 7.4 à 25°C

**Ne pas autoclaver**

Répartir environ 4 mL dans des boîtes de Pétri 69 mm x 9 mm et laisser solidifier

Conserver à 4°C, à l'obscurité et pendant maximum 2 semaines

Si le produit déshydraté est non commercial

Tryptose 10 g

Protéose peptone #3 5 g

Extrait de levure 3 g

NaCl 5 g

Lactose 12.5 g

Sels biliaires #3 1.5 g

Bleu d'aniline 0.1 g

Agar 15 g

Suivre les étapes à partir de la dissolution des produits secs dans 1L d'H<sub>2</sub>O milli-Q

### **Nitrate-mobilité (milieu) (disponible commercialement chez BD)**

Peser ou mesurer:

Extrait de bœuf	3 g
Peptone	5 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g
Agar	3 g
Galactose	5 g
Glycerin (reagent grade)	5 mL

Dissoudre ces éléments, **sauf l'agar**, dans 1L d'H<sub>2</sub>O milli-Q

Ajuster le pH à 7.3

Ajouter l'agar et chauffer pour dissoudre

Déposer 11 mL dans des tubes 16 x 125 mm

Autoclaver 121°C / 15 min

Refroidir dans eau froide

### **Peptone-Sorbitol-Sels biliaires bouillon**

Peser :

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.23 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	1.2 g
Sels biliaires #3	1.5 g
NaCl	5 g
Sorbitol	10 g
Peptone	5 g

Dissoudre dans 1 L d'H<sub>2</sub>O milli-Q

Distribuer à raison de 100 mL dans des bouteilles allant à l'autoclave

Ajuster le pH à 7.6

Autoclaver 121°C / 15 min

### **R<sub>2</sub>A**

Dissoudre 18,1g de poudre dans 1L d'eau milli-Q

Chauffer et amener à ébullition pour permettre la dissolution (couvrir pour éviter l'évaporation d'eau)

Faire bouillir pendant 1min en évitant les débordements

Faire stériliser à l'autoclave 15 min à 121°C

\*Éviter de surchauffer

Laisser refroidir sur le comptoir jusqu'à environ 60°C et ensuite continuer son refroidissement dans un bain marie à 50°C

Couler sous la hotte biologique environ 20 mL de milieu dans chaque boîte de Pétri  
Laisser solidifier et placer 24 h à 37°C afin d'assécher le milieu et de vérifier la contamination

Garder à 4°C

### **Réactif de Colilert®**

Contenu d'un sachet de réactif de Colilert® dans 100 mL d'eau stérile  
Répartir à raison de 2 mL dans des tubes à essais stériles 16 mm x 125 mm non-fluorescent sous UV à 366 nm

**Ne pas autoclaver**

Conserver 1 semaine à 4°C

### **Sélénite dulcitol (bouillon)**

Peser :

Protéose peptone 4 g

Extrait de levure 1.5 g

Dulcitol 4 g

Sélénite de sodium 5 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 g

Dissoudre dans 1 L d'H<sub>2</sub>O milli-Q sous agitation (ne pas chauffer)

Ajuster le pH à 7.0

Porter à ébullition

**Ne pas autoclaver**

Répartir 10 mL dans des tubes de borosilicates 18 x 150 mm stériles

Conserver une semaine max à 4°C

Pour obtenir le bouillon dulcitol sélénite double force, doubler les quantités d'ingrédients pour 1 L d'H<sub>2</sub>O milli-Q.

### **SOB (pH 7.0)**

Dans un erlenmeyer de 2 L mettre  
20 g de bacto-tryptone  
5 g d'extrait de levure  
0.5 g de NaCl  
Verser ~ 800 mL d'H<sub>2</sub>O milli-Q  
Ajouter 2.5 mL de KCl 1M  
Faire chauffer sous agitation pour une meilleure dissolution  
Laisser refroidir à température de la pièce et ajuster le pH à 7.0 avec du NaOH 10 N  
Compléter à 1L avec H<sub>2</sub>O milli-Q  
Faire stériliser

### **SOB bouillon/Ampi**

Recueillir 100mL de bouillon SOB stérile dans un erlenmeyer stérile  
Ajouter 1 mL de MgCl<sub>2</sub>  
Ajouter 200 µl d'Ampicilline 500x  
Disposer à raison de 3 mL par tube stérilise  
Conserver à 4°C pas plus d'un mois

### **SOB agar / X-Gal /Ampicilline**

Recueillir 100 mL de bouillon SOB dans un erlenmeyer  
Ajouter 1.5 g d'agar bactériologique  
Dissoudre l'agar en plaçant l'erlenmeyer sur une plaque chauffante et sous agitation  
Ne pas laisser bouillir  
Autoclaver 30 minutes à 121°C  
Laisser refroidir dans un bain à 50°C  
Sous hotte biologique, ajouter 2 mL de MgCl<sub>2</sub>  
500 µl d'IPTG 200x  
200 µl d'X-Gal 500x  
200 µl d'ampicilline 500x  
Bien mélanger  
Répartir dans boîtes de Pétri (entre 20 et 25 mL par Pétri)  
Laisser solidifier et sécher  
Conserver à 4°C pas plus qu'un mois

### **SOC**

Mettre 100 µl de glucose dans 9.9 mL de SOB avec MgCl<sub>2</sub> (99 µl de MgCl<sub>2</sub> 1M)

### **Tryptic soy agar**

Dissoudre 40g de poudre dans 1L d'eau milli-Q

Chauffer et amener à ébullition pour permettre la dissolution (couvrir pour éviter l'évaporation d'eau)

Faire stériliser à l'autoclave 15 min à 121°C Laisser refroidir sur le comptoir jusqu'à environ 60°C et ensuite continuer son refroidissement dans un bain marie à 50°C

Couler sous la hotte biologique environ 20 mL de milieu dans chaque Pétri

Laisser solidifier et ensuite, placer 24 h à 37°C afin d'assécher le milieu et de vérifier la contamination

Garder à 4°C

### **XLT4 gélose (Disponible commercialement)**

Lorsque disponible commercialement peser 59 g de produit déshydraté pour 1 L d'H<sub>2</sub>O milli-Q

Ajouter 4.6 mL de supplément pour agar XLT4 (disponible commercialement)

Amener à ébullition pour dissolution

Ne pas surchauffer

Ajuster le pH à 7.4

Répartir dans boîtes de Pétri

Laisser solidifier

Se conserve 2 semaines à 4°C

Si milieu déshydraté commercial non disponible

Peser :

Peptone #3	1.6 g
Extrait de levure	3 g
L-Lysine	5 g
Xylose	3.75 g
Lactose	7.5 g
Saccharose	7.5 g
Citrate d'ammonium ferrique	0.8 g
Thiosulfate de sodium	6.8 g
NaCl	5 g
Agar	18 g
Phénol rouge	0.08 g

Refaire les étapes à partir de la dissolution des éléments déshydratés

**Appendice II. Données reliées aux suivis de l'évolution des populations microbiennes lors de différents cycles de traitement aérobie thermophile du lisier de porc. Le pH n'est pas indiqué puisque pour tous les cycles, il variait entre 8 et 9.**

Cycle <sup>1</sup>	A		B		C		D		E		F	
	⊕	T°	⊕	T°	⊕	T°	⊕	T°	⊕	T°	⊕	T°
t0	0	38	0	27.0	0	38.8	0	22.8	0	23.0	0	35.6
t1	21	53.1	17	51.1	3	42.4	3	26.9	4	28.3	4	42.0
t2	40	55.1	25	54.0	19	53.6	6	32.1	8	36.2	6	50.5
t3	60 <sup>f</sup>	41.3	41	57.2	26	55.8	22	62.2	20	56.4	17	67.3
t4			49	57.5	43	57.7	31	64.1	24	59.8	24	63.5
t5			65 <sup>f</sup>	54.1	50	58.1	48 <sup>f</sup>	60.1	28	62.0	48	60.2
t6					66 <sup>f</sup>	57.1			48	60.2	70 <sup>f</sup>	56.1
t7									68 <sup>f</sup>	55.6		
Cycle <sup>1</sup>	I		J		K		M		N		O	
	⊕	T°	⊕	T°	⊕	T°	⊕	T°	⊕	T°	⊕	T°
t0	0	19.9	0	29	0	17.2	0	36.6	0	31.9	0	31.1
t1	6	25.1	7	36.7	18	56.7	18	60.8	16	56.4	7	39.8
t2	9	35.5	19	52.9	23	66.9	25	57.1	40	68.7	9	44.4
t3	11	42.9	24	58.2	41	67.8	41	68.7	- <sup>f</sup>	-	11	48.5
t4	26	66.4	40	67.2	64 <sup>f</sup>	64.7	- <sup>f</sup>	-			13	52.4
t5	30	71.4	- <sup>f</sup>	56.6							15	56.7
t6	49	63									17	61.5
t7	72 <sup>f</sup>	-									19	66.2
t8											21	69.2
t9											23	71.7
t10											25	72.0
t11											48	67.5
t12											65 <sup>f</sup>	65.6

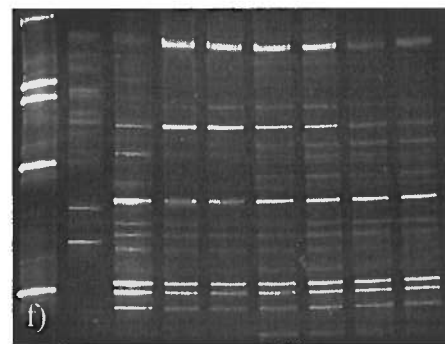
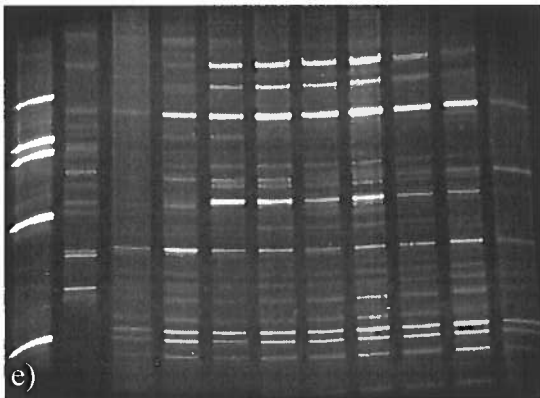
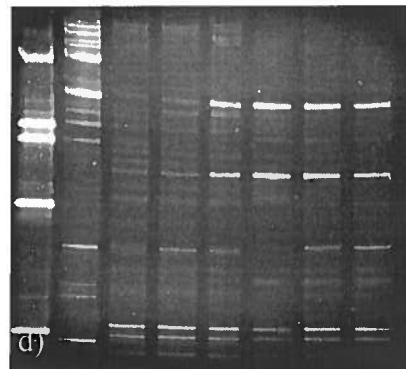
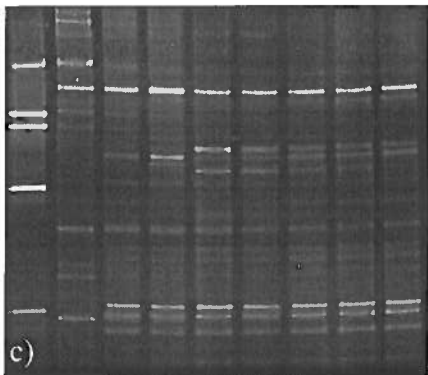
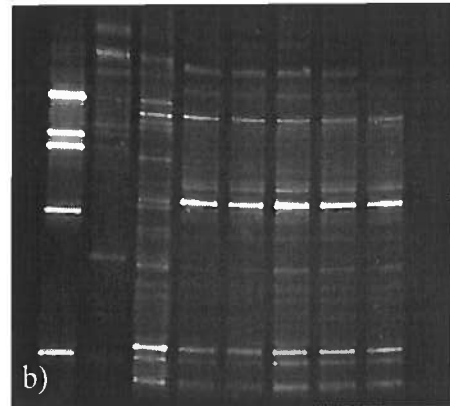
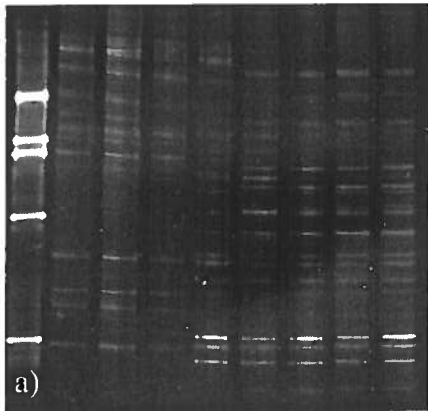
<sup>1</sup>Suivi et données du Réacteur 2 seulement

<sup>f</sup>Temps final

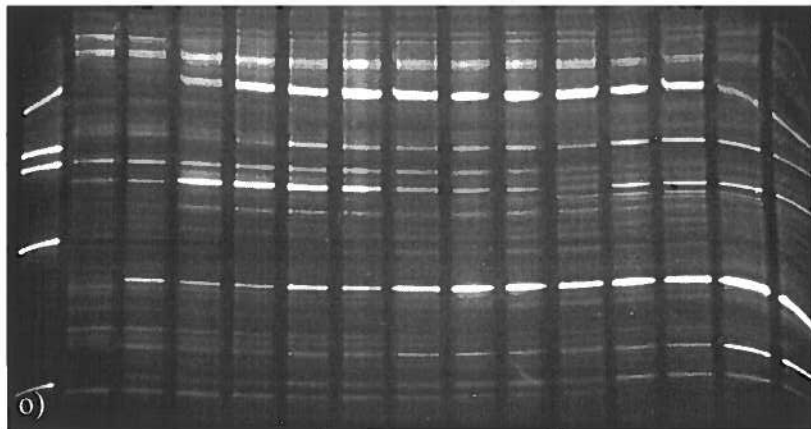
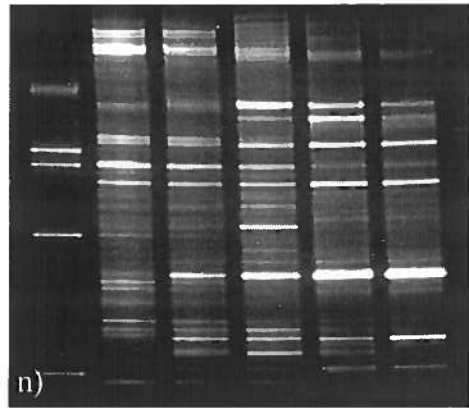
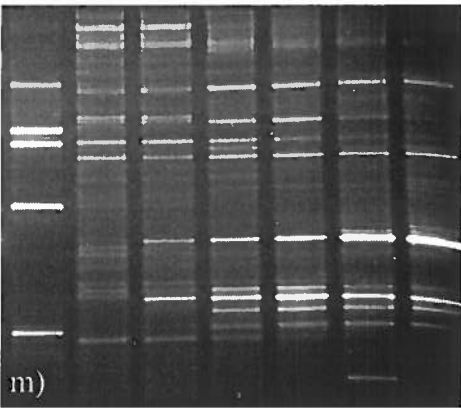
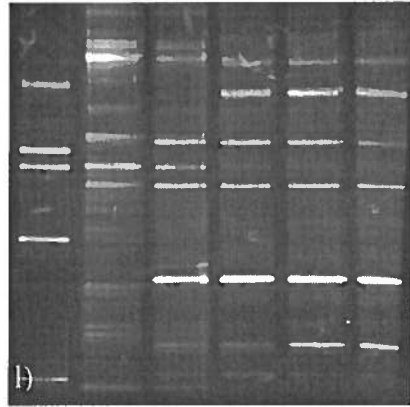
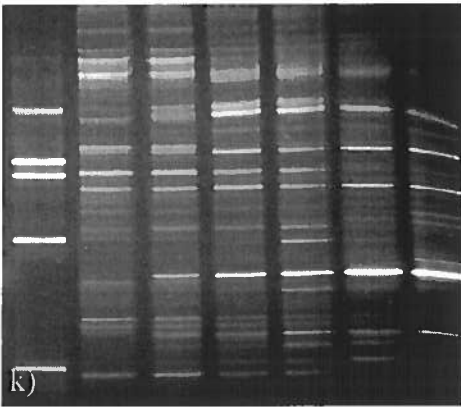
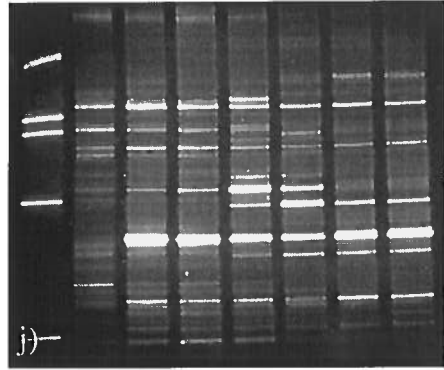
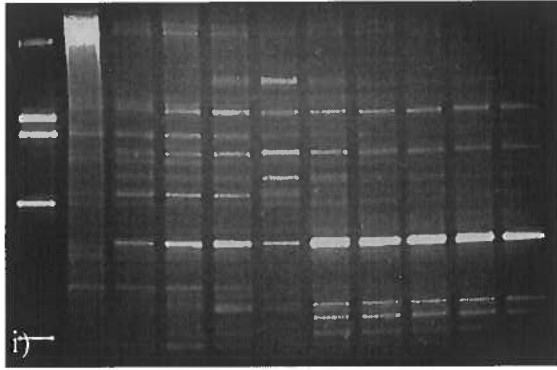
⊕: Temps en heure

T°: Température en °C

**Appendice III. Suivis de l'évolution des populations microbiennes dans le bioréacteur aérobic thermophile.** Les lettres correspondent au cycle de traitement.  
a) du 09-07-01 au 13-07-01 b) du 17-07-01 au 20-07-01 c) du 30-07-01 au 02-08-01  
d) du 15-08-01 au 17-08-01 e) 20-08-01 au 23-08-01 f) du 23-08-01 au 27-08-01 i) 25-10-01 au 28-10-01  
j) 28-10-01 au 31-10-01 k) 09-11-01 au 12-11-01 l) 12-11-01 au 14-11-01 m) 14-11-01 au 17-11-01  
n) 17-11-01 au 20-11-01 o) 20-11-01 au 23-11-01







**Appendice IV. Tableau détaillé de l'analyse des séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S provenant des représentants de clones sélectionnés.**

Groupe	Nom (Représentant <sup>1</sup> )	Souche la plus apparentée	Identité (%)	Source
4	dt-nc-4 (B1')	<i>Schineria larvae</i>	97	Toth <i>et al.</i> , 2001
5	dt-nc-5 (B2)	"Un. bact." p-3443-Swa-2	99	Leser <i>et al.</i> , 2002
6	dt-nc-6 (B7)	"Un. rumen bact." 4C28d-22	93	Tajima <i>et al.</i> , 2000
7	dt-nc-7 (B11')	"Un. bact." p-1051-a5	93	Leser <i>et al.</i> , 2002
8	dt-nc-8 (A6')	"Un. bact." p-3188-Swa	94	Leser <i>et al.</i> , 2002
9	dt-nc-9 (H5)	"Un. compost bact." 4-11	97	Karita <i>et al.</i> , 1999
10	dt-nc-10 (H2)	"Un. compost bact." 4-11	98	Karita <i>et al.</i> , 1999
11a	dt-nc-11a(F3)	"Un. bact." p-648-a5	93	Leser <i>et al.</i> , 2002
11b	dt-nc-11b(C3, A6)	<i>Bacillus thermocloacae</i>	98	Rainey <i>et al.</i> , 1994
12a	dt-nc-12a(A7)	"Un. bact." pPD14	99	Dees et Ghiorse, 2001
12b	dt-nc-12b(F10)	"Un. bact." pPD14	99	Dees et Ghiorse, 2001
12c	dt-nc-12c(B3')	"Un. rumen bact." clone 30-5	91	Whitford <i>et al.</i> , 1997
13	dt-nc-13 (A5')	"Un. bact." tbr1-9	90	LaPara <i>et al.</i> , 2000
14	dt-nc-14 (B12)	<i>Spirochaeta</i> sp. Buddy	90	Loeffler & Ritalahti (unp.)
15	dt-nc-15 (B12')	"Un. bact." pPD15	98	Dees & Ghiorse, 2001
16	dt-nc-16 (G4)	<i>Planococcus psychrotoleratus</i>	93	Abd El-Rahman <i>et al.</i> , 2002
17	dt-nc-17 (C5')	<i>Peptostreptococcus</i> sp. oral	97	Paster <i>et al.</i> , 2001
18a	dt-nc-18a(H11)	<i>Planococcus citreus</i>	92	Abd El-Rahman <i>et al.</i> , 2002
19	dt-nc-19 (C11)	"Un. bact." tbr1-9	92	LaPara <i>et al.</i> , 2000
20	dt-nc-20 (F6')	<i>Bacillus thermocloacae</i>	98	Rainey <i>et al.</i> , 1994
21	dt-nc-21 (B8')	"Un. rumen bact." 3C3d-13	91	Tajima <i>et al.</i> , 2000
22	dt-nc-22 (C2')	<i>Bacillus thermocloacae</i>	95	Rainey <i>et al.</i> , 1994
23	dt-nc-23 (B9')	<i>Clostridium butyricum</i>	97	
24	dt-nc-24 (H12')	<i>Pseudomonas</i> sp. PM-2001	99	

<sup>1</sup>Le numéro du représentant correspond à l'emplacement du clone sur la plaque de 96 puits identifiée "Clones thermophiles" et lorsque le numéro est suivi d'un apostrophe ( ' ), ces clones se retrouvent sur la plaque #2.

Un.: "Uncultured"

Bact.: "bacterium"

**Appendice V. Tableau détaillé de l'analyse des séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S provenant des représentants sélectionnés parmi les souches cultivables.**

Souches	Nom	Souche la plus apparentée	Identité (%)	Source
40L3 <sup>a</sup> , 40L2 et 40S1d	dt-c40-29	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	93	Ohtani et Kuraishi, 1998 (publish in data base only)
40S1a <sup>a</sup>	dt-c40-31	<i>Rothia dentocariosa</i>	97	Yang et Woese, 1990
60S3 <sup>a</sup> , 60S2, 60S5, 60S6 et 60L4	dt-c60-11b	<i>Bacillus thermocloacae</i>	98	Rainey <i>et al.</i> , 1994
40S1e <sup>a</sup>	dt-c40-18b	"Un. bact." pPD14	99	Dees et Ghiorse, 2001
60L2 <sup>a</sup> , 60L1bb <sup>a</sup> , 60L1p, 60L3, 60L5, 60S1b, 60S4, 60L8	dt-c60-12a	"Un. bact." pPD14	99	Dees et Ghiorse, 2001
60L7 <sup>a</sup>	dt-c60-28	"Un. bact." pPD14	99	Dees et Ghiorse, 2001

<sup>a</sup> : souches qui ont été séquencées

Un.: "Uncultured"

Bact.: "bacterium"

### Appendice VI. Indices NPP

Pour un gramme ou un millilitre d'échantillon. Limites de confiance à 95 %, avec trois séries de cinq tubes contenant 0.1, 0.01, et 0.001 g d'échantillon<sup>1</sup>. Tiré du document "Méthodes d'analyse-Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec".

Tubes positifs	NPP/g	Limite de confiance 95%		Tubes positifs	NPP/g	Limite de confiance 95%	
		Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
0-0-0	<2	-	-	4-3-0	27	12	67
0-0-1	2	1.0	10	4-3-1	33	15	77
0-1-0	2	1.0	10	4-4-0	34	16	80
0-2-0	4	1.0	13				
1-0-0	2	1.0	11	5-0-0	23	9.0	86
1-0-1	4	1.0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-0	4	1.0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-1	6	2.0	18	5-1-0	30	10	120
1-2-0	6	2.0	18	5-1-1	50	20	150
				5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1.0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2.0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2.0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3.0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3.0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	3.0	29	5-3-2	140	60	360
				5-3-3	170	80	410
3-0-0	8	3.0	24	5-4-0	130	50	390
3-0-1	11	4.0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-0	11	4.0	29	5-4-2	220	100	580
3-1-1	14	6.0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-0	14	6.0	35	5-4-4	350	160	820
3-2-1	17	7.0	40				
4-0-0	13	5.0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7.0	45	5-5-1	300	100	1300
4-1-0	17	7.0	46	5-5-2	500	200	2000
4-1-1	21	9.0	55	5-5-3	900	300	2900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1600	600	5300
4-2-0	22	9.0	56	5-5-5	≥1600	-	-
4-2-1	26	12	65				

<sup>1</sup> Puisque les quantités d'échantillon utilisées sont de 1, 0.1 et 0.01 g, les valeurs de NPP obtenus sont divisées par 10

## Références

- ABD EL-RAHMAN H.A., D. Fritze, C. Sproer, & D. Claus. 2002. "Two novel psychrotolerant species, *Bacillus psychrotolerans* sp. nov. and *Bacillus psychrodurans* sp. nov., which contain ornithine in their cell walls." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Papers in Press, published online
- ALTEKRUSE S.F., D.L. Swerdlow & S.J. Wells. 1998. "Factors in the emergence of food borne diseases". Veterinary Clinical of North America, vol. 14, p. 1-15.
- AMANN R.I., J. StromLey & K.H. Schleifer. 1995. "Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation". Microbiological Review, vol. 59, p. 143-169.
- ANEJA, V.P., J.P. Chauhan & J.T. Walker. 2000. "Characterization of atmospheric ammonia emissions from swine waste storage and treatment lagoons". Journal of Geophysical Research, vol. 105, no. D9, p. 11535-11545.
- A .O.A.C International. 1995. Bacteriological Analytical Manual. 8th Edition. Food Drug Administration. .
- ATLAS R.M. & R. Bartha. 1997. Microbial Ecology, Fundamentals and Applications. (4<sup>th</sup> éd.), Menlo Parck (Ca): Benjamin/Cummings Science Publishing, 694p.
- BANAT F.A., S. Pechtl & F. Bischof. 2000. "Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge contaminated with 4-nonylphenol". Chemosphere, vol. 41, p. 297-302.
- BARR T.A., J.M. Taylor & S.J.B. Duff. 1996. "Effect of HRT, STR and temperature on the performance of activated sludge reactors treating bleached Kraft mill effluent". Water Research, vol. 30, no. 4, p. 799-810.
- BAUMGARTEN E., M. Nagel & R. Tischner. 1999. "Reduction of the nitrogen and carbon content in swine waste with algae and bacteria". Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 52, p. 281-284.
- BEAUDET R., C. Gagnon, J.G. Bisailon & M. Ishaque. 1990. "Microbiological aspects of aerobic thermophilic treatment of swine waste". Applied and Environmental Microbiology, vol. April, p. 971-976.
- BÖHM H.O. 1984. "The effect of aerobic-thermophilic treatment on pig liquid manure containing different viruses". Agricultural Wastes, vol. 10, p. 47-60.
- BROWN T.A. 1995. Gene Cloning, an Introduction. 3th edition. Manchester: Stanley Thornes (Publishers) Ltd, 334 p.

BRUINS M.E., A.E.M. Janssen & R.M. Boom. 2001. "Thermozymes and their applications, a review of recent literature and patents". Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 90, p. 155-186.

BURNS R.T., L.B. Moody, F.R. Walker & D.R. Raman. 2001. "Laboratory and *in-situ* reduction of soluble phosphorus in swine waste slurries". Environmental Technology, vol. 22, p. 1273-1278.

BURT P., S.F. Morgan, B.N. Dancer & J.C. Fry. 1990. "Microbial populations and sludge characteristics in thermophilic aerobic sewage sludge digestion". Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 33, p. 725-730.

CANALE-PAROLA E. 1984. "The spirochetes". In R.G.E. Murray, D.J. Brenner, M.P. Bryant, J.G. Holt, N.R. Krieg, J.W. Moulder, N. Pfennig, P.H.A. Sneath & J.T. Staley Eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Baltimore, MD.: Williams & Wilkins, p. 38-62.

Centrer for Food Safety & Applied Nutrition. 1998. "Bacteriological analytical manual". 8<sup>th</sup> Edition. US Food & Drug Administration.

Centre d'Expertise et d'Analyse Environnementale du Québec. 2000. "Méthode d'analyses *Salmonella*". Ministère de l'environnement du Québec.

Centre d'Expertise et d'Analyse Environnementale du Québec. 2000. "Méthode d'analyses Coliformes". Ministère de l'environnement du Québec.

CHANG C. & T. Entz. 1996. "Nitrate leaching looses under repeated cattle feedlot manure applications in southern Alberta". Journal of Environmental Quality, vol. 25, p. 145-153.

CHEN X., T. Baumstark, G. Steger & D. Riesner. 1995. "High resolution SSCP by optimization of the temperature by transverse TGGE". Nucleic Acids Research, vol. 23, no. 21, p. 4524-4545.

CHEUNBARN T. & K.R. Pagilla. 1999. "Temperature and SRT effects on aerobic thermophilic sludge treatment". Journal of Environmental Engineering, vol. July, p. 626-629.

CHIKH G., J. Pourquié, P. Kaiser & A.M. Davila. 1997. "Characterization of the bacterial flora isolated from a pilot-scale lagoon processing swine manure". Canadian Journal of Microbiology, vol. 43, p. 1079-1083.

CHOI K. 1999. "Optimal operating parameters in the composting of swine manure with wastpaper". Journal of Environmental Science and Health, vol. B34, no. 6, p. 975-987.

COFFEY, M.T. 1999. "A swine integrator's perspective on nutrient management procedures". Journal of Animal Science, vol. 77, p. 445-449.

COLE D.J., V.R. Hill, F.J. Humenik & M.D. Sobsey. 1999. "Health, safety, and environmental concerns of farm animal waste". In Occupational Medicine: State of the Art Reviews, vol. 14, no. 2, p. 423-448. Philadelphia: Hanley & Belfus, Inc.

COOPER C.M. 1993. "Biological effects of agriculturally derived surface water pollutants on aquatic systems. A review". Journal of Environmental Quality, vol. 22, p. 402-408.

COUILLARD D., S. Gariépy & F.T. Tran. 1989. "Slaughterhouse effluent treatment by thermophilic aerobic process". Water Research, vol. 23, no. 5, p. 573-579.

CUCHACOVICH R., S. Japa, W.Q. Huang, A. Calvo, L. Vega, R.B. Vargas, R. Singh, D. Flores, I. Castro, L.R. Espinoza. 2002. "Detection of bacterial DNA in Latin American patients with reactive arthritis by polymerase chain reaction and sequencing analysis". Journal of Rheumatology, vol. 29, no. 7, p. 1426-1429.

CULLEY J.L.B, P.A. Phillips, F.R. Hore, N.K. Patni. 1981. "Soil chemical properties and removal of nutrients by corn resulting from different rates and timing of liquid dairy manure applications". Canadian Journal of Soil Science, vol. 61, p. 35-46.

DAE SUNG LEE, Che Ok Jeon & J.M. Park. 2001. "Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system". Water Research, vol. 35, no. 16, p. 3968-3976.

De BERTOLDI M., V. Citernesi & M. Griselli. 1980. "Bulking agents in sludge composting". Compost Science, vol. 21, p. 32-35, 41.

DEES P.M. & W.C. Ghiorse. 2001. "Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA". FEMS Microbiology Ecology, vol. 35, no. 2, p. 207-216.

de la NOÛE J., J. S. Reysac, C. Mariojouis, J. Marcel & S. Sylvestre. 1994. "Biotreatment of swine manure by intensive lagooning during winter". Bioresource Technology, vol. 50, p. 213-219.

DEMHARTER W. & R. Hensel. 1989. "*Bacillus thermocloaceae* sp. nov., a new thermophilic species from sewage sludge". Systematic Applied Microbiology, vol. 11, p. 272-276.

DONHAM K.J. 2000. "The concentration of swine production, Effects on swine health, productivity, human health, and the environment". Veterinary clinics of north america: food animal practice, vol. 16, no. 3, p. 559-596.

DOYLE Y., R. Guay, J. de la Noüe & J. Asselin. 1986. "Traitement aérobie du lisier de porc: aspects microbiens". Canadian Journal of Microbiology, vol. 32, p. 679-686.

DROFFNER M.L. & W. F. Brinton. 1995. "Survival of *E. coli* and *Salmonella* population in aerobic thermophilic composts as measured with DNA gene probes". Zpl. Hyg., vol. 197, p. 387-397.

EDWARDS U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. 1989. "Isolation and direct nucleotide determination of entire genes. Characterisation of a gene encoding for 16S ribosomal RNA". Nucleic Acids Research, vol. 17, p. 7843-7853.

Fédération des Producteurs de Porcs du Québec. "Rapport Annuel 2001-2002". Référence électronique. <http://www.leporcduquebec.qc.ca>.

FINSTEIN M.S. & M.L. Morris. 1975. "Microbiology of municipal solid waste composting". Advanced in Applied Microbiology, vol. 19, p. 113-151.

FISCHER S.G. & L.S. Lerman. 1979. "Two-dimensional electrophoretic separation of restriction enzyme fragments of DNA". Methods Enzymology, vol. 68, p. 183-191.

FOGEL G.B., C.R. Collins, J. Li & C.F. Brunk. 1999. "Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population". Microbial Ecology, vol. 38, p. 93-113.

Food and Drug Administration. 1998. Bacteriological Analytical Manual

FORSHELL L.P. 1993. "Composting of cattle and pig manure". Journal of Veterinary Medecin, vol. B40, p. 634-640.

FORSTER C.F., E. Chacin & N. Fernandez. 2000. "The use of ultrasound to enhance the thermophilic digestion of waste activated sludge". Environmental Technology, vol. 21, p. 357-362.

GARIÉPY S., R.D. Tyagi, D. Couillard & F. Tran. 1989. "Thermophilic process for protein recovery as an alternative to slaughterhouse wastewater treatment". Biological Wastes, vol. 29, p. 93-105.

GINNIVAN M.J., J.L. Woods & J.R. O'Callaghan. 1981. "Thermophilic aerobic treatment of pig slurry". Journal of Agricultural and Engineering Resource, vol. 26, p. 455-466.

HASTINGS R. 1997. "Application of denaturing gradient gel electrophoresis to microbial ecology". In C. Edwards. Methods in Biotechnology, vol. 12: Environmental Monitoring of Bacteria. Totowa, New Jersey: Humana Press, p. 175-186.



HILL V.R. & M.D. Sobsey. 2001. "Removal of *Salmonella* and microbial indicators in constructed wetlands treating swine wastewater". Water Science and Technology, vol. 44, no.11-12, p. 215-222.

HOODA P.S., A.C. Edwards, H.A. Anderson, A. Miller. 2000. "A review of water quality concerns in livestock farming areas". 2000. "A review of water quality concerns in livestock farming areas". The Sciences of the Total Environment, vol. 250, p. 143-167.

IANNOTTI E.L., J.R. Fisher & D.M. Sievers. 1982. "Characterization of bacteria from a swine manure digester". Applied and Environmental Microbiology, vol. 43, no. 1, p. 136-143.

Intergovernmental Panel on Climate Change. 1990. "Climate change: The IPCC Scientific Assessment". J.T. Houghton, B.J. Jenkins, & J.J. Ephraums (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 365 pp.

Intergovernmental Panel on Climate Change. 2001. "Climate change: The scientific basis". J.T. Houghton, L.G. Meira Filho, B.A. Callander, N. Harris, A. Kattenberg & K. Maskell. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 944 pp.

ISHII K., M. Fukui & S. Takii. 2000. "Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis". Journal of Applied Microbiology, vol. 89, p. 768-777.

JAHREN S.J. & H. Ødegaard. 1999. "Treatment of thermomechanical pulping (TMP) whitewater in thermophilic anaerobic-aerobic moving bed biofilm reactors". Water Science and Technology, vol. 40, p. 81-89.

JAHREN S.J., J.A. Rintala & H. Ødegaard. 2002. "Aerobic moving bed biofilm reactor treating thermomechanical pulping whitewater under thermophilic conditions". Water Research, vol. 36, p. 1067-1075.

JIN L. & M. Nei. 1990. "Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis". Molecular Biology Evolution, vol. 7, no. 1, p. 82-102.

JONES D. & M.D. Collins. 1984. "Irregular nonsporng Gram-positive rods". In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt Eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Baltimore, MD.: Williams & Wilkins, p. 1261-1434.

JONGBLOED A.W., N. P. Lenis. 1998. "Environmental concerns about animal manure". Journal of Animal Science, vol. 76, p. 2641-2648.

KELLY H.G., H. Melcer, D.S. Mavinic. 1992. "Autothermal thermophilic aerobic digestion of municipal sludges: A one-year, full-scale demonstration project". Water Environment Research, vol. 65, no. 7, p.849-861.

KIM Y.K., J.H. Bae, B.K. Oh, W.H. Lee & J.W. Choi. 2002. "Enhancement of proteolytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearothermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process". Bioresource Technology, vol. 82, p. 157-164.

KOWALCHUK G.A., J.R. Stephen, W. De Boer, J.I. Prosser, T.M. Embley & J.W. Woldendorp. 1997. "Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments". Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 1489-1497.

KUME S. & Y. Fujio. 1990. "Digestion of municipal sewage sludge by a mixture of thermophilic bacilli and their culture extract". Journal of General Microbiology, vol. 36, p. 189-194.

KURISU F., H. Satoh, T. Mino & T. Matsuo. 2002. "Microbial community analysis of thermophilic contact oxidation process by using ribosomal RNA approaches and the quinone profile method". Water Research, vol. 36, p. 429-438.

LAPARA T.M. & J.E. Alleman. 1999. "Thermophilic aerobic biological wastewater treatment". Water Research, vol. 33, no. 4, p. 895-908.

LAPARA T.M., A. Konopka, C.H. Nakatsu & J.E. Alleman. 2000a. "Effects of elevated temperature on bacterial community structure and function in bioreactors treating a synthetic wastewater". Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol 24, p. 140-145.

LAPARA T.M., A. Konopka, C.H. Nakatsu & J.E. Alleman. 2000b. "Thermophilic aerobic wastewater treatment in continuous-flow bioreactors". Journal of Environmental Engineering, vol. août, p. 739-744.

LAPARA T.M., C.H. Nakatsu, L. Pantea & J.E. Alleman. 2000c. "Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater". Applied and Environmental Microbiology, vol. septembre, p. 3951-3959.

LAPARA T.M., A. Konopka, C.H. Nakatsu & J.E. Alleman. 2001. "Thermophilic aerobic treatment of a synthetic wastewater in a membrane-coupled bioreactor". Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 26, p. 203-209.

LAPARA T.M., C.H. Nakatsu, L.M. Pantea, J.E. Alleman. 2002. "Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE". Water Research, vol. 36, p. 638-646.

- LEE D.H., Y.G. Zo & S.J. Kim. 1996. "Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism". Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, no. 9, p. 3112-3120.
- LESER T.D., J.Z. Amenuvo, T.K. Jensen, R.H. Lindecrona, M. Boye, K. Møller. 2002. "Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited". Applied and Environmental Microbiology, vol. Février, p. 673-690.
- LEUNG K. & E. Topp. 2001. "Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA". FEMS Microbiology Ecology, vol. 38, p. 169-177.
- MALLADI B. & S.C. Ingham. 1993. "Thermophilic aerobic treatment of potato-processing wastewater". World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 9, p. 45-49.
- MASSÉ D.I., N.K. Patni, R.L. Droste & K.J. Kennedy. 1996. "Operation strategies for psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors". Canadian Journal of Civil Engineering, vol. 23, p. 1285-1294.
- MASSÉ D.I. 1999. "Low temperature anaerobic treatment of swine manure". In R. Margesin & F. Schinner. *Biotechnological application of cold adapted organisms*. p. 257-269.
- McDOWELL R.W. & A.N. Sharpley. 2001. "Phosphorus losses in subsurface flow before and after manure application to extensively farmed land". The Science of the Total Environment, vol. 278, p. 113-125.
- MERROUN M., C. Hennig, A. Rossberg, G. Geipel, T. Reich & S. Selenska-Pobell 2002. "Characterization of uranium (VI) complexes formed by different bacteria recovered from uranium mining waste piles". Conference: UMH III, Freiberg, Sept. 15-21, 2002
- MILLER K.M., T.J. Ming, A.D. Schulze & R.E. Withler. 1999. "Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations". BioTechniques, vol. 27, no. 5, p. 1016-1030.
- MINER J.R. 1999. "Alternatives to minimize the environmental impact of large swine production units". Journal of Animal Science, vol. 77, p. 440-444.
- MUYZER G., E.C. DeWaal & A.G. Uitterlinden. 1993. "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA". Applied and Environmental Microbiology, vol. 59, no. 3, p. 695-700.

- MUYZER G. & K. Smalla. 1998. "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology". Antonie van Leeuwenhoek, vol. 73, p. 127-141.
- MUYZER G. 1999. "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems". Current Opinion in Microbiology, vol. 2, p. 317-322.
- MYERS R.M., V.C. Sheffield & D.R. Cox. 1989. "Mutation detection by PCR, GC-clamps, and denaturing gradient gel electrophoresis". Chap 7. In H.A. Erlich. PCR Technology, Principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press, p. 71-88.
- NG W.J. 1989. "A sequencing batch anaerobic reactor for treating piggery wastewater", Biological Wastes, vol. 28, p. 39-51.
- OHTANI, S and H. Kuraishi. 1998. Renibacterium salmoninarum 16S sequence. Publish in database only. NCBI GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- OSADA T., K. Haga & Y. Harada. 1991. "Removal of nitrogen and phosphorus from swine wastewater by the activated sludge units with the intermittent aeration process". Water Research, vol. 25, no. 11, p. 1377-1388.
- PAGILLA K.R., H. Kim, T. Cheunbarn. 2000. "Aerobic thermophilic and anaerobic mesophilic treatment of swine waste". Water Research, vol. 34, no. 10, p. 2747-2753.
- PAMPALON R. & G. Légaré. 1997. "Détresse psychologique chez les résidents de municipalités productrices de porcs au Québec". Comité de santé environnementale du Québec, 3p.
- PASTER B.J., S.K. Boches, J.L. Galvin, R.E. Ericson, C.N. Lau, V.A. Levanos, A. Sahasrabudhe & F.E. Dewhirst. 2001. "Bacterial diversity in human subgingival plaque". Journal of Bacteriology, vol.183, no. 12, p. 3770-3783.
- PERTULLA M., M. Konrádsdóttir, J. Pere, J.K. Kristjánsson & L. Viikari. 1991. "Removal of acetate from NSSC sulphite pulp mill condensates using thermophilic bacteria". Water Research, vol. 25, no. 5, p. 599-604.
- PILON, A. 1984. "Procédé Fuchs". Ministère de l'environnement du Québec. 177 pages.
- POLPRASERT C. 1996. Organic waste recycling, technology and management. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons. p. 69-113.
- PONTI C., B. Sonnleitner & A. Fiechter. 1995a. "Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge at pilot plant scale. 1. Operation conditions". Journal of Biotechnology, vol. 38, p. 173-182.

PONTI C., B. Sonnleitner & A. Fiechter. 1995b. "Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge at pilot plant scale. 2. Technical solutions and process design". Journal of Biotechnology, vol. 38, p. 183-192.

PRYDE S.E., A.J. Richardson, C.S. Stewart & H.J. Flint. 1999. "Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen and cecal lumen of a pig". Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no. 12, p. 5372-5377.

RAINEY F.A., D. Fritze & E. Stackebrandt. 1994. "The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis". FEMS Microbiology Letters, vol.115, no. 2-3, p. 205-11.

RIM J.M. & D.J. Han. 2000. "Process development for nitrogen removal of swine waste". Water Science and Technology, vol. 42, no. 3-4, p. 239-246.

RINTALA J. & R. Lepistö. 1993. "Thermophilic anaerobic-aerobic and aerobic treatment of Kraft bleaching effluents". Water Science Technology, vol. 28, no. 2, p. 11-16.

ROLAND D.A., R.W. Gordon & S.K. Rao. 1993. "Phosphorus solubilization and its effect on the environment". Proc. MD Nutritional Conference, p. 133-145.

ROZICH A.F., S.G. Clay & R.J. Colvin. 1992. "Thermophilic aerobic treatment of high-strength ground water: bench-scale results". In: 47<sup>th</sup> Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Chelsea, Michigan, p. 261-267.

ROZICH A.F. & R.J. Colvin. 1997. "Design and operational considerations for thermophilic aerobic reactors treating high strength wastes and sludges". In: 52<sup>nd</sup> Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Chelsea, Michigan, p. 1-5.

RYLANDER R., B. Bake, J.J. Fischer & I.M. Helander. 1989. "Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin". American Review of Respiratory Disease, vol. 140, p. 981-986.

RYNK R. 1992. "On-farm composting handbook". Cooperative Extension, Northeast Regional Agricultural Engineering Service, NRAES #54, p. 6-23.

SAKAI Y., T. Aoygi, N. Shiota, A. Akashi & S. Hasegawa. 2000. "Complete decomposition of biological waste sludge by thermophilic aerobic bacteria". Water Science and Technology, vol. 42, no. 9, p. 81-88.

Santé Canada. 1999. Guide canadien d'évaluation des incidences sur la santé. Vol. 2, Prise de décisions en matière d'évaluation des incidences de l'environnement sur la santé. Partie 7.

SCHIFFMAN S.S. 1995. "The effect of environmental odors emanating from commercial swine operations on the mood of nearby residents". Brain Research Bulletin, vol. 37, p. 369-375.

SCHIFFMAN S.S. 1998. "Livestock odors: Implications for human health and well-being". Journal of Animal Science, vol. 76, p. 1343-1355.

SCHLEIFER K.H. 1984. "Gram-positive cocci". In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt Eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Baltimore, MD.: Williams & Wilkins, p. 999-1103.

SEKIGUCHI H., N. Tomioka, T. Nakahara & H. Uchiyama. 2001. "A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis". Biotechnology Letters, vol. 23, p. 1205-1208.

SHARPLEY A.N. & P.J.A. Withers. 1994. "The environmentally sound management of agricultural phosphorus". Fertilisant Research, vol. 39, p. 133-146.

SMITH K.A., A.J. Brewer, A. Dauven & D.W. Wilson. 2000. "A survey of the production and use of animal manures in England and Wales. I. Pig manure". Soil Use and Management, vol. 16, p. 124-132.

SNEATH P.H.A. 1984. "Endospore-forming Gram positive rods and cocci". In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt Eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Baltimore, MD.: Williams & Wilkins, p. 1104-1139.

SPINARDI L., R. Mazars & C. Theillet. 1991. "Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP". Nucleic Acids Research, vol. 19, no. 14, p. 4009.

SONNLEITNER B. & M. Bomio. 1990. "Physiology and performance of thermophilic microorganisms in sewage sludge treatment processes". Biodegradation, vol. 1, p. 133-146.

SPOELSTRA S.F. 1978. "Enumeration and isolation of anaerobic microbiota of piggery wastes". Applied and Environmental Microbiology, vol. 35, no. 5, p. 841-846.

STOVER E.L. & G.J. Samuel. 1997. "High rate thermophilic pretreatment of high strength industrial wastewaters". In 52<sup>nd</sup> Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Chelsea, Michigan, p. 17-22.

SÜRÜCÜ G. 1999. "Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes". Water Science Technology, vol. 40, no. 1, p. 53-60.

SUZUKI K., Y. Tanaka, T. Osada & M. Waki. 2002. "Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration". Water Research, vol. 36, no. 12, p. 2991-2998.

Swine Odor Task Force. 1995. "Options for managing odors". North Carolina Agricultural Resource Service. North Carolina State University, Raleigh.

TAJIMA K., S. Arai, K. Ogata, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, R.I. Aminov & Y. Benno. 2000. "Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet". Anaerobe Environmental Microbiology, vol. 6, p. 273-284.

THOMPSON J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. "CLUSTALW: 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.

TÓTH E., G. Kovacs, P. Schumann, A.L. Kovacs, U. Steiner, A. Halbritter & K. Marialigeti. 2001. "*Schineria larvae* gen. nov., sp. nov., isolated from the 1st and 2<sup>nd</sup> larval stages of *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae)". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 51, no. Pt 2, p. 401-407

TURNER C., S.M. Williams, C.H. Burton, T.R. Cumby, P.J. Wilkinson & J.W. Farrent. 1999. "Pilot scale thermal treatment of pig slurry for the inactivation of animal virus pathogens". Journal of Environmental and Science Health, vol. B34, no. 6, p. 989-1007.

UGWUANYI J.O., L.M. Harvey & B. McNeil. 1999. "Effect of process temperature, pH and suspended solids content upon pasteurization of a model agricultural waste during thermophilic aerobic digestion". Journal of Applied Microbiology, vol. 87, p. 387-395.

United State Environmental Protection Agency (USEPA). 1990. "Autothermal thermophilic aerobic digestion of municipal wastewater sludge". In: Environmental Regulation and Technology. Washington DC.

VERHILLE S., N. Baida, F. Dabboussi, M. Hamze, D. Izard & H. Leclerc. 1999. "*Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters". International Journal of Systematic in Bacteriology, vol. 49, no. 4, p. 1559-1572.

VETTER R.L., D.J. Frederick & P.H. Huntington. 1990. "Full scale anaerobic digester and waste management system for a 300 cow dairy". Agriculture and Food Processing Waste, p. 236-249.

WATANABE K., Y. Kodama & S. Harayama. 2001. "Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting". Journal of Microbiological Methods, vol. 44, p. 253-262.

WESTERMAN P.W., J.R. Bicudo & A. Kantardjieff. 2000. "Upflow biological aerated filters for the treatment of flushed swine manure". Bioresource Technology, vol. 74, p. 181-190.

WHITFORD M.F., R.J. Forster, C.E. Beard, J. Gong and R.M. Teather. 1997. "Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes". Anaerobe, vol. 4, p.153-163.

WHITMORE T.N. & L.J. Robertson. 1995. "The effect of sewage sludge treatment processes on oocysts of *Cryptosporidium parvum*". Journal of Applied Bacteriology, vol. 78, p. 34-38.

YANG, D. and C.R. Woese. 1990. "A phylogenetic analysis of some high G+C gram positive species". Unpublish. NCBI GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

ZHU J. 2000. "A review of microbiology in swine manure odor control". Agriculture, Ecosystems and Environment, vol. 78, p. 93-106.

ZHU J., A. Luo, P. Ndegwa. 2001. "Raising pH by low-level aeration for soluble phosphorus removal of swine manure". Transactions of the ASAE, vol. 44, no. 2, p. 391-396.

ZUCCONI R. & M deBertoldi. 1987. "Specification for solid waste compost". Biocycle, vol. 28, p. 56-62.

ZVAUYA R., W. Parawira & C. Mawadza. 1994. "Aspects of aerobic thermophilic treatment of Zimbabwean traditional opaque-beer brewery wastewater". Bioresource Technology, vol. 48, p. 273-274.