

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

**Dynamique de la dénitrification en milieux salins des  
espèces *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1  
et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23**

Par

Alexandra Cucaita Vasquez

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

**Jury d'évaluation**

Président du jury et examinateur interne	Ph.D. Salim Timo Islam INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
Examineur externe	Ph.D. Mohamed Hijri Université Montréal
Examineur externe	Ph.D. David Juck Conseil national de recherches Canada
Directeur de recherche	Ph.D. Richard Villemur INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

*" Notre chemin n'est pas à travers des prairies herbeuses faciles, mais c'est plutôt un chemin de montagne escarpé plein de difficultés. Mais toujours en avant, vers le haut, vers le soleil."*

*Ruth Westheimer*

## REMERCIEMENT

Je veux remercier d'abord mon directeur de recherche Richard Villemur de m'avoir permis faire partie de son laboratoire. Merci pour le soutien, la patience et le dévouement mis à mon travail pendant toutes ces années. Merci pour avoir enrichi ma formation, pour avoir encouragé le développement de mon esprit scientifique et pour avoir participé à cette grande réussite. Merci d'avoir cru en mes capacités, d'avoir toujours été prêt à m'aider, à m'écouter et à me donner ton support tout ce temps.

Je suis infiniment reconnaissante envers ma famille. Merci à ma mère, à ma sœur et à mes nièces pour avoir cru en moi, pour avoir été présentes malgré la distance. À ma fille bien-aimée Juliana qui a été mon soutien et qui m'a accompagné dans cette grande aventure qu'est le doctorat. Merci pour votre soutien, votre compagnie et votre amour.

Merci à mes collègues de laboratoire Livie et Rose pour leur amitié et leur soutien.

Merci à mes amis pour leur compagnie et leur soutien inconditionnel, et à tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont été présents durant ces années.

## RÉSUMÉ

La production excessive de polluants dans les milieux marins dérivés de la croissance des organismes aquatiques peut interférer avec l'équilibre des écosystèmes. Le nitrate est un problème sérieux dans les systèmes en circuit fermé (l'eau est continuellement recyclée) comme les aquariums, car il s'accumule rapidement en devenant toxique pour certains organismes. La dénitrification biologique est de plus en plus utilisée pour traiter et éliminer le nitrate des eaux usées constituant une alternative efficace et économique. Deux souches bactériennes ont été isolées d'un biofilm issu d'un réacteur de dénitrification à lit fluidisé alimenté au méthanol pour contrôler la concentration de nitrate dans le grand aquarium d'eau marine du Biodôme de Montréal. Ces deux souches sont responsables de l'activité dénitrifiante dans le biofilm. La première souche, *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1, est capable de croître en culture pure dans des conditions anoxiques, en réduisant le  $\text{NO}_3^-$  en nitrite; Elle ne peut réduire le  $\text{NO}_2^-$  en NO. Toutefois, elle peut réduire le NO en  $\text{N}_2\text{O}$ , et le  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$ . La deuxième souche, *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, est capable de dénitrification complète, à partir du  $\text{NO}_3^-$  jusqu'au  $\text{N}_2$ .

Nous avons émis l'hypothèse qu'une complémentarité entre les deux espèces existerait dans le biofilm pour assurer une bonne activité dénitrifiante. Le but du projet a été d'évaluer le degré de cette complémentarité en utilisant une approche de co-cultures. Il a été nécessaire de caractériser la dynamique de l'interaction entre ces deux espèces dans le milieu marin pour établir l'impact et l'apport de chacune à l'intérieur du processus. Très peu d'études ont été faites impliquant des co-cultures de souches bactériennes dénitrifiantes et encore moins en milieu marin. Les résultats obtenus dans ce projet permettront d'améliorer l'efficacité du processus de dénitrification et leur soutenabilité lorsqu'ils seront appliqués à plus grande échelle, ce qui pourra nous amener au développement d'un bioprocédé de dénitrification en milieu marin plus efficace.

Avec les connaissances acquises sur les deux souches à travers plusieurs études dans notre laboratoire et avec une série de tests visant à établir les caractéristiques physiologiques et de synergie entre les souches, il a été possible d'établir que la souche JAM1 possède un avantage sur la souche NL23 en ce qui concerne l'assimilation du substrat lorsqu'il est utilisé en co-cultures. La souche JAM1 est capable de réduire le nitrate présent dans le milieu de culture dans un temps plus court que celui observé pour

la souche NL23, du fait qu'elle a une affinité plus élevée du nitrate. Cependant, une stimulation préalable de la voie de dénitrification de la souche NL23 a permis à celle-ci de réduire le temps d'assimilation du substrat et ainsi d'améliorer ses performances pour être plus compétente en co-cultures par rapport à la souche JAM1.

Les tests d'antagonisme réalisés avec les souches ont montré qu'il n'y a aucun type d'interaction négative entre les souches qui puisse affecter la croissance de l'une d'entre elles lorsqu'elles sont en co-cultures, tout comme aucun type de molécule de communication (quorum sensing) n'est produit qui interfèrerait avec la densité de certaines des souches lors du développement de biofilm.

Le suivi des co-cultures a été réalisé aussi bien à l'état planctonique qu'à l'état Biofilm, à travers différentes concentrations de NaCl. À l'état planctonique, la souche NL23 a présenté un taux de dénitrification plus faible lorsqu'elle est trouvée en culture pure par rapport à ce qui a été observé en co-cultures. De plus, la faible capacité de la souche NL23 à croître à des concentrations élevées de NaCl, lorsqu'elle est en suspension a été mise en évidence. Le développement et le suivi d'un biofilm dans un réacteur a donné à la souche NL23 la possibilité de s'acclimater à un milieu marin. La capacité des deux souches à adhérer aux supports a permis la formation d'un biofilm performant, avec une activité dénitrifiante permanente, dans lequel la souche NL23 était toujours active et présente. La souche JAM1 a toujours été trouvée dans une proportion plus élevée à travers les différentes concentrations de NaCl évaluées. Il a été déterminé que la souche JAM1 était capable de produire le soluté compatible appelé de l'ectoïne. Ces solutés compatibles, en plus de maintenir l'équilibre osmotique causée par une concentration élevée de sels ou d'autres solutés non ioniques dans le milieu extracellulaire, ont des propriétés biostabilisantes. (Pastor J. et al., 2010). L'importance dans cette étude s'est concentrée sur la démonstration que la souche JAM1 est capable de produire d'ectoïne dans le milieu de culture, permettant une meilleure adaptation de la souche NL23 aux changements brusques de concentration en NaCl dans la co-culture. En plus d'établir que la concentration de cette molécule dans le milieu de culture était proportionnelle à l'augmentation de la concentration en sel. La concentration d'ectoïne dans le biofilm du réacteur (co-culture) était plus élevée à des concentrations élevées de NaCl. La présence de cette molécule dans la co-culture biofilm est un facteur important qui expliquerait

pourquoi la souche NL23 a été mieux adaptée aux changements de concentration de NaCl dans le biofilm.

Ces résultats illustrent la capacité des souches NL23 et JAM1 pour effectuer une dénitrification performante en milieu marin. Bien que la souche JAM1 n'ait pas contribué à de meilleures activités dénitrifiantes spécifiques dans les réacteurs, sa présence était essentielle à la survie de la souche NL23 dans un milieu avec des concentrations supérieures à 1,0% de NaCl.

**Mots-clés :** Biofilm, *Hyphomicrobium nitratorans* NL23, *Methylophaga nitratireducentescens* JAM1, activité dénitrifiante, co-culture.

## ABSTRACT

The excessive production of pollutants in marine environments derived from the growth of aquatic organisms can interfere with the balance of ecosystems. Nitrate is a serious problem in closed loop systems (water is continuously recycled) such as aquariums because it accumulates quickly and becomes toxic to some organisms. Biological denitrification is increasingly used to treat and remove nitrate from wastewater as an efficient and economical alternative. Two bacterial strains were isolated from a biofilm from a methanol-fueled fluidized bed denitrification reactor to control the nitrate concentration in the large marine aquarium at the Biodôme de Montréal. These two strains are responsible for the denitrifying activity in the biofilm. The first strain, *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1, is able to grow in pure culture under anoxic conditions, reducing  $\text{NO}_3^-$  to nitrite; It cannot reduce  $\text{NO}_2^-$  to  $\text{NO}$ . However, it can reduce  $\text{NO}$  to  $\text{N}_2\text{O}$ , and  $\text{N}_2\text{O}$  to  $\text{N}_2$ . The second strain, *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, is capable of complete denitrification, from  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{N}_2$ .

We hypothesized that a collaboration between the two species must exist in the biofilm to establish a good denitrifying activity. The aim of the project was to assess the degree of this collaboration using a co-culture approach. It was necessary to characterize the dynamics of the interaction between these two species in the marine environment to establish the impact and contribution of each within the process. Very few studies have been done involving co-cultures of denitrifying bacterial strains and even fewer in the marine environment. The results obtained in this project will improve the efficiency of the denitrification process and its sustainability when applied on a larger scale, which may lead to the development of a more efficient marine denitrification bioprocess.

With the knowledge acquired on the two strains through several studies in the laboratory of Professor Richard Villemur and with a series of tests aimed at establishing the physiological and synergistic characteristics between the strains, it was possible to establish that the JAM1 strain possesses an advantage over strain NL23 with regard to the assimilation of the substrate when it is found in co-cultures. The JAM1 strain is capable of reducing the nitrate present in the culture medium in a shorter time than that observed for the NL23 strain, due to the fact that it has a higher affinity for nitrate. However, prior stimulation of the denitrification pathway of strain NL23 enabled it to reduce the

assimilation time of the substrate and thus improve its performance in order to be more competitive in co-cultures compared to the JAM1 strain.

The antagonism tests carried out with the strains have shown that there is no type of negative interaction between the strains that can affect the growth of one of them when they are in co-cultures, just as no type of communication molecule (quorum sensing) is produced which would interfere with the density of some of the strains during the development of biofilm.

The monitoring of the co-cultures was carried out both in the planktonic state and in the Biofilm state, through different concentrations of NaCl. In the planktonic state, strain NL23 exhibited a lower denitrification rate when it is found in pure culture compared to what was observed in co-cultures. In addition, the low capacity of strain NL23 to grow at high concentrations of NaCl, when it is in suspension has been demonstrated. The development and monitoring of a biofilm in a reactor gave strain NL23 the ability to acclimatize to a marine environment. The ability of the two strains to adhere to the supports allowed the formation of an efficient biofilm, with a permanent denitrifying activity, in which the strain NL23 was still active and present. The JAM1 strain was always found in a higher proportion across the different NaCl concentrations evaluated. It was determined that the JAM1 strain was able to produce the compatible solute called ectoin. These compatible solutes, in addition to maintaining the osmotic balance caused by a high concentration of salts or other non-ionic solutes in the extracellular environment, they have biostabilizing properties. (Pastor J. et al., 2010). The importance in this study focused on the demonstration that the JAM1 strain is able to produce ectoin in the culture medium, allowing a better adaptation of the NL23 strain to sudden changes in NaCl concentration in the co-culture. In addition to establishing that the concentration of this molecule in the culture medium was proportional to the increase in salt concentration. The concentration of ectoin in the reactor biofilm (co-culture) was higher at high concentrations of NaCl. The presence of this molecule in the biofilm co-culture is an important factor that would explain why strain NL23 was better adapted to changes in NaCl concentration in the biofilm.

These results illustrate the ability of strains NL23 and JAM1 to perform efficient denitrification in a marine environment. Although the JAM1 strain did not contribute to

better specific denitrifying activities in the reactors, its presence was essential for the survival of the NL23 strain in a medium with concentrations above 1.0% NaCl.

**Keywords:** Biofilm, *Hyphomicrobium nitratorans* NL23, *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1, denitrifying activity, co-culture.

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT .....	iii
RÉSUMÉ.....	iv
ABSTRACT .....	vii
LISTE DES FIGURES .....	xv
LISTE DES TABLEAUX .....	xviii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xx
1. INTRODUCTION.....	1
2. REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
2.1. La pollution dans l'environnement avec le nitrate .....	3
2.2. Cycle biogéochimique de l'azote .....	5
2.3. Dénitrification .....	6
2.4. Enzymes impliquées dans la dénitrification .....	6
2.4.1. Nitrate réductase .....	7
2.4.2. Nitrite réductase :.....	10
2.4.3. Oxyde nitrique réductase : .....	10
2.4.4. Oxyde nitreux réductase : .....	11
2.5. Régulation de la dénitrification .....	12
2.6. Le système de dénitrification du Biodôme de Montréal.....	13
2.7. Les Méthylotrophes.....	15
2.8. Le genre <i>Hyphomicrobium</i> .....	16
2.8.1. <i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> NL23 .....	17
2.9. Le genre <i>Methylophaga</i> .....	19
2.9.1. <i>Methylophaga nitratreducenticrescens</i> JAM1 .....	19
2.10. Synergie entre <i>Methylophaga</i> sp. et <i>Hyphomicrobium</i> sp.....	21
2.11. Co-cultures.....	23
2.12. Formation du biofilm .....	26
2.13. Interaction inter-espèces .....	30
2.14. Solutés compatibles .....	32
2.14.1. L'ectoïne.....	33

3.	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	36
3.1.	Hypothèses.....	36
3.2.	Objectifs.....	37
3.2.1.	Objectif général.....	37
3.2.2.	Objectifs spécifiques.....	37
4.	MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	38
4.1.	Milieux de cultures.....	38
4.2.	Détermination de la concentration du nitrate et nitrite.....	40
4.2.1.	Détermination par chromatographie ionique.....	40
4.2.2.	Détermination par chlorite de vanadium (VCl <sub>3</sub> ).....	40
4.3.	Concentration de protéines.....	41
4.4.	Calcul du taux de dénitrification spécifique.....	42
4.5.	Dénombrement des souches JAM1 et NL23 par qPCR.....	42
4.5.1.	Extraction de l'ADN.....	42
4.5.2.	Réaction en chaîne par polymérase (PCR) des ADN standards.....	43
4.5.3.	Purification des ADN standards.....	44
4.5.4.	Les essais de qPCR pour les ADN standards.....	44
4.5.5.	PCR quantitative (qPCR).....	45
4.5.6.	L'amplification PCR de séquences des gènes de l'ARN 16S ribosomal.....	46
4.6.	Cinétique de dénitrification des souches JAM1 et NL23.....	47
4.7.	Co-cultures planctoniques des souches JAM1 et NL23.....	47
4.8.	Développement de biofilm.....	48
4.8.1.	Développement de biofilm des souches JAM1 et NL23 sur différentes surfaces.....	48
4.8.2.	Développement du biofilm en Bio-réacteur.....	49
4.9.	Quorum sensing (QS).....	52
4.10.	Production de l'ectoïne.....	52
4.10.1.	Ectoïne extracellulaire.....	52
4.10.2.	Ectoïne intracellulaire.....	53
4.10.3.	Détermination d'ectoïne.....	53
4.11.	Évaluation de l'action antagoniste des souches JAM1 et NL23.....	54
4.12.	Changement du niveau d'expression des gènes de dénitrification dans les co-cultures.....	55
4.12.1.	Extraction de l'ARN total.....	56

4.12.2. Quantification de l'expression des gènes par RT-qPCR .....	57
5. RÉSULTATS .....	59
Objectif 1 : Comparer la dynamique de croissance des souches JAM1 et NL23 en présence du nitrate .....	59
5.1. Affinité du nitrate par les souches JAM1 et NL23 .....	59
5.1.1. Croissance de la souche JAM1 .....	60
5.1.2. Croissance de la souche NL23 .....	61
5.1.3. Réduction du nitrate et du nitrite par la souche JAM1 .....	62
5.1.4. Réduction du nitrate et nitrite par la souche NL23 .....	64
5.1.5. Vitesse de croissance des souches JAM1 et NL23 .....	66
Objectif 2: Détecter la production d'antagonisme entre les souches JAM1 et NL23 .....	67
5.2. Évaluation de l'action antagoniste .....	67
5.2.1. Inhibition simultanée : .....	70
5.2.2. Diffusion en gélose : .....	71
5.2.3. Détection en sensi-disque : .....	72
5.3. Quorum sensing .....	73
Objectif 3 : Déterminer l'impact des co-cultures planctoniques des souches JAM1 et NL23 sur la croissance respective des souches et le taux de dénitrification .....	73
5.4. Évaluation de la concentration de NaCl sur la croissance de la souche JAM1 et la souche NL23 .....	73
5.4.1. Croissance de la souche NL23 dans le milieu Instant Océan (IO) .....	74
5.4.2. Croissance de la souche JAM1 dans le milieu Instant Océan .....	75
5.4.3. Croissance des souches JAM1 et NL23 dans le milieu 337a avec une concentration de 0,5% et 1% de NaCl .....	76
5.4.4. Croissance des souches JAM1 et NL23 dans le milieu 337a et Methylophaga 1403 avec une concentration de 0,5 % de NaCl .....	78
5.5. Croissance en co-cultures des souches JAM1 et NL23 .....	79
5.5.1. Co-cultures avec un inoculum de la souche NL23 non-stimulée .....	79
5.5.1.1. Quantification des souches JAM1 et NL23 par qPCR .....	84
5.5.2. La stimulation de l'activité dénitrifiante de la souche NL23 .....	85
5.5.2.1. Quantification des souches JAM1 et NL23 par qPCR .....	89
Objectifs 4 : Établir un biofilm dénitrifiant en co-culture avec les souches JAM1 et NL23 et mesurer l'influence de ces biofilms sur l'activité dénitrifiante .....	90
5.6. Développement de Biofilm en cultures statiques en tubes .....	90

5.7. Co-cultures en biofilm dans un Bio-réacteur .....	92
5.7.1 Bio-réacteur 1.....	94
5.7.1.1. Détermination du nitrate et du nitrite .....	98
5.7.1.2. Quantification des souches dans le bioréacteur 1 .....	102
5.7.2. Bio-réacteur 2.....	104
5.7.2.1. Détermination du nitrate et du nitrite .....	106
5.7.2.2. Quantification des souches dans la co-culture dans le bioréacteur 2.....	110
5.7.3. Bio-réacteur 3.....	112
5.7.3.1. Détermination du nitrate et du nitrite .....	114
5.7.3.2. Quantification de la souche NL23 dans le bioréacteur 3 .....	118
Objectif 5 : Détecter la production de l'osmoprotectant ectoïne le biofilm en co-culture.....	119
5.8. Analyse de l'ectoïne dans le bioréacteur .....	119
Objectif 6. Mesurer le changement du niveau d'expression des gènes de dénitrification dans les co-cultures .....	122
5.9. Changement du niveau d'expression des gènes de dénitrification des souches JAM1 et NL23 dans le bioréacteur .....	122
6. DISCUSSION.....	129
6.1. Traits physiologiques entre les deux souches .....	129
6.1.1. Affinité du nitrate par les souches JAM1 et NL23 .....	130
6.1.2. Antagonisme entre les souches JAM1 et NL23 .....	132
6.1.3. Communication cellulaire : Quorum sensing.....	134
6.2. Cultures planctoniques et co-cultures des souches JAM1 et NL23.....	135
6.2.1. Sélection du milieu de culture.....	135
6.2.2. Co-cultures planctoniques des souches JAM1 et NL23 dans le milieu 1403 0.5% NaCl.....	137
6.2.3. La stimulation de l'activité dénitrifiante de la souche NL23 .....	138
6.3. Développement du biofilm .....	139
6.4. Développement de co-cultures en biofilm.....	140
6.4.1. Réacteur 1: Co-culture des souches JAM1 et NL23 .....	140
6.4.1.1. Concentrations des souches JAM1 et NL23 dans le bioréacteur 1 .....	142
6.4.2. Réacteur 2: Co-culture des souches JAM1 et NL23 .....	143
6.4.2.1. Concentrations des souches JAM1 et NL23 dans le bioréacteur 2 .....	144
6.4.3. Réacteur 3: Biofilm avec la souche NL23 .....	144

6.5. Mesurer le changement du niveau d'expression des gènes de dénitrification dans les co-cultures : .....	146
6.5.1. Régulation de l'expression des gènes .....	146
6.6. Production d'ectoïne.....	147
7. CONCLUSION GÉNÉRAL DU PROJECT .....	153
8. PERSPECTIVES.....	155
9. BIBLIOGRAPHIE.....	156

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Représentation du cycle de l'azote. ....	5
Figure 2.2 Les étapes de la dénitrification avec les enzymes impliquées dans la dénitrification.....	7
Figure 2.3 Représentation des différentes sous-unités de réductases dans les bactéries.....	9
Figure 2.4 Chaîne de transport des électrons pendant la dénitrification chez <i>Paracoccus denitrificans</i> . ....	12
Figure 2.5 Représentation du système du Biodôme de Montréal .....	14
Figure 2.6 Microscopie électronique d'une cellule mère de la souche <i>Hyphomicrobium nitratorans</i> NL23.....	18
Figure 2.7 Arrangement des opérons de dénitrification et leur position dans le génome de la souche <i>Hyphomicrobium nitratorans</i> NL23.....	18
Figure 2.8 Microscopie électronique de la souche <i>Methylophaga nitratorreducens</i> JAM1.....	20
Figure 2.9 Interactions possibles entre les souches JAM1 et NL23.....	22
Figure 2.10 Conception d'un consortium basé sur les caractéristiques et l'interaction entre les microorganismes d'un système déterminé. ....	26
Figure 2.11 Modèle de formation d'un biofilm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	29
Figure 2.12 Interaction inter-espèces. ....	32
Figure 2.13 Structure chimique de l'ectoïne. ....	34
Figure 4.1 Bioréacteur.....	50
Figure 5.1 Cinétique de croissance de la souche JAM1 à différentes concentrations initiales de nitrate (28, 70, 100, 140, 200, 280, 350, et 560 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/L respectivement).....	60
Figure 5.2 Croissance de la souche NL23 à différentes concentrations initiales de nitrate (28, 70, 140, 280, 350, et 560 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/L respectivement).....	61

Figure 5.3 Réduction du nitrate (A), du nitrite (B) et de l'azote total (Nox)(C) réalisée par la souche JAM1 à différentes concentrations initiales du nitrate (28, 70, 100, 140, 200, 280, 350, et 560 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/L respectivement). .....	63
Figure 5.4 Réduction de nitrate (A), nitrite (B) et de l'azote total (Nox) (C) réalisée par la souche NL23 à différentes concentrations initiales de nitrate (28, 70, 140, 280, 350 et 560 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/L). .....	65
Figure 5.5 Vitesse de croissance des souches NL23 et JAM1 selon la concentration initiale de nitrate en conditions anoxiques. ....	67
Figure 5.6 Contrôle de croissance de chacune des souches sur le milieu 1403 modifié (0,5% NaCl). ....	69
Figure 5.7 Test d'inhibition simultanée entre les souches JAM1 et NL23.....	70
Figure 5.8 Test de diffusion sur gélose.....	71
Figure 5.9 Détection dans les sensi-disques. ....	72
Figure 5.10 Croissance de la souche NL23 dans le milieu Instant Océan (IO). ....	74
Figure 5.11 Croissance de la souche JAM1 dans le milieu Instant Océan (IO).....	75
Figure 5.12 Croissance de la souche JAM1 dans le milieu 337a modifié à une concentration de 0,5% et 1% de NaCl en conditions anoxiques .....	76
Figure 5.13 Croissance de la souche NL23 dans le milieu 337a modifié à des concentrations de 0,5% et 1% de NaCl en conditions anoxiques. ....	77
Figure 5.14 Suivi de la croissance des souches JAM1 et NL23 dans les milieux de culture pour leur croissance pure Methylophaga 1403 et 337a, modifiée à une concentration de 0,5% NaCl.....	78
Figure 5.15 Croissance en co-cultures des souches JAM1 et NL23 dans le milieu Methylophaga 1403 modifié (0,5% NaCl). ....	80
Figure 5.16 Suivi de la réduction du nitrate et du nitrite avec différents ratios des souches JAM1 et NL23 dans les co-cultures.....	82
Figure 5.17 Quantification des gènes des souches JAM1 (narG1) et NL23 (napA) par qPCR dans les co-cultures .....	84
Figure 5.18 Croissance en co-cultures de la souche JAM1 avec la souche NL23 stimulée, avec un ratio 1/1 dans le milieu de culture Methylophaga 1403 modifié .....	86

Figure 5.19 Suivi du processus de dénitrification des co-cultures réalisées avec la souche JAM1 et la souche NL23 stimulée.....	88
Figure 5.20 Quantification des gènes des souches JAM1 (narG1) et NL23 (napA) par qPCR dans les co-cultures. ....	89
Figure 5.21 Formation de Biofilm par les souches NL23, JAM1 et les co-cultures en tubes. ....	91
Figure 5.22 Stratégie dans le développement d'une co-culture en biofilm dans un bioréacteur.....	93
Figure 5.23 État de colonisation de la biomasse sur les supports de Bioflow 9 après 5 mois. ....	98
Figure 5.24 Activité dénitrifiante du bioréacteur 1.....	100
Figure 5.25 Activités dénitrifiantes du bioréacteur 2. ....	108
Figure 5.26 Activité dénitrifiante du bioréacteur 3.....	115
Figure 5.27 Chromatogramme du pic obtenu de l'ectoïne commerciale. L'ectoïne sort avec un temps de rétention de 4 min et un ( <i>m/z</i> ) de 143,1. ....	120
Figure 5.28 Chromatogramme LC-MS en mode MRM des pics correspondant à la production d'ectoïne ( <i>m/z</i> 143) dans le bioréacteur. ....	121
Figure 5.30 Expression relative de la nitrate réductase napA et de la nitrite réductase nirK de la souche NL23. ....	125
Figure 5.31 Expression relative de napA et nirK dans le bioréacteur 3. ....	126
Figure 5.32 Expression relative des deux nitrate réductases narG1 et narG2 dans la souche JAM1. ....	128

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1 Paires d'amorces utilisées pour l'amplification PCR de l'ADN extrait de <i>Methylophaga nitratireducenticrescens</i> JAM1 et <i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> NL23, et ayant servi comme standard dans les essais de qPCR. ....	44
Tableau 4.2 Paires d'amorces spécifiques utilisées pour la quantification de <i>Methylophaga nitratireducenticrescens</i> JAM1 et <i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> NL23 par qPCR .....	46
Tableau 4.3 Paires d'amorces utilisées pour l'amplification de PCR des gènes de l'ARNr 16S chez <i>Methylophaga nitratireducenticrescens</i> JAM1 et <i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> NL23 .....	46
Tableau 4.4 Conditions d'opération des trois réacteurs .....	51
Tableau 4.5 Paires d'amorces spécifiques utilisées pour <i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> NL23 par RT-qPCR.....	58
Tableau 4.6 Paires d'amorces spécifiques utilisées pour <i>Methylophaga nitratireducenticrescens</i> JAM1 par RT-qPCR .....	58
Tableau 5.1 Conditions d'opération du bio-réacteur 1 .....	96
Tableau 5.2 Cinétique de dénitrification du Bioréacteur 1 .....	101
Tableau 5.3 Quantification des souches JAM1 et NL23 par qPCR .....	103
Tableau 5.4 Conditions d'opération du bio-réacteur 2 .....	105
Tableau 5.5 Dynamique de dénitrification du bioréacteur 2. ....	109
Tableau 5.6 Quantification des souches JAM1 et NL23 par qPCR. ....	111
Tableau 5.7 Conditions d'opération du bio-réacteur 3. ....	113
Tableau 5.8 Bioréacteur 3. ....	116
Tableau 5.9 Quantification de la souche NL23 par qPCR.....	118
Tableau 5.10 Concentration de l'ectoïne dans les bioréacteurs 1 et 2. ....	122
Tableau 5.11 Résultats de l'expression relative des deux nitrate réductases narG1 et narG2 de la souche JAM1 (Bioréacteur 2), la nitrate réductase napA et la nitrite réductase nirK de la souche NL23 (Bioréacteur 2 et 3), pour les différentes	

concentrations de NaCl évaluées. Les valeurs sont exprimées en nombre de copies du gène / nombre de copies des gènes de référence rpoB et dnaG ..... 123

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
AOA : Ammonium-Oxidizing Archea  
AOB : Ammonium-Oxidizing bacteria  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARNr : Acide ribonucléique ribosomal  
ASW : Artificial Sea Water  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
cAMP : *cyclic Adenosine MonoPhosphate*  
CBB : Calvin-Benson-Bassham  
EPS : *Extracellular Polymeric Substance*  
FAD, FaDH : *Flavin Adenine Dinucleotide*  
FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*  
FNR : *Fumarate Nitrate reduction Regulator*  
GC : Chromatographe en phase gazeuse  
IO : Instant Ocean® salt mix  
Ks : Constante de demi-saturation  
MAR-FISH : *MicroAutoRadiography*  
MDH : *Methanol DeHydrogenase*  
NAD(P)H : *Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate*  
NAD<sup>+</sup> : *Nicotinamide Adenine Dinucléotide*  
NOB : Nitrite-Oxidizing Bacteria  
Pb : Paires de bases  
PCR : Réaction en chaîne par polymérase  
RNA-seq : *RiboNucleic Acid-sequencing*  
RPM : Révolutions par minute  
RuMP : *Ribulose Mono-Phosphate*  
UQH2 : Ubiquinone

## 1. INTRODUCTION

La production excessive de polluants dans les milieux marins dérivés de la croissance des organismes aquatiques peut interférer avec l'équilibre des écosystèmes. Le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) est un problème sérieux dans les systèmes en circuit fermé (l'eau est continuellement recyclée) comme les aquariums, car il s'accumule rapidement en devenant toxique pour certains organismes. Les concentrations de nitrate peuvent en fait dépasser des valeurs aussi élevées que 25 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L dans les eaux de surface et aller jusqu'à 100 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L dans les eaux souterraines (Camargo et al., 2005). Dans les aquariums marins et les bassins d'aquacultures en circuit fermé, les concentrations en nitrate avec des valeurs aussi élevées que 309 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L ont été reportées (Bower, 1980). En dépit de la préoccupation environnementale mondiale actuelle concernant l'augmentation des concentrations de nitrate dans les eaux souterraines et de surface, relativement peu d'études ont été menées pour évaluer la toxicité du nitrate pour les environnements fermés.

La dénitrification biologique est de plus en plus utilisée pour traiter et éliminer le nitrate des eaux usées constituant une alternative efficace et économique. Avec l'actuel développement des technologies et des connaissances sur les cycles biogéochimiques, la stimulation de l'activité bactérienne en utilisant les bioréacteurs a été très utile dans les systèmes de dénitrification. La dénitrification est considérée comme une des meilleures procédées de biorestauration adaptée à la contamination par le nitrate, car le produit final de transformation, l'azote gazeux, est un produit inoffensif. Elle est devenue une des méthodes la plus appliquée des technologies d'assainissement pour la restauration des eaux (Smit et al., 1994).

Le Biodôme de Montréal possédait un bioréacteur à lit mobile pour éliminer le nitrate de son aquarium de 3 millions de litres d'eau de mer après avoir atteint un niveau critique de 180 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L. Dans ce processus, les bactéries dénitrifiantes utilisaient comme source de carbone le méthanol, et le  $\text{NO}_3^-$  comme accepteur d'électrons pour convertir le  $\text{NO}_3^-$  et le  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{N}_2$ . Du biofilm dénitrifiant de ce réacteur, des bactéries apparentées aux genres *Methylophaga* et *Hyphomicrobium* composaient entre 60-80% de celui-ci. Les souches *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1, ainsi que la

souche *Hyphomicrobium nitratorans* NL23 furent isolées et ont été démontrées être les principales espèces responsables de l'activité dénitrifiante du biofilm.

La souche JAM1 possède des activités de réduction du nitrate en nitrite, mais également de réduction du NO en N<sub>2</sub>O, et puis en N<sub>2</sub>. Elle est incapable de réduire le nitrite en NO. Par contre, la souche NL23 est capable de faire une dénitrification complète. Nous avons émis l'hypothèse que ces deux souches interagissent entre elles pour une activité optimale dans le biofilm. Ce projet de recherche visait donc à répondre à des éléments de notre hypothèse. Pour ce faire nous avons mis à profit une approche de co-cultures. Nous voulions essayer de voir l'influence de la présence des souches lorsqu'elles se trouvaient ensemble sur la dynamique de l'activité dénitrifiante. Est-ce que les interactions établies naturellement entre ces bactéries sont d'un type coopératif ou font partie seulement de la coexistence passive entre elles dans le même système?

## 2. REVUE DE LITTÉRATURE

### 2.1. La pollution dans l'environnement avec le nitrate

Depuis plusieurs décennies, la température moyenne globale montre une augmentation de 0,74 °C au cours des 100 dernières années. Ce réchauffement résulte en grande partie des émissions mondiales des gaz à effets de serre imputables aux activités anthropiques, tels que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), le méthane (CH<sub>4</sub>) et l'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O), dont l'augmentation est marquée depuis l'ère industrielle (IPCC, 2007).

L'impact des activités anthropiques s'est intensifié au point de se répercuter sur le changement climatique. L'agriculture par l'utilisation de fertilisants, l'industrie et les transports par la combustion d'énergies fossiles, sont respectivement responsables de l'augmentation des émissions azotées, sous forme réduite et oxydée. L'azote, une fois émis, est transformé et transporté à travers l'atmosphère et l'hydrosphère, pour se déposer dans des écosystèmes terrestres et aquatiques (van Egmond et al, 2002).

Bien que le nitrate se trouve couramment dans l'environnement à une concentration relativement faible (environ 0,56 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> N / L dans les eaux de l'océan), l'utilisation excessive d'engrais dans l'agriculture a permis son accumulation au-dessus des concentrations de milli molaire (mM) dans les eaux usées qui affectent l'environnement et la santé publique (Moreno-Vivián et al., 2007). La consommation d'eau potable avec des concentrations élevées de nitrate a été associée à la méthémoglobinémie et au cancer gastrique dû à la formation endogène de composés N-nitrosés géno-toxiques par les bactéries du tractus gastro-intestinal. Au Canada, la concentration permise du nitrate dans l'eau potable est de 10 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> N / L (0,7 mM) (EPA, 1986, Guidelines, 2014). Les oxydes d'azote générés par la dénitrification (e.g. oxyde nitreux N<sub>2</sub>O) sont également associés à l'effet de serre et à l'appauvrissement de l'ozone stratosphérique (Moreno-Vivián et al., 1999). Ces derniers sont classés dans la deuxième place au classement des polluants les plus communs dans le monde après les pesticides (Spalding et al., 1993). Le nitrate se retrouve en grande quantité dans les sols; il est soumis au lessivage par les eaux de pluie et les fontes des neiges qui le conduit jusqu'aux nappes phréatiques et aux cours d'eau (Strebel et al., 1989). La pollution est due alors l'excès d'apports en nitrate sous forme d'engrais et ce qui est réellement consommé par les plantes. Par ailleurs, il contribue avec le phosphate à modifier l'équilibre biologique des milieux aquatiques en provoquant des phénomènes

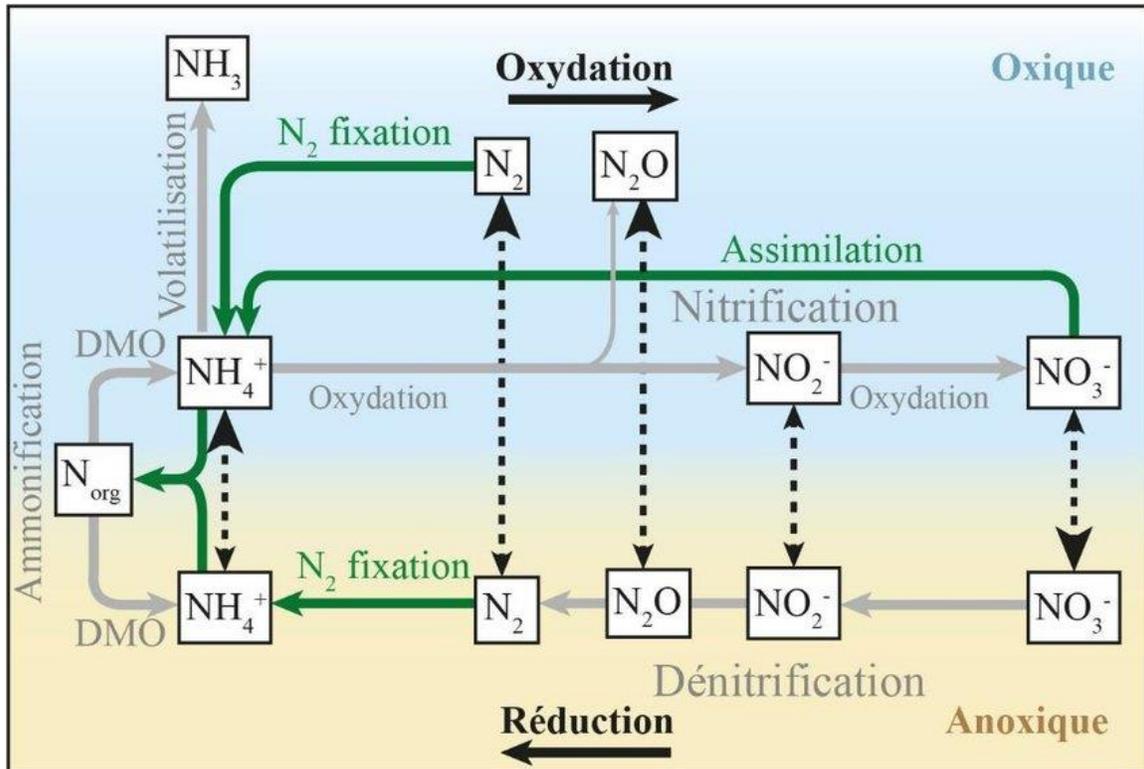
d'eutrophisation, en raison de l'appauvrissement de l'oxygène. Un fort apport nutritionnel en nitrate produit au développement du phytoplancton et d'autres plantes aquatiques, augmentant la turbidité du milieu et provoquant la mort de nombreux organismes vivants par manque d'oxygène (Pitois et al., 2001).

Ce phénomène est un problème aussi dans les systèmes aquatiques fonctionnant en circuit fermé, comme les aquariums où le nitrate s'accumule rapidement. Le catabolisme des molécules biologiques contenant de l'azote (principalement les protéines et des acides nucléiques) conduit à la libération de composés azotés réduits. Dans les milieux aquatiques naturels, ces nutriments sont habituellement assimilés par les plantes. Par contre, dans la plupart des plans d'eau artificiels, comme les aquariums et les systèmes d'aquaculture, la contribution des plantes est insuffisante pour les éliminer. Dans les systèmes d'aquaculture en recirculation, l'eau chargée d'ammoniac passe dans des lits de filtration aérobie où les bactéries chimio-autotrophes l'oxydant d'abord en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) puis en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Cela réduit la toxicité de l'azote excrété parce que la plupart des organismes aquatiques éprouvent une toxicité chronique à des concentrations d'ammoniac et de nitrite à  $10^{-6}$  g / L (1,0 ppm). En revanche, ces mêmes espèces aquatiques peuvent tolérer des concentrations de nitrate aussi élevées que  $5 \times 10^{-4}$  g / L (500 ppm) (Moe, 1993). La toxicité du nitrate pour les animaux est principalement due au phénomène d'anoxie. Une fois dans le sang, le nitrate modifie la forme des transporteurs d'oxygène comme l'hémoglobine, les rendant incapables de fixer les molécules d'oxygène (Cheng et al., 2002). Une concentration inférieure à 20 mg  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  / L (1,4 mM) est admise pour la bonne santé des animaux aquatiques dans les milieux marins (Spotte, 1991). Une fois que les concentrations de nitrate atteignent des niveaux toxiques, il faut l'éliminer; dans la plupart des aquariums et des aquacultures, cela se fait par le remplacement de l'eau (Lee et al., 2000). Par contre, dans les systèmes à recirculation de l'eau, le pourcentage de remplacement de l'eau (5 à 10%) n'est pas suffisant pour empêcher la concentration du nitrate de s'accumuler. Parmi les stratégies d'élimination du nitrate dans ces systèmes, il y a l'addition d'un traitement biologique comme la dénitrification (Qiu et al., 2016).

## 2.2. Cycle biogéochimique de l'azote

L'azote est un élément clé contrôlant la composition, la diversité, la dynamique et le fonctionnement des espèces de nombreux écosystèmes terrestres, d'eau douce et marins (Vitousek et al., 1997). Cet élément chimique essentiel à la vie est utilisé par les êtres vivants pour former un grand nombre de composés organiques. Il est indispensable pour le métabolisme des organismes vivants en tant que constituant des nucléotides, des lipides membranaires et des acides aminés. Malheureusement, l'azote gazeux ne peut pas être utilisé par la plupart des organismes à moins qu'il ne soit d'abord transformé en ammonium (Moreno-Vivián, 1999 ; Bitton, 2005; Köln et al., 2007).

Le cycle de l'azote se divise globalement en quatre parties distinctes : la fixation de l'azote atmosphérique, l'assimilation, la nitrification et la dénitrification. D'autres voies s'ajoutent à celles-ci et sont internes au cycle, comme l'ammonification du nitrite, la conversion de nitrate en nitrite ou l'anammox (anaerobic ammonium oxidation) (fig. 2.1).



**Figure 2.1 Représentation du cycle de l'azote.** Les processus d'assimilation (vert) et de dissociation (gris) sont représentés. Les flèches en pointillées soulignent les échanges entre les environnements oxiques et anoxiques. Modifié de Thamdrup, 2012.

### 2.3. Dénitrification

La dénitrification constitue l'une des principaux processus du cycle global de l'azote entretenu par les bactéries. Elle a lieu dans des cellules bactériennes où le nitrate, le nitrite, NO et N<sub>2</sub>O servent d'accepteur terminal d'électrons au lieu d'oxygène (O<sub>2</sub>), pour la production d'énergie lorsque l'appauvrissement d'oxygène se produit, conduisant à la production d'azote gazeux (N<sub>2</sub>) (Knowles, 1982 ; Zumft, 1997). La plupart des bactéries dénitrifiantes sont des organismes hétérotrophes aérobies qui transfèrent des équivalents redox de l'oxydation d'une source de carbone à un oxyde d'azote dans des conditions anoxiques (Zumft, 1997).

La réaction est effectuée par une diversité de bactéries appartenant taxonomiquement à différentes sous-classes de bactéries, et à plusieurs groupes physiologiques (organotrophes, lithotrophes et phototrophes). Les microorganismes capables de la dénitrification appartiennent aux genres: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Hyphomicrobium*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Propionobacterium*, *Rhizobium*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Thiobacillus* et *Alcaligenes*. Certaines espèces bactériennes capables de respirer en conditions oxiques avec le nitrate ont également été observées et ont été isolées des sols et des sédiments (Bitton, 2005; Zumft, 1997).

### 2.4. Enzymes impliquées dans la dénitrification

Quatre réactions séquentielles sont essentielles pour la réduction du nitrate en azote gazeux. Chacune de ces réactions est catalysée par différentes enzymes, à savoir la nitrate réductase (de type Nar et Nap), la nitrite réductase (de type NirK et NirS), l'oxyde nitrique réductase (Nor) et l'oxyde nitreux réductase (Stres et al., 2007; Philippot, 2002) (Fig. 2.2). Ces enzymes multimériques comprennent des petites et des grandes sous-unités catalytiques, des protéines d'assemblages et de localisation. Elles sont codées par des opérons polycistroniques et peuvent impliquer une cinquantaine de gènes (Zumft, 1997). Le fait que les étapes de réduction pendant la dénitrification soient successives implique que le produit d'une enzyme est un substrat pour la suivante. Une bonne régulation de la concentration et de l'activité des enzymes de dénitrification est donc nécessaire afin de maintenir les concentrations libres de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> et de NO en dessous de la cytotoxicité (van Spanning et al., 2007).

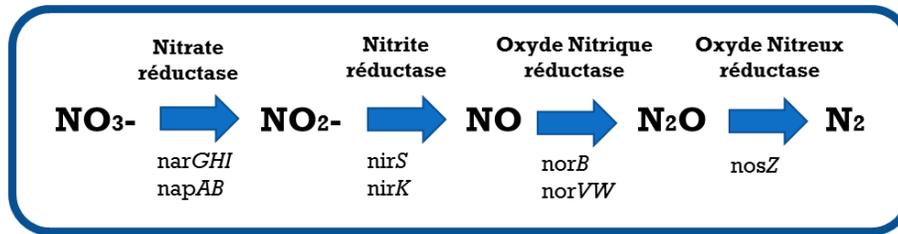


Figure 2.2 Les étapes de la dénitrification avec les enzymes impliquées dans la dénitrification. Modifié de Moir, 2011.

### 2.4.1. Nitrate réductase

La nitrate réductase catalyse la transformation du nitrate en nitrite. Il existe deux types de cette réductase dissimilatrice: une version membranaire, codée par les gènes *nar* et une version périplasmique, codée par les gènes *nap* (Fig. 2.3) (Zumft, 1997; Bonnefoy et al., 1994). Elles sont toutes deux liées à un cofacteur contenant du molybdène sous la forme de Mo-*bis*-molybdoptérine guanine dinucléotide (cofacteur MGD) et à au moins un centre fer-soufre 4Fe-4S dans son site actif interagissant avec la molécule de nitrate (Moreno-Vivián et al., 1999; Richardson et al., 2001).

#### - Nitrate réductase périplasmique :

La nitrate réductase de type Nap est une enzyme dissimilatrice liée à la membrane cytoplasmique et tournée vers le périplasma. Dans la réduction dissimilatrice du nitrate, les produits ultimes de la transformation de l'azote, ne sont pas incorporés dans la biomasse; au lieu de cela, ils sont excrétés de la cellule. Dans certains cas, ce type de réduction produit de l'énergie pour la respiration anaérobie selon l'organisme.; qui est connu avec le terme « respiration du nitrate » est utilisé pour spécifier la réduction du nitrate couplée à la génération d'ATP. Comme conséquence de sa localisation, le système Nap n'est pas capable de générer une force protomotrice (PMF) à travers la membrane interne. Cependant, le système Nap est probablement lié à la génération d'un PMF lorsqu'elle est couplée à l'oxydation du formate dans le moment où les électrons de NADH passant à travers la translocation de protons NADH déshydrogénase génèrent un gradient de protons à travers la membrane cellulaire (Moreno-Vivian et al., 1999; Sparacino-Watkins et al., 2014).

L'enzyme est un hétérodimère constitué par une sous-unité (NapA) avec cofacteur molibdoptérine et un centre N-terminal [4Fe-4S] et une sous-unité (NapB) avec cytochrome de type c bihème, qui reçoit des électrons de NapC, un tétrahème lié à un cytochrome c ancré à la membrane. Cette dernière transmet les électrons en

provenance d'un pool de quinol à la sous-unité NapA. Les gènes *napA* et *napB* font partie d'un opéron contenant également les gènes *napC* et *napD*. NapD, qui est conservée dans tous les opérons *nap*, a un rôle de chaperonne et participe à l'assemblage des différentes sous-unités. Dépendant de l'espèce bactérienne, il est possible de trouver cinq gènes *nap* de plus (*napKEFGH*) (Van Spanning et al., 2005; Potter et al., 1999; Moreno-Vivian et al., 1999; Philippot, 2002).

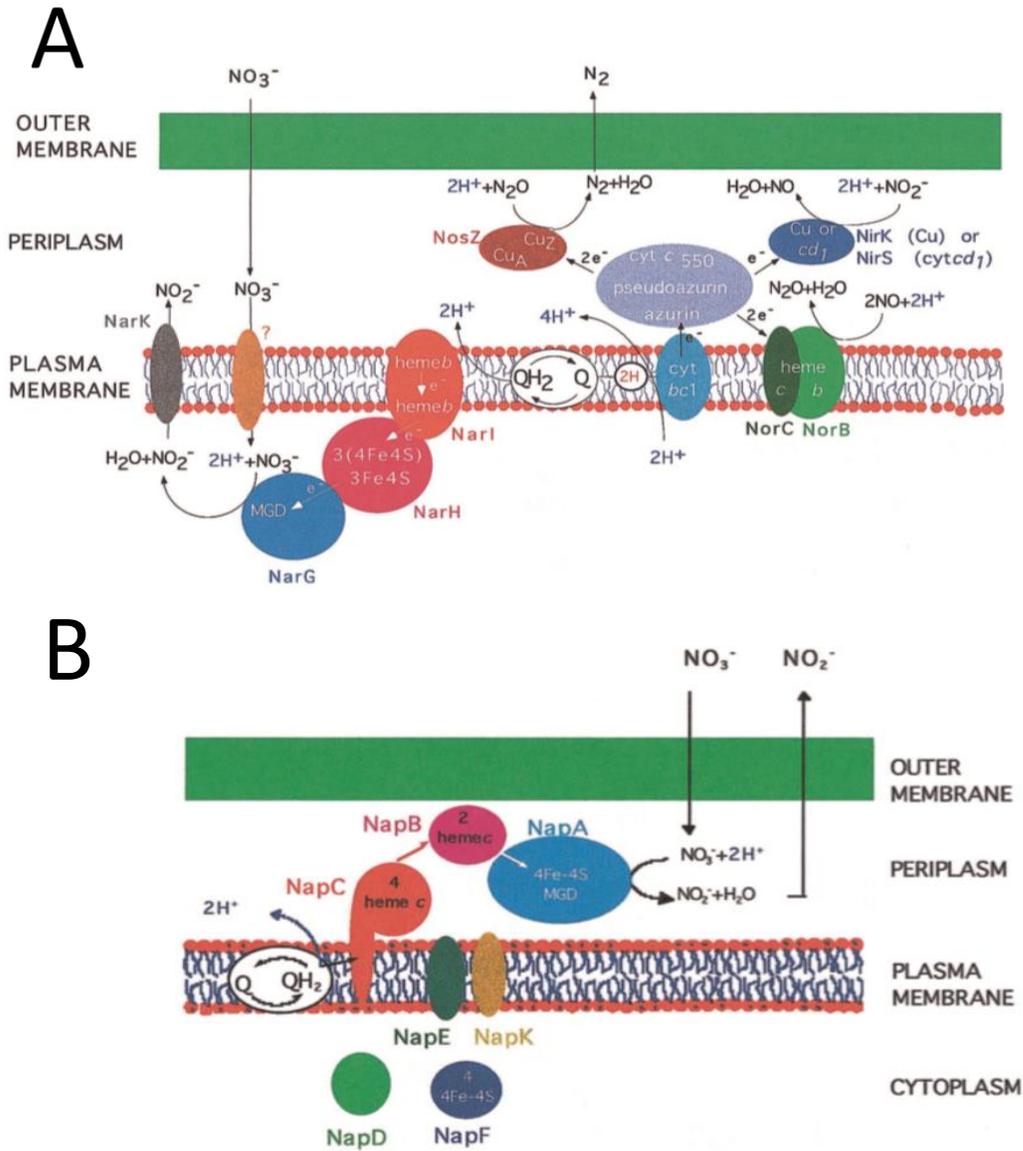
D'autres rôles proposés pour Nap sont l'adaptation au métabolisme anaérobie après la transition des conditions oxiques, avec l'utilisation de réducteurs. Puisque l'ammonium et l'oxygène n'ont pas d'effet sur le système Nap, les bactéries peuvent croître dans des conditions oxiques et anoxiques sans être affecté par l'équilibre intracellulaire C et N (Moreno-Vivian et al., 1999).

- **Nitrate réductase membranaire:**

La nitrate réductase de type Nar est ancrée à la membrane cytoplasmique avec le site actif orienté vers le cytoplasme, elle est associée à la dénitrification et à la respiration anaérobie du nitrate. Elle est composée de trois sous-unités: la sous-unité  $\alpha$  (NarG) liée à un cofacteur MGD et contient un centre 4Fe-4S, la sous-unité  $\beta$  (NarH) possédant un centre 3Fe-4S et trois centres 4Fe-4S et la sous-unité transmembranaire  $\gamma$  (NarI) composée d'un bihème b oxydant l'ubiquinol (Richardson et al., 2007; Moreno-Vivián et al., 1999). La sous-unité NarI reçoit les électrons par l'oxydation de l'ubiquinol et ceux-ci sont ensuite transférés à la sous-unité NarH via les centres Fer-Soufre, puis à la sous-unité NarG, permettant le transfert final des électrons où la réduction du nitrate en nitrite a lieu via le cofacteur MGD, (Moreno-Vivián et al., 1999). La nitrate réductase Nar est codée par l'opéron *narGHJ*, lequel est conservé dans la quasi-totalité des espèces possédant cette enzyme. NarJ est une protéine chaperonne qui est nécessaire au bon assemblage et à la maturation de Nar (Bonnefoy et al., 1994).

Dû que le site actif de NarG, est dans le cytoplasme et les réductases pour les étapes de réduction ultérieures, y compris cd1 nitrite réductase, se trouvent dans le périplasme, le nitrate doit être transporté dans les cellules et le nitrite excrété au périplasme par une extrusion de nitrite spécifique du système. De nombreuses espèces bactériennes contiennent des transporteurs de type NarK qui fonctionnent comme des symporteurs de nitrate / proton ou comme des antiporteurs de nitrate / nitrite, qui assure la médiation électrogénique de l'excrétion de nitrite plutôt que l'absorption de nitrate. Des bactéries telles comme *Paracoccus denitrificans* sont capables de supporter la croissance dénitrifiante anaérobie grâce à l'expression de deux transporteurs de type NarK (NarK1

et NarK2). Le transporteur NarK1 semble être un symporteur nitrate / proton avec une forte affinité pour le nitrate, mais est inhibé par l'oxygène et NarK2 un antiporteur nitrate / nitrite avec une affinité plus faible pour le nitrate (Harborne et al., 1992; Moir et Wood, 2001; Goddard et al., 2008).



**Figure 2.3 Représentation des différentes sous-unités de réductases dans les bactéries.** L'organisation des chaînes de transport d'électrons anoxiques pour la respiration et la dénitrification du nitrate : (A) la nitrate réductase membranaire (*nar*), (B) la nitrate réductase périplasmique (*napA*) et les réductases de *nir*, *nos*, *nor* sont également montrées. Tirée de Moreno-Vivian (1999).

### 2.4.2. Nitrite réductase :

La nitrite réductase permet la réduction du nitrite en oxyde nitrique. Elle constitue l'enzyme clé de la dénitrification en catalysant la première étape menant à un intermédiaire gazeux, distinguant les bactéries dénitrifiantes de celles qui ont seulement la capacité de réduire le nitrate en nitrite. Il en existe deux types, selon leur cofacteur : la première (NirS) possède un cytochrome *cd1* de type hétéro réductase, tandis que l'autre (NirK) est une cuivre-oxydoréductase. Elles sont localisées dans le périplasme. Ces deux variétés d'enzymes n'ont jamais été retrouvées ensemble dans la même espèce et aucune étude n'a pas pu révéler une différence fonctionnelle entre elles (Jones et al., 2010; Zumft, 1997).

La synthèse de cette enzyme est fortement régulée en amont par la régulation de gènes codant pour la synthèse de ses différents constituants (*hemA*, *hemN*, *nirSMCFDLGHEN*) avec des combinaisons variantes selon l'espèce. Cependant, de manière générale, les régulateurs intervenant dans la régulation du cytochrome *cd1* et de CuNIR sont ANR/FNR et NarL.

### 2.4.3. Oxyde nitrique réductase :

L'oxyde nitrique réductase catalyse la réduction de l'oxyde nitrique en oxyde nitreux. Cette enzyme fait partie de la superfamille d'hème - cuivre oxydases, lesquelles se rangent dans les enzymes du complexe intégral de membrane. Les oxyde nitrique réductases ne génèrent pas de gradient de protons au travers de la membrane car elles utilisent exclusivement les protons présents dans le périplasme pour la réaction de réduction du NO (Fig.2.4) (Hendriks et al., 2002). La version de l'enzyme qui est présente dans les bactéries dénitrifiantes Gram négatives est cNor. Il existe également d'autre oxyde nitrique réductase différente appelée qNor, laquelle utilise des protéines quinones comme donneurs d'électrons et peut être retrouvée dans certains microorganismes dénitrifiants, où elle joue un rôle de détoxification. Une autre enzyme qCu<sub>A</sub>Nor, trouvée dans des bactéries du sol ou les archéobactéries, peut être utilisée pour des fonctions bioénergétiques ou de détoxification, dépendant de quelle est sa source d'électrons (Suharti et al., 2007; Hendriks et al., 2002).

L'enzyme de type cNor est la plus étudiée; elle est transmembranaire et son site catalytique est orienté vers le périplasme. Elle est codée par les gènes *nor* (unité

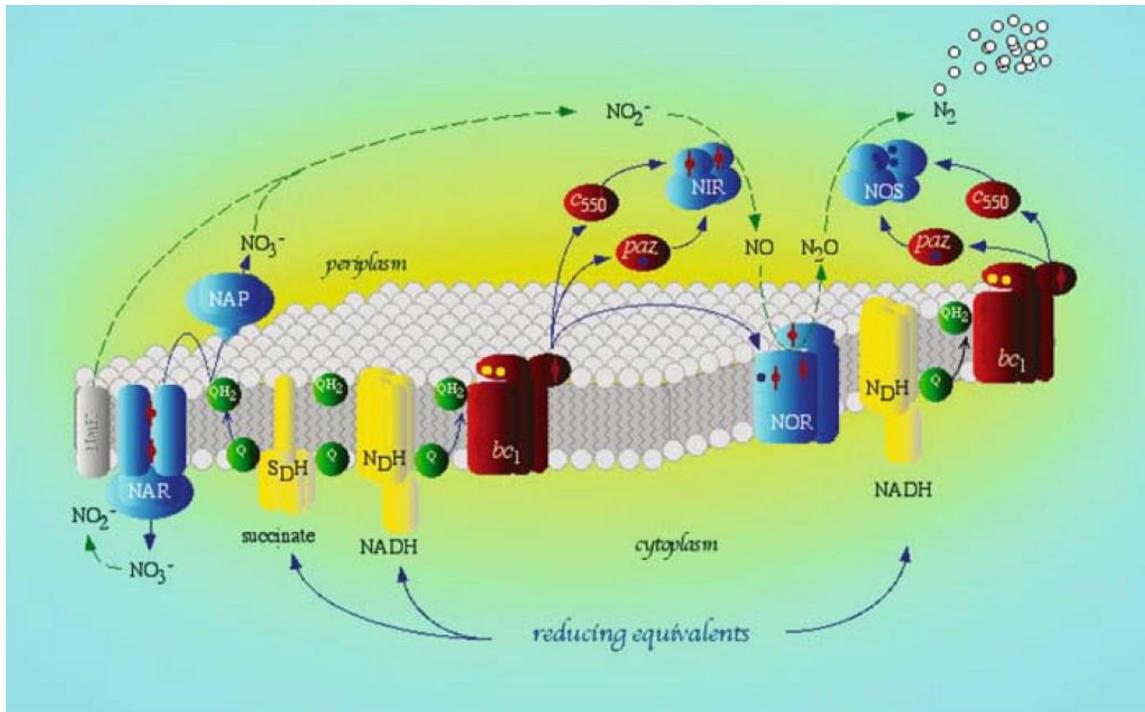
catalytique codée par *norB* et *norC*). La sous-unité NorC est un cytochrome de type c, contenant un groupe hème c. Son rôle est d'accepter les électrons provenant des donneurs d'électrons périplasmiques qui sont ensuite transférés au site actif de la sous-unité NorB contenant un double centre Fer, où l'oxyde nitrique est réduit en oxyde nitreux (Zumft, 1997; Suharti et al., 2007). L'enzyme qNor, codée par le gène *qnorB* (aussi nommé *norZ*), ne contient pas de cytochrome de type c et montre une homologie de séquence avec la sous-unité NorB de l'enzyme cNorB. Elle reçoit ses électrons directement du pool de quinols (Philippot, 2002). La troisième enzyme qCu<sub>A</sub>Nor est composée de deux sous-unités, l'une contenant deux hèmes b ainsi qu'un atome de fer non hémique et une autre contenant un centre Cu<sub>A</sub> constitué de deux atomes de cuivre. Elle reçoit ses électrons du cytochrome c<sub>551</sub> ou ménaquinone. La majeure différence provient du donneur d'électrons qui diffère entre les classes : cNor (cytochrome c), qNor et qCuNor (quinol) (Zumft, 2005)

La réduction de l'oxyde nitrique est régulée de la même façon, en absence d'oxygène et en présence d'oxydes d'azote. Le NO est considéré comme la molécule signal centrale de l'expression de tout l'appareil de dénitrification du nitrite, c'est-à-dire de la réduction du nitrite et du NO (Zumft, 2005).

#### **2.4.4. Oxyde nitreux réductase :**

L'oxyde nitreux réductase catalyse la réduction de l'oxyde nitreux en azote gazeux. De nombreuses bactéries dénitrifiantes se développent aux dépens de N<sub>2</sub>O comme seul accepteur d'électrons pour l'oxydation des composés organiques. La réduction du N<sub>2</sub>O est réalisée à travers le cytochrome bc<sub>1</sub> participant au transfert d'électrons et de protons à travers de la membrane cytoplasmique (Zumft, 1997).

Cette enzyme est codée par les gènes *nos* (unité catalytique codée par *nosZ*). C'est une enzyme homodimérique périplasmique dont chaque sous-unité contient un centre cuivre bi-nucléaire Cu<sub>A</sub> et un centre cuivre multi nucléaire Cu<sub>Z</sub> (Einsle et al., 2004; Zumft, 1997). Le site catalytique Cu<sub>A</sub> permet l'entrée des électrons et le transfert au site Cu<sub>Z</sub> de l'autre monomère. Le centre catalytique Cu<sub>Z</sub> est où l'oxyde nitreux est réduit en diazote, qui contient quatre atomes de cuivre liés par sept résidus d'histidine et un atome de soufre (Braker et al., 2003).



**Figure 2.4 Chaîne de transport des électrons pendant la dénitrification chez *Paracoccus denitrificans*.** Ici, le succinate sert de source de carbone et d'énergie. Les lignes en pointillés représentent le mouvement des oxydes d'azote. Les lignes pleines représentent le mouvement des électrons. SDH, succinate dehydrogenase; NDH, NADH dehydrogenase; Q, quinone; bc1, cytochrome bc1 complex; c550, cytochrome c; paz, pseudoazurin; NAR, membrane-bound nitrate reductase; NAP, periplasmic nitrate reductase; NIR, cd1-type nitrite reductase; NOR, bc-type NO reductase; NOS, nitrous oxide reductase. Tiré de (Van Spanning et al., 2005; Baker et al., 1998).

## 2.5. Régulation de la dénitrification

Plus de cinquante de gènes ont été impliqués dans la dénitrification dont des gènes codant pour les enzymes, ainsi comme pour des protéines impliquées dans la régulation, la maturation, la synthèse de cofacteurs et le transfert d'électrons. La transcription des gènes codant pour les réductases individuelles est contrôlée par un réseau de régulateurs transcriptionnels et de facteurs auxiliaires qui répondent aux signaux intra et extracellulaires, dans lesquels se trouvent l'oxygène et les N-oxydes (NO et NO<sub>2</sub>-) (Zumft, 1997).

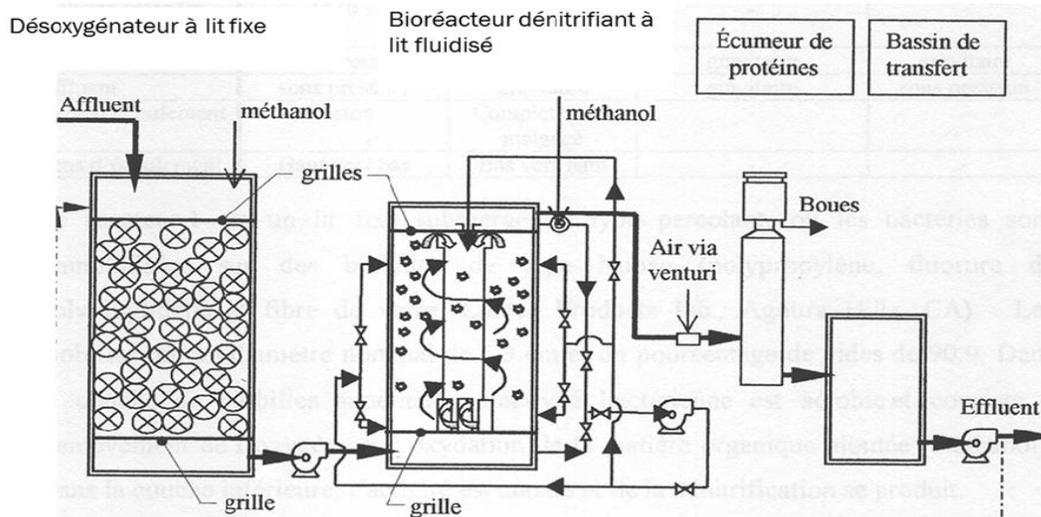
Il existe deux types de régulateurs sensibles à l'oxygène : les systèmes FixL et FNR, tous deux sont des régulateurs de la transcription. Le plus répandu, le système FNR (Fumarate and Nitrate reductase regulation), est un activateur transcriptionnel de l'opéron *narGHJI* qui code pour la nitrate réductase membranaire. Ce système est actif en absence d'oxygène : il se lie à l'ADN en amont du site de fixation de l'ARN polymérase afin de

promouvoir la transcription des gènes cibles. L'expression de ces gènes est sous le contrôle des régulateurs transcriptionnels appartenant à la grande famille CRP (cAMP receptor protéine) / FNR (van Spanning et al., 2007; 1999; Philippot, 2002).

## **2.6. Le système de dénitrification du Biodôme de Montréal**

Les écosystèmes d'eau salée sont caractérisés par sa salinité (3.5% en sels) et pour être très stables par rapport aux habitats terrestres et d'eau douce. La composition ionique de l'eau de mer est similaire aux fluides corporels de la plupart des organismes marins, lesquels résolvent la régulation osmotique. Cependant, un des plus grands problèmes est lié aux nutriments en déséquilibre qui deviennent un sérieux problème, comme ceux qui dérivent de l'accumulation de nitrate, menaçant la santé de la faune marine.

Le Biodôme de Montréal a reconstitué, dans un bassin contenant 3 millions de litres d'eau de mer, l'écosystème du Saint-Laurent marin (SLM). Ce bassin à circuit fermé a présenté une augmentation excessive de la concentration de nitrate, par atteindre une concentration maximale de 180 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L, provenant de la nitrification des excréments des animaux (Parent et Morin, 2000). Le niveau recommandé de nitrate dans un écosystème d'eau de mer artificielle est de 50 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L, ce qui est faible par rapport à son taux de génération dans un système fermé (Spotte, 1991). Les changements d'eau (eau de mer fabriquée artificiellement) sont coûteux et stressants pour l'écosystème du bassin. Pour cette raison, le Biodôme a ajouté à son système de traitement des eaux en 1998 un système de dénitrification à lit mobile MBBR (moving bed biofilm reactor), utilisant des supports à lit flottant avec le but de réduire le nitrate à des niveaux inférieurs à 20 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L (Parent et Morin, 2000; Dupla et al., 2006). Ce système comprenait un bassin de désoxygénation de 1 m<sup>3</sup>, suivi d'un réacteur de dénitrification de 1 m<sup>3</sup>. Le bassin de désoxygénation était un réacteur à lit fixe alimenté au méthanol où des microorganismes consommaient l'oxygène. L'eau appauvrie en oxygène était ensuite envoyée au réacteur de type à lit fluidisé lui aussi alimenté au méthanol. Les supports fluidisés de type Bioflow 9® dans le réacteur de dénitrification ont été colonisés par des bactéries multi-espèces d'origine naturelle pour produire un film biologique (biofilm) dénitrifiant (Fig. 2.5).



**Figure 2.5** Représentation du système du Biodôme de Montréal. Tirée de Sauvé, 2000.

Le laboratoire du Professeur Richard Villemur a étudié la microbiologie du biofilm dénitrifiant afin de fournir des connaissances sur les performances d'un processus de dénitrification en milieu marin. Les travaux réalisés ont montré que la disponibilité limitée de métaux dans l'eau de mer artificielle pourrait altérer l'efficacité des enzymes impliquées dans la dénitrification, surtout au niveau du transfert d'électrons (Labbé et al., 2003a). Les modifications apportées au processus ont permis d'améliorer la dénitrification ; deux fois par jour les métaux : Fe, Zn, Mo, Cu et Mn ont été ajoutés au système de dénitrification pour élever le taux de dénitrification du biofilm. Le taux de dénitrification a augmenté jusqu'à 250%, avec l'ajout de Fe, et lorsque ce dernier élément était combiné avec du Mn, l'effet était optimal (Labbé et al., 2003a).

La diversité bactérienne du biofilm dénitrifiant a été étudiée en utilisant des méthodes de culture d'isolement et de biologie moléculaire. Les analyses des séquences des gènes de l'ARN ribosomal 16S (ARNr) ont démontré que les types d'isolats étaient liés aux alpha-protéobactéries et membres du genre *Hyphomicrobium* (isolat NL23) et *Paracoccus denitrificans* (isolat NL8), ainsi que la famille des *Phyllobacteriaceae* (isolat NL21) (Labbé et al., 2003b). En générant une génothèque des gènes de l'ARNr du biofilm, on a pu constater que celui-ci était composé d'environ 15 espèces bactériennes. Curieusement à l'époque, plus de 70% des clones étaient apparentés au genre *Methylophaga* dont les espèces de ce genre n'étaient pas reconnues à l'époque pour croître en présence de nitrate en conditions anoxiques. Des expériences d'hybridation *in*

*situ* sur le biofilm ont montré que des bactéries associées aux genres *Methylophaga* et *Hyphomicrobium* pouvaient représenter entre 60 à 80 % de la communauté bactérienne du biofilm (Labbé et al., 2003b; Labbé et al., 2007).

Pour confirmer quelles étaient les méthylothropes dénitrifiantes présentes dans le biofilm, des expériences de DNA-SIP (stable isotope probing) avec du méthanol-<sup>13</sup>C ont permis de déterminer que le genre de *Méthylophaga* présente dans le biofilm était impliqué dans la dénitrification. Avec l'isolement de la souche *Hyphomicrobium* sp. NL23, nommée ultérieurement *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, une nouvelle souche méthylotrrophe affiliée au genre *Methylophaga*, la souche JAM1, a été isolée. Cette souche nommée *Methylophaga nitratreducenticrescens* JAM1 peut réduire le nitrate en nitrite, mais pas le nitrite en NO (Auclair et al., 2010).

## **2.7. Les Méthylothropes**

Les bactéries méthylothropes utilisent des substrats de carbone qui ne contiennent pas de liaisons carbone-carbone tels que le méthane, le méthanol, les amines méthylées et composés de soufre méthylé, comme seules sources de carbone et d'énergie oxydable. La méthylothropie implique l'oxydation de composés C1 réduits en CO<sub>2</sub> en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons terminal. Certaines hétérotrophes connues comme les méthylothropes dénitrifiants (avec une méthylothropie facultative) comprennent quelques espèces du genre *Paracoccus denitrificans* et *Hyphomicrobium*, mais la plupart des méthylothropes sont des aérobies stricts (Chistoserdova et al., 2009; Rissanen A, 2017; Neef A. et al., 1996; Trotsenko et al., 2008). Les connaissances acquises en étudiant ces organismes modèles ont été utilisées pour classer les méthylothropes en groupes fonctionnels et phylogénétiques, tels que les méthylothropes facultatives et obligatoires, les méthylothropes de type I et de type II, et les méthylothropes autotrophes et hétérotrophes. Les bactéries méthylothropes obligatoires regroupent presque exclusivement les bactéries méthanotrophes qui utilisent le méthane comme seule source de carbone et d'énergie (Anthony, 1982). Les méthylothropes facultatives restreintes se distinguent des méthylothropes facultatives à cause de leur capacité de croître avec des composés multicarbonés. L'utilisation facultative des composés C1 est rencontrée spécialement chez les bactéries capables de pousser en utilisant le méthanol (Doronina et al., 2003 ; Kim et al., 2007; Chistoserdova et al., 2009).

Il existe trois objectifs métaboliques spécifiques dans la méthylootropie : (I) l'oxydation du substrat primaire, entraînant la production de formaldéhyde ou d'un radical méthyl ou méthylène, (II) l'oxydation du formaldéhyde en  $\text{CO}_2$ , (III) l'assimilation d'un composé C1 qui peut se situer au niveau du formaldéhyde [cycle du ribulose monophosphate (RuMP)], du  $\text{CO}_2$  [le cycle de Calvin – Benson – Bassham (CBB)] ou d'une combinaison de  $\text{CO}_2$  et de méthylène- $\text{H}_4\text{F}$  [le cycle de la sérine] (Chistoserdova, 2011).

Les méthylothropes jouent un rôle clé dans les systèmes de dénitrification alimentés au méthanol, à la fois en utilisant directement le méthanol comme donneur d'électrons dans la dénitrification ainsi qu'en transformant le méthanol en divers composés extracellulaires organiques, qui sont utilisés par les bactéries dénitrifiantes non méthylothropes co-présentes (Rissanen A, 2017).

## **2.8. Le genre *Hyphomicrobium***

Le genre *Hyphomicrobium* fait partie des alpha-protéobactéries. La particularité des espèces membres est leur production d'hyphes lors de la reproduction. Ces bactéries qui sont capables d'une croissance aérobie et d'une accumulation de poly  $\beta$ -hydroxybutyrate comme matériau de stockage. Elles possèdent une mobilité et sa motilité est normalement produite par un seul flagelle sous-polaire de type prosthecae (Moore, 1981).

Étant donné leur faible tolérance aux environnements salés, elles sont rarement retrouvées dans des milieux marins (Fesefeldt et al., 1998). Les membres de ce genre sont méthylothropes facultatives et sont omniprésentes dans l'eau et dans les sols, mais peuvent également être trouvées dans les stations de traitement des eaux usées (Gliesche et al., 2005; Labbé et al., 2003b). Les *Hyphomicrobium* sont des bactéries à croissance lente. Dans les habitats naturels, elle est connue pour s'accumuler entre les zones aérobies et anoxiques où le méthane est produit. Même si elles sont des organismes aérobies, elles sont capables de tolérer de très faibles tensions d'oxygène. Dans le traitement des eaux usées, les *Hyphomicrobium* sont connues pour s'établir avec succès dans des conditions sans oxygène avec une source de carbone C1 et une charge élevée en nitrate (Attwood et al., 1972; Lemmer H, 1997). Elle assimile les sources de C1 par la voie de la sérine avec du méthanol et de la méthylamine à une concentration de l'ordre de 0,1 à 0,2% (p/v). Elle est capable de tolérer même des carences nutritives

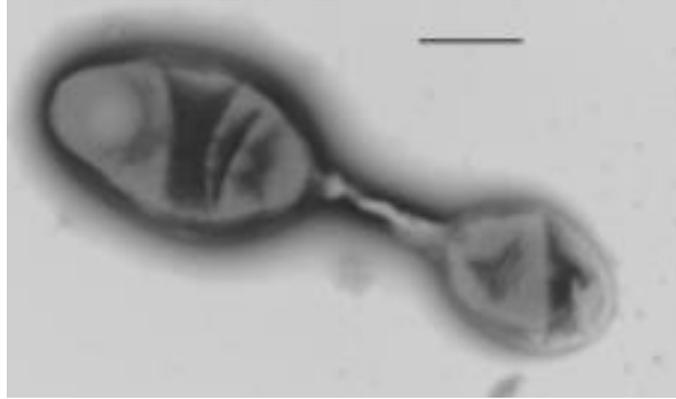
de longue durée. Elles sont donc considérées comme des organismes "oligotrophes". Souvent, aucune croissance ne se produit à des concentrations de matière organique supérieures à 0,5% (Lemmer H, 1997; Timmermans et al., 1983).

Le genre *Hyphomicrobium* est largement distribué dans la nature et semblent détenir une position d'influence importante au sein de leurs habitats respectifs. En utilisant le méthanol produit à la suite de l'oxydation du méthane, *Hyphomicrobium* empêche l'accumulation de méthanol à des niveaux qui inhiberaient la croissance des bactéries oxydant le méthane. Le métabolisme des composés à un carbone est accompli par moyen de la voie de la sérine. Certains isolats sont également capables d'utiliser les composés à deux carbones, l'éthanol, l'acétate, et le 3-hydroxybutyrate (Moore, 1981).

Il a été démontré que *Hyphomicrobium* croît de façon optimale à des températures de l'ordre de 20 à 30 °C, avec une croissance minimale jusqu'à 5 °C. Par conséquent, l'efficacité de la dénitrification d'un système dominé par cette bactérie est tout à fait indépendante des chutes de température. Le pH optimal de croissance est neutre à légèrement alcalin. À des valeurs de pH faibles, les *Hyphomicrobium* favorisent l'accumulation d'intermédiaires indésirables tels que l'oxyde nitreux (Lemmer H, 1997). Certains membres de ce genre peuvent faire une dénitrification complète comme *H. zavarzinii* et *H. denitrificans* (Gliesche et al., 2005).

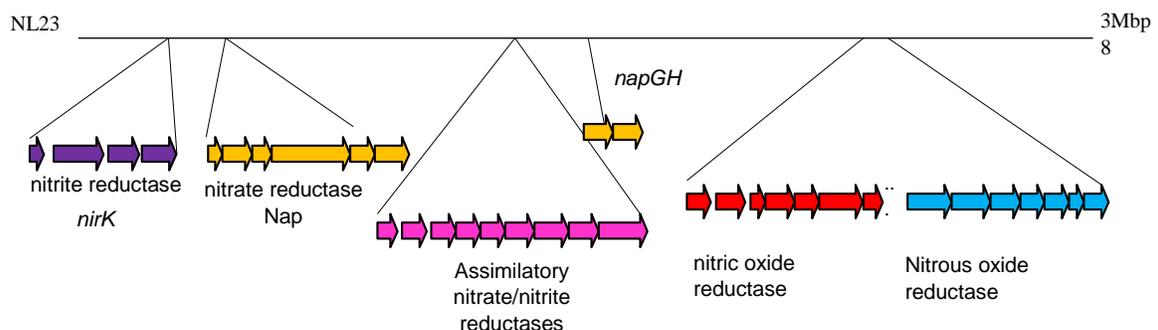
### **2.8.1. *Hyphomicrobium nitratorans* NL23**

Dans le biofilm dénitrifiant du bioréacteur du Biodôme de Montréal, une des bactéries des plus abondantes a été associée aux *Hyphomicrobium* spp. (Labbé et al., 2007). Une souche représentative de ce groupe a été isolée et désignée comme nouvelle espèce : *Hyphomicrobium nitratorans* NL23. Elle a la capacité de croître en conditions oxiques, mais elle a également l'aptitude de croître dans des conditions dénitrifiantes (conditions anoxiques) en présence de nitrate sans accumulation de nitrite (Martineau et al., 2013; Martineau et al., 2014). Les cellules de la souche NL23 sont des bâtonnets avec des extrémités pointues (ovales), 0,5-0,86 x 1,5-2,0 µm, avec une formation de bourgeons à la pointe d'une prosthecae (Fig. 2.6).



**Figure 2.6** Microscopie électronique d'une cellule mère de la souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. Bar, 500 nm. Tirée de Martineau 2013.

La souche NL23 se développe dans un milieu contenant entre 0 et 1% de NaCl avec une croissance optimale à 0.5% de NaCl. Curieusement, elle ne peut pas croître dans un milieu marin apparenté à l'eau de mer (près de 2,75% NaCl). La souche NL23 est anaérobie facultative et est capable de croître en utilisant le nitrate comme accepteur d'électrons pour générer de l'azote gazeux. La souche NL23 peut utiliser du méthanol, de la méthylamine ou du formate comme source de carbone. La séquence du génome a permis d'identifier les quatre opérons codants : la nitrate réductase périplasmique de type Nap, la nitrite réductase de type NirK, l'oxyde nitrique réductase (Nor) et l'oxyde nitreux réductase impliqués dans la dénitrification (Stres et al., 2007) (Fig. 2.7) (Martineau et al., 2013 ; Auclair et al., 2012).



**Figure 2.7** Organisation des opérons de dénitrification et leur position dans le génome de la souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23.

## 2.9. Le genre *Methylophaga*

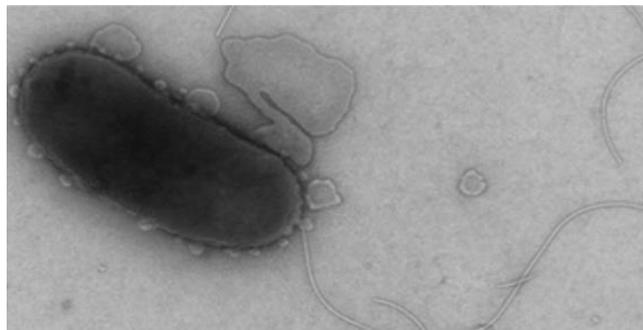
Les *Methylophaga* spp. sont des bactéries méthylophages de la famille des Gamma protéobactéries qui sont typiquement isolées des milieux marins ou des eaux saumâtres. Elles ont une exigence stricte de Na<sup>+</sup> pour la croissance (halophiles) et elles utilisent des composés à un carbone tel que le méthanol ou la méthylamine (mais pas le méthane). Elles ont été définies à l'origine comme étant strictement aérobies (Janvier et al., 1985 ; Doronina et al., 2003; Boden, 2012; de Zwart et al., 1996). Plusieurs espèces du genre ont été aussi reportées être capables de la production d'osmoprotectant, notamment l'ectoïne (Doronina et al., 2005).

Les bactéries du genre *Methylophaga* sont des bâtonnets motiles par un flagelle polaire. Elles sont des méthylophages qui utilisent le méthanol par la voie du ribulose monophosphate (RuMP), et une variante de la voie d'Entner-Doudoroff, pour l'assimilation du formaldéhyde. Certaines espèces sont auxotrophes pour la vitamine B<sub>12</sub> (Janvier et al., 1985). Elles respirent nécessairement de l'oxygène moléculaire et elles peuvent réduire le nitrate comme accepteurs d'électrons, mais elles ne peuvent pas l'utiliser en conditions anoxiques. Elles ne peuvent croître qu'en conditions strictement oxiques, jusqu'à l'identification de la souche *Methylophaga nitratireducenticrescens*, capable d'utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons et de croître dans des conditions anoxiques (Janvier et al., 1985; Boden, 2012). Certaines espèces peuvent utiliser des composés multicarbonés comme le fructose. Aucune *Methylophaga* spp. n'est capable de croissance autotrophe et certaines sont chimiolithohétérotrophes (Boden, 2012).

### 2.9.1. *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1

La deuxième bactérie la plus abondante du biofilm a été associée au genre *Methylophaga* (Labbé et al., 2007). Une nouvelle espèce a été isolée du biofilm: *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 (Fig. 2.8) (Auclair et al., 2010). La souche JAM1 est un bâtonnet (0,6 x 1,5 µm). Les cultures pures forment des floccs pendant la croissance en milieu liquide, sous conditions oxiques. Elle est tolérante au milieu salé jusqu'à 8% de NaCl, avec une croissance optimale à 3% de NaCl. Sa croissance optimale est à 30°C et à un pH de 8. Elle est auxotrophe pour la vitamine B<sub>12</sub> et requière donc sa présence pour la croissance (Auclair et al., 2010, 2011; Villeneuve et al., 2013). Contrairement aux autres *Methylophaga* sp., *M. nitratireducenticrescens* JAM1 peut

croître dans des conditions anoxiques en réduisant le nitrate en nitrite, mais ne réduit pas le nitrite en NO (Auclair et al., 2010; Villeneuve et al., 2013). Elle peut également réduire le nitrate en nitrite en conditions oxiques, ce qui n'est pas usuel, car l'oxygène est réputé être un inhibiteur de la dénitrification. Son génome a été séquencé, ce qui a révélé la présence d'opérons codant pour deux nitrates réductases de type Nar, deux oxydes nitriques réductases cNor et une oxyde nitreux réductase Nos. Cependant, la souche JAM1 se distingue des autres *Methylophaga* sp. par sa incapacité à réduire le nitrite. Elle manque un opéron codant pour une nitrite réductase, soit *nirK* ou *nirS*. Ceci explique que la souche JAM1 ne peut réduire le nitrite en NO (Mauffrey et al., 2015).



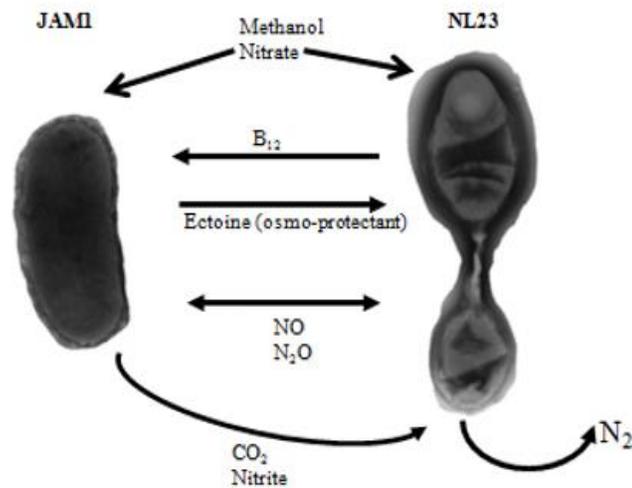
**Figure 2.8 Microscopie électronique de la souche *Methylophaga nitratreducenticrescens* JAM1**

Les deux gènes *narG1* et *narG2* sont exprimés en conditions anoxiques et en conditions oxiques avec ou sans la présence de nitrate (Auclair et al., 2010). Les analyses effectuées sur le biofilm dénitrifiant ont établi que seul les transcrits du gène *narG1* ont été détectés dans le biofilm, ce qui suggère qu'il est régulé de façon différente à *narG2* dans le biofilm (Auclair et al., 2012). Mauffrey et al. (2015) ont étudié l'importance des deux systèmes Nar en créant des mutants Knockout de *narG1* et *narG2*, et ils ont démontré que les deux systèmes contribuent à la croissance de la souche JAM1 en conditions anoxiques, chacun à des niveaux différents. Le mutant JAM1 $\Delta$ *narG1* a une diminution importante au niveau de taux de réduction du nitrate, ce qui a influencé la croissance de la souche JAM1 en conditions dénitrifiantes, tandis que le mutant JAM1 $\Delta$ *narG2* a induit un retard (20h) dans la réduction du nitrate et a provoqué une baisse dans l'expression des gènes du système Nar1. Il a été également démontré que le système Nar1 contribue plus fortement que le système Nar2 à la réduction du nitrate.

La souche *M. nitratireducenticrescens* JAM1 est capable de réduire le NO et le N<sub>2</sub>O, et aussi de croître en conditions anoxiques avec du N<sub>2</sub>O comme seule source d'énergie. La production et la consommation du N<sub>2</sub>O en conditions anoxiques sont corrélées avec des changements dans les niveaux d'expression des gènes *nor*, *nos*, ainsi que *nnrS* et *norR*, qui codent pour les régulateurs sensibles au NO, produisant des réductases actives où le NO est réduit en N<sub>2</sub>O et le N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub>. Les résultats de cette étude suggèrent que *M. nitratireducenticrescens* JAM1 peut participer à la réduction du NO et du N<sub>2</sub>O dans le biofilm (Mauffrey et al., 2016).

#### **2.10. Synergie entre *Methylophaga* sp. et *Hyphomicrobium* sp.**

Une relation synergique entre les bactéries implique une coopération qui est bénéfique pour toutes les bactéries impliquées. Dans le cas qui concerne les *Methylophaga* sp. et les *Hyphomicrobium* sp. dans le biofilm dénitrifiant, existe-t-il une coopération entre ces deux bactéries sous forme de partage de ressources (nitrate, nitrite, vitamine B<sub>12</sub>) ou d'autres facteurs comme l'osmoprotection. En plus, travaillent-elles en synergie dans le biofilm pour une activité dénitrifiante optimale. Dans les études réalisées au laboratoire du Prof. Villemur, il a été établi que les gènes impliqués dans la production d'éctoïne (un osmoprotecteur) ont été trouvés parmi les plus exprimés de la souche JAM1 en cultures pures (Mauffrey et al., 2015). Il se pourrait que la souche NL23 serait protégée contre le stress osmotique à l'intérieur du biofilm parce que celle-ci est sensible à l'eau de mer (Fig. 2.9) (Martineau et al., 2013, 2015). Ainsi, d'un côté, *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 qui produit de l'éctoïne et du CO<sub>2</sub>, rendrait ces substances accessibles à *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 tout en réduisant le nitrate en nitrite. En retour, cette dernière souche détoxifierait le milieu en réduisant le nitrite en azote gazeux et en fournissant de la vitamine B<sub>12</sub> à la souche JAM1 (Payette, 2014).



**Figure 2.9 Interactions possibles entre les souches JAM1 et NL23.** Modèle hypothétique qui explique les interactions entre *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. Tirée de Payette, 2014.

Des analyses de RT-PCR ont permis de démontrer que les quatre gènes de dénitrification portés par *H. nitrativorans* NL23 (*napA*, *nirK*, *cnorB* et *nosZ*) sont transcrits dans des cultures pures. Cependant, dans le biofilm, des transcrits du gène de la nitrate réductase *napA* n'ont pas été détectés, mais les trois autres oui. Les gènes des nitrate réductases *narG1* et *narG2* de *M. nitratireducenticrescens* JAM1 sont transcrits en cultures pures, mais seule les transcrits associés à *narG1* ont été détectés dans le biofilm. Le faible niveau de transcriptions *napA* chez la souche NL23 a suggéré que cette souche utilise directement le nitrite présent dans le biofilm généré par la souche JAM1 (Auclair et al., 2012).

Quelques études ont démontré que des bactéries méthylophages appartenant aux genres *Methylophaga* et *Hyphomicrobium* ont également été trouvées dans deux systèmes de dénitrification d'eau salée alimentés au méthanol (Osaka et al., 2008; Rissanen et al., 2016). Ces observations suggèrent fortement l'importance de la co-occurrence de ces deux genres dans l'activités dénitrifiantes des procédés de dénitrification. Ces deux genres pourraient être donc utilisés comme cibles pour surveiller ce type de systèmes (Rissanen et al., 2016).

## 2.11. Co-cultures

Les co-cultures ont été utilisées pour évaluer le degré de syntrophie présent dans une communauté. Une co-culture est un système de culture cellulaire dans lequel deux ou plusieurs populations de cellules sont cultivées avec un certain degré de contact entre celles-ci, améliorant le succès de culture pour certaines populations ou établissant des interactions synthétiques entre les populations. Les interactions entre les espèces dans les co-cultures peuvent être très complexes et se produire à des échelles différentes (Goers et al., 2014). En co-cultures, la dégradation et la métabolisation des substrats se produisent par l'activité métabolique combinée des souches microbiennes connues dans des conditions aseptiques. Les cultures mixtes se trouvent souvent dans la nature dans des conditions septiques avec des souches microbiennes non spécifiées (Bader et al., 2010). Les co-cultures peuvent différer en termes du nombre de populations co-cultivées distinctes, du degré de similitude entre les populations, du degré de séparation entre populations, de la différence entre les environnements locaux de la population, du volume des cultures et de l'échelle de temps de la co-culture (Goers et al., 2014). L'établissement, la maintenance et l'optimisation des co-cultures ainsi que les communautés complexes dépendent de la communication entre les différentes espèces. Cette communication est nécessaire non seulement pour établir des interactions mais aussi pour la stabilité et la progression de la communauté (Tan et al., 2015).

Dans un habitat, différents microorganismes peuvent rivaliser pour les substrats ainsi que d'agir en symbiose. Les microorganismes ont développé des mécanismes pour protéger leurs substrats et pour défendre leur habitat contre les concurrents. Certaines souches du genre *Lactobacillus* défendent leur habitat contre d'autres bactéries à Gram positif par la sécrétion de substances inhibitrices de croissance, telles que la nisine ou la lactine F (Dalmau et al. 2002; Tan et al., 2015). Dans d'autres cas, il peut y avoir une symbiose entre différents microorganismes causée par des synergies de leurs différents systèmes enzymatiques et voies métaboliques (Yara et al. 2006). Contrairement à une culture pure, les interactions entre les différents micro-organismes jouent un rôle critique dans une co-culture. La croissance des cellules d'une souche peut être augmentée ou inhibée par les activités d'autres microorganismes présents dans le milieu. Il en va de même pour la formation de métabolites primaires et secondaires (Keller et al., 2006). Un taux de croissance accru peut également être observé en raison de l'activité enzymatique

d'une souche dans une co-culture fournissant à une autre souche son substrat (Qian et al., 2006). L'utilisation des voies métaboliques combinées et l'activation contrôlée des gènes par les interactions qui se produisent dans les co-cultivations offrent plusieurs opportunités qui n'ont pu être observées dans des cultures pures indiquant le potentiel de production de nouvelles substances, pour l'industrie et pour les connaissances en général (Moller et al., 1998; Bader et al., 2010).

L'utilisation des co-cultures est devenue une tendance de recherche actuelle de la microbiologie appliquée. Les microorganismes constitutifs de ces cultures mixtes peuvent effectuer conjointement des processus complexes de manière efficace, donnant le produit souhaité à un taux augmenté, par rapport aux monocultures (Fig. 2.10) (Ghosh et al., 2016). L'application des cultures mixtes dans différents bioprocédés peut être plus avantageuse que les monocultures du point de vue d'une gamme plus large d'utilisation du substrat, une meilleure performance métabolique et un rendement combiné plus élevé (Brenner et al., 2008). L'intérêt a récemment émergé dans l'ingénierie des consortia microbiens - communautés constituées de plusieurs souches ou espèces bactériennes - parce que les consortia peuvent remplir des fonctions complexes que les populations individuelles ne peuvent pas accomplir et parce que les consortiums peuvent être plus résistants aux fluctuations de l'environnement. Les membres d'un consortium communiquent entre eux, pour échanger des métabolites ou des signaux moléculaires. Chaque population ou individu détecte et réagit à la présence des autres microorganismes dans le consortium et permet la division du travail; par lequel la production globale du consortium repose sur une combinaison de tâches exécutées par des individus ou des sous-populations (Brenner et al., 2008).

Par exemple, dans des co-cultures de méthanotrophes et *Hyphomicrobium* sp., une relation entre ceux deux types de bactéries est basée sur l'élimination des composés toxiques produits par un partenaire, plutôt que sur des avantages énergétiques ou métaboliques. Les bactéries méthanotrophes aérobies utilisent le méthane comme seule source d'énergie et de carbone, effectuant l'oxydation du méthane en méthanol et du méthanol en formaldéhyde comme les deux premières étapes de l'oxydation du méthane (Hanson et al., 1996). *Hyphomicrobium* oxyde le méthanol, qui est excrété lors de l'oxydation du méthane par les méthanotrophes. Cette élimination du méthanol du système empêche l'inhibition de la croissance méthanotrophique (Moore, 1981). Il a

également été suggéré que le formaldéhyde hautement toxique est éliminé du système pendant la croissance syntrophique des méthanotrophes et des méthylotrophes comme *Hyphomicrobium* sp. (Schink, 2002).

Les co-cultures ont été utilisées pour stimuler les interactions qui peuvent être classées en deux types de base, soit coopérative ou non coopérative. L'interaction coopérative ou harmonieuse inclut la symbiose, le mutualisme et le commensalisme, tandis que les interactions inharmonieuses et négatives incluent le parasitisme, l'amensalisme et la prédation (Jagmann et al., 2014). Cependant, les communautés naturelles sont souvent très complexes et peuvent contenir plusieurs membres engagés dans différentes interactions avec différents membres de la communauté à des moments différents (Tan et al., 2015).

Non seulement les interactions intracellulaires, intercellulaires et interspécifiques sont importantes pour la stabilité et la survie à long terme d'une communauté, mais des facteurs physiques tels que l'organisation spatiale déterminent également sa survie et sa fonction. Les communautés dans la nature atteignent et maintiennent souvent une structure spatiale définie. Cela peut être imité en laboratoire par croissance sur des substrats solides ou par la mise en place de biofilms qui limitent le mouvement cellulaire (Tan et al., 2015). La formation d'un biofilm permet une meilleure division du travail. En plus de l'organisation pour l'accès à l'oxygène et à divers nutriments, certaines communautés sont également auto-organisées afin de maximiser les interactions positives et minimiser les interactions négatives (Momeni et al., 2013).

L'application stratégique des résultats sur les interactions microbiennes dans la conception de consortiums microbiens stables ou de cultures mixtes (co-cultures) et leur utilisation éventuelle dans différents bioprocédés ont été proposés comme prometteur de la biotechnologie moderne (Ghosh et al., 2016).

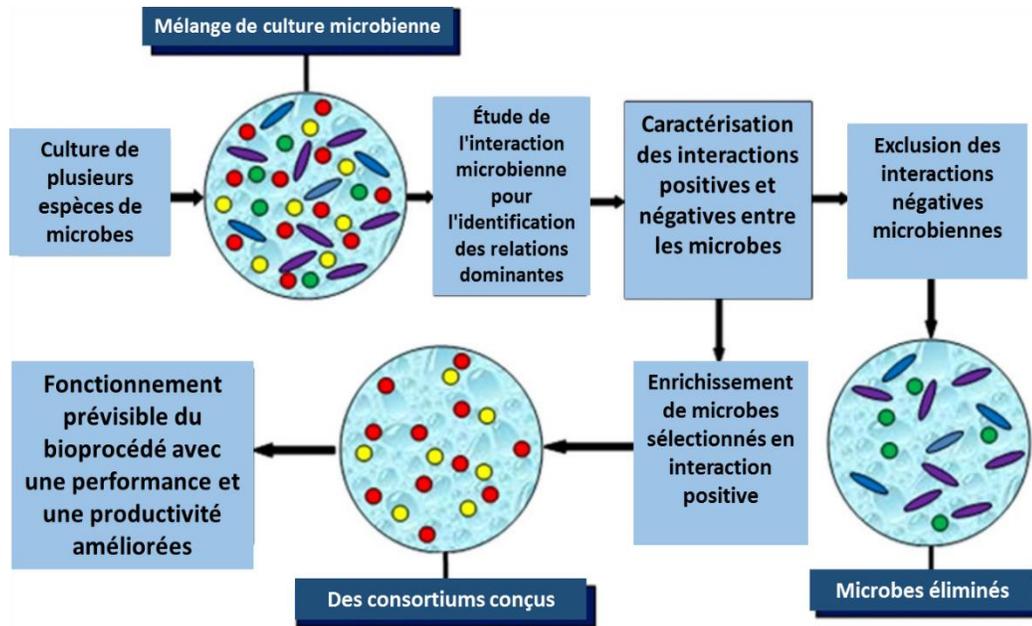


Figure 2.10 Conception d'un consortium basé sur les caractéristiques et l'interaction entre les microorganismes d'un système déterminé. Tirée de Ghosh et al., 2016.

## 2.12. Formation du biofilm

Les microorganismes peuvent vivre comme une communauté des cellules fixent sur un support (état Biofilm) ou libres et isolée dans le milieu environnemental (état planctonique) (Filloux et al., 2003). Le passage du plancton au biofilm se produit lorsque les bactéries trouvent une surface et des conditions appropriées qui leur permettent de réagir avec une série de changements physiologiques, métaboliques et phénotypiques dramatiques (Fig. 2.11) (Valentini et al., 2016). Les bactéries présentes dans les habitats naturels existent généralement dans les consortiums de biofilms. En fait, il a été estimé que la majorité des bactéries dans les écosystèmes aquatiques naturels sont organisées en biofilms (Donlan et al., 2002). Cette structure confère aux bactéries présentes dans le biofilm plusieurs avantages par rapport à celles qui vivent comme des cellules planctoniques. C'est particulièrement plus avantageux dans les environnements où les bactéries sont exposées à des mouvements liquides constants, comme par exemple milieux aquatiques. De plus, les cellules bactériennes présentes dans un biofilm ont une résistance accrue à des conditions défavorables (Jefferson, 2004; Donlan et al 2002; Burmolle et al., 2006).

Les biofilms sont définis comme des communautés bactériennes au sein desquelles on peut trouver de nombreuses espèces différentes, enfermées dans une matrice, adhérentes à une autre bactérie et aux surfaces ou interfaces. Cette définition inclut les agrégats microbiens, les flocules et aussi les populations adhérentes dans les espaces poreux de milieux poreux (Consterton et al., 1995). Fonctionnellement, les biofilms sont des écosystèmes comprimés latéralement qui soutiennent la plupart des principaux cycles biogéochimiques dans une dimension verticale de quelques millimètres seulement (Paerl et al., 1996).

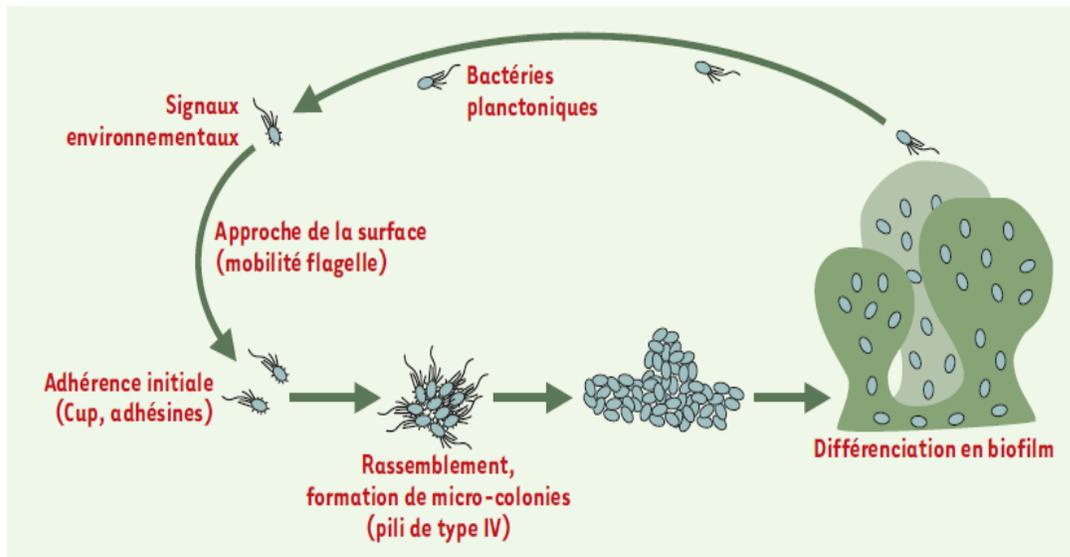
Un biofilm est composé d'espèces hétérogènes, de bactéries chimiolithotrophes, et chimio-organotrophes, des protozoaires, des virus, des levures et des algues. Les sous-produits métaboliques d'un organisme peuvent servir à soutenir la croissance d'un autre, tandis que l'adhésion d'une espèce peut fournir des ligands permettant la fixation d'une autre espèce. Les microorganismes sont contenus dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) avec une architecture définie. Elle est responsable de l'interaction avec les interfaces et fournit un environnement optimal pour l'échange de matériel génétique entre les cellules. Les EPS peuvent comprendre des exopolysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, de lipides, de résidus cellulaires et parfois même de résidus abiotiques relatifs à l'environnement (Paerl et al., 1996; Lens et al., 2003; Neu et al., 1999; Donlan, 2002; Dunne, 2002).

L'attachement bactérien à une surface peut être divisé en quatre étapes principales, y compris : (1) l'attachement bactérien à une surface, (2) la formation de microcolonies, (3) la maturation du biofilm et (4) le détachement (également appelé dispersion) des bactéries qui peuvent ensuite coloniser de nouvelles zones (Landini et al., 2010). L'étape initiale d'attachement fait intervenir des appendices générateurs de mouvement qui permettent d'approcher la surface à coloniser (O' Toole et al., 1998). Cette approche conduit à un attachement transitoire pendant lequel la bactérie va chercher à « évaluer » la surface sur laquelle elle se trouve. L'interface solide-liquide entre une surface et une solution aqueuse, offre un environnement idéal pour l'attachement et la croissance des microorganismes. L'attachement ne peut être obtenu sans tenir compte le substrat, la formation de films sur le substrat, l'hydrodynamique du milieu aqueux, les caractéristiques du milieu et diverses propriétés de la surface cellulaire (Donlan, 2002a). Les microorganismes s'attachent plus rapidement aux surfaces hydrophobes et non polaires. La colonisation microbienne semble augmenter à mesure que la rugosité de la

surface augmente, à cause que les forces de cisaillement sont diminuées. Une surface de matériau exposée dans un milieu aqueux sera inévitablement et presque immédiatement conditionnée ou revêtue par des polymères de ce milieu, et la modification chimique résultante affectera la vitesse et l'étendue de l'attachement microbien. Les caractéristiques physicochimiques du milieu aqueux, telles que le pH, les niveaux de nutriments, la force ionique et la température, peuvent jouer un rôle dans le taux d'attachement microbien à un substrat (Donlan, 2002a).

La deuxième étape de l'adhésion est la phase d'ancrage. Avec le temps, certaines cellules individuelles entrent dans une phase de fixation en utilisant une liaison à médiation moléculaire entre des adhésines spécifiques et la surface à coloniser. À ce stade, les organismes reposent contre la surface en produisant des exopolysaccharides (EPS) qui se complexent avec des matériaux de surface et / ou des ligands spécifiques aux récepteurs situés sur les pili, les fimbriae et les fibrilles. À la fin cette étape, l'adhésion devient irréversible en l'absence d'intervention physique ou chimique (Dunne, 2002; Armbruster et al., 2018). La signalisation de cellule à cellule joue un rôle dans l'attachement et le détachement des cellules des biofilms, contrôlant la production de composants bactériens nécessaire pour l'adhésion et la formation de biofilms (Donlan, 2002). Les rassemblements de bactéries conduisent à la formation de micro-colonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm (Consterton et al., 1995; 1999; Filloux et al., 2003; Donlan, 2002).

Une fois que les bactéries se sont irréversiblement attachées à une surface, le processus de maturation du biofilm commence. La densité et la complexité du biofilm progresse linéairement à mesure que les organismes liés à la surface commencent à se répliquer et mourir activement et que les composants extracellulaires générés par les bactéries attachées interagissent avec les molécules organiques et inorganiques dans l'environnement immédiat pour créer le glycocalyx, en développant des gros agrégats cellulaires encapsulés par une matrice (Dunne, 2002). Les cellules de biofilm peuvent être dispersées soit en éliminant les cellules filles des cellules en croissance active, soit en se détachant en raison des niveaux de nutriments, de la détection du quorum, ou par élimination continue de petites parties du biofilm en raison des effets d'écoulement (Donlan, 2002).



**Figure 2.11 Modèle de formation d'un biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*.** Les bactéries planctoniques vont s'attacher sur une surface en réponse à des stimulus environnementaux et nutritionnels. L'attachement initial sur la surface fait intervenir un certain nombre d'adhésines (type Cup) chez *P. aeruginosa*. La colonisation de la surface et le rassemblement en micro-colonies sont faits grâce à une autre structure : les pili de type IV. La structuration des micro-colonies en biofilm mature implique l'expression de certains gènes liés au *quorum sensing* et la production d'exopolysaccharide qui englobe les bactéries (Alginate) chez *P. aeruginosa*. Tirée de Filloux et al., 2003).

Les biofilms sont composés principalement de cellules microbiennes et de leurs substances polymères extracellulaires (EPS) associés à une interface. Ainsi, dans les systèmes de biofilm, il existe deux types de structures de glucides polymériques : (i) celles situées à la surface des cellules et (ii) celles situées de manière extracellulaire dans toute la matrice du biofilm. Les EPS représentent une composante structurale majeure des biofilms (50 – 90% de la matière organique) et sont responsables des processus de sorption (Neu et al, 1999). Certains de ces polysaccharides sont neutres ou polyanioniques. Les EPS sont également très hydratés car il peut incorporer de grandes quantités d'eau dans sa structure par liaison hydrogène (Sutherland, 2001). Il empêche la dessiccation dans les biofilms et il peut également contribuer aux propriétés de résistance aux antimicrobiens (Donlan, 2002). Au sein du biofilm, les microcolonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant que de petites molécules puissent entrer et sortir du biofilm. En plus, ces canaux aident à acheminer l'oxygène et les nutriments comme polysaccharides, protéines, ADN, surfactants, lipides,

glycolipides et ions tels que  $\text{Ca}^{2+}$  dans les régions enfouies du biofilm, et en même temps, ils servent à évacuer les déchets (Filloux et al., 2003; Karatan et Watnick, 2009).

La formation d'un biofilm altère à son tour le microenvironnement de ses propres habitants, ce qui entraîne ensuite des modifications supplémentaires de l'expression des gènes et une maturation plus poussée du biofilm. Il y a de nombreux facteurs considérés comme responsables de la survie et la résistance des microorganismes au biofilm. Ceux-ci incluent les mutations et les recombinaisons au sein des gènes, l'acquisition de nouveau matériel génétique, ou de l'expression régulée de la génétique existante. Seuls ou en combinaison, ces facteurs sont utiles pour expliquer la flexibilité dans l'expression des gènes bactériens permettant la survie dans des environnements où les conditions évoluent rapidement (Jefferson, 2004; Lewis, 2001). En outre, les biofilms offrent une meilleure possibilité d'interactions, telles que le transfert horizontal de gènes et le co-métabolisme à des fréquences très élevées (Filloux et al., 2003).

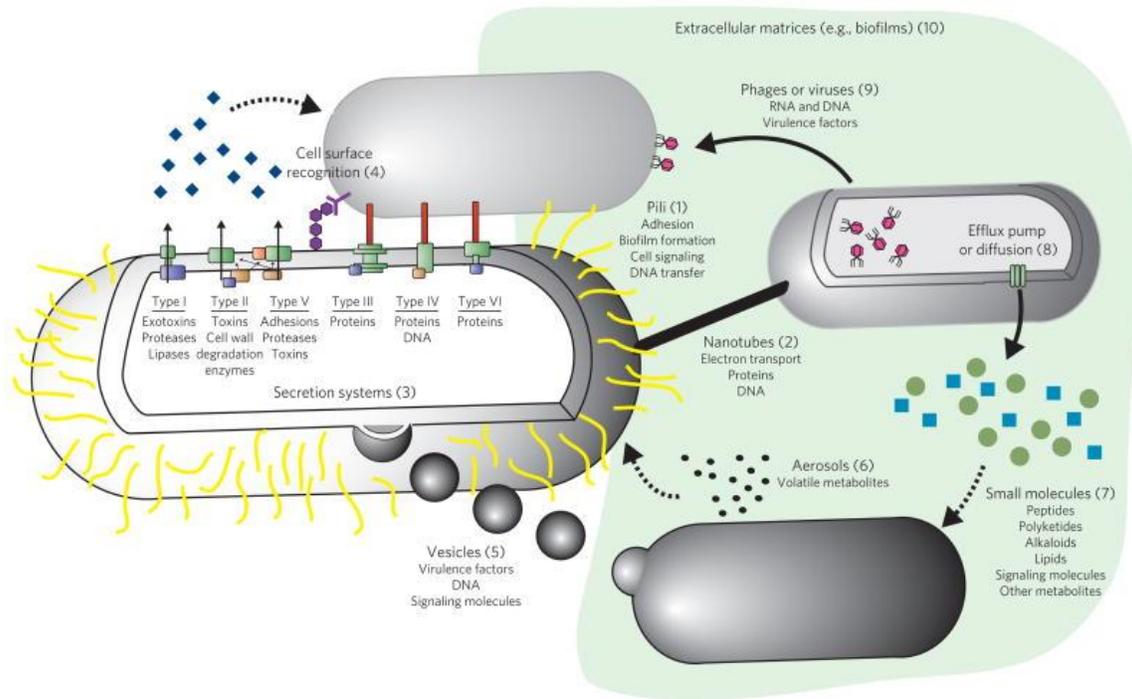
### **2.13. Interaction inter-espèces**

Les interactions entre microorganismes se produisent tout le temps et à tout moment jouant un rôle important dans la dynamique et l'évolution des organismes, ces interactions peuvent se donner au niveau individuel ou au niveau du groupe, au sein de leur propre espèce, ou avec plusieurs espèces. Cela peut se produire par deux mécanismes : l'interaction fondée sur l'échange de biomolécules (p. ex., protéines, acides nucléiques, etc.), et par l'échange d'électrons entre les microorganismes, lesquels peuvent se produire par des voies physiques comme le contact cellule-cellule, et par l'échange de métabolites et de signaux d'information entre les microorganismes, grâce à la présence de produits chimiques diffusibles faisant que le contact physique ne soit pas requis (Fig. 2.12) (Song et al., 2014).

L'une des interactions plus reconnues de contact indépendant entre les microorganismes est médiée par les molécules de signalisation *quorum sensing* (QS). Le système de *quorum sensing* est considéré comme un mécanisme de régulation clé dans l'adaptation écologique et la pathogénicité de différentes bactéries (Filloux et al., 2003), dans lesquelles les cellules microbiennes répondent à un apport chimique ou un stimulus seulement jusqu'à ce qu'un seuil critique de la densité de population soit atteint. Ainsi, les microorganismes utilisent les mécanismes de QS pour détecter l'existence d'espèces

voisines, évaluer leur densité cellulaire, modifier l'expression de certains gènes, et changer leur comportement individuel à une échelle de groupe pour fonctionner comme des organismes multicellulaires. Le mécanisme QS influence et contrôle de nombreux comportements physiologiques des microorganismes, comme la virulence, la capacité de rivaliser avec d'autres espèces, les interactions symbiotiques où les bactéries coopèrent à des fins spécifiques, la motilité et la formation de biofilms. Les autoinducteurs ou molécules de signalisation diffusibles qui interviennent dans la communication cellule-cellule sont diverses, tels les acyl-homosérine lactones (acyl-HSL), les quinolones, le diester de furanosyl borate, les oligopeptides, la molécule 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoléine appelé PQS, les dipeptides cycliques, entre autres (Song et al., 2014; Waters et al., 2005). Les systèmes de sécrétion, la reconnaissance de la surface cellulaire, les vésicules, les aérosols, les petites molécules transportées par la voie des pompes à efflux ou à diffusion sont utilisés aussi par les microorganismes. L'échange métabolique indépendant du contact est avantageux car les signaux sont dispersés, ce qui leur permet d'atteindre de nombreuses cellules et communautés voisines, par opposition à une seule cellule à la fois (Phelan et al., 2011).

Les interactions directes par contact entre les cellules microbiennes peuvent également être utilisées pour livrer des macromolécules du donneur aux cellules réceptrices en utilisant le système basé de pili pour assurer le transfert de l'ADN et / ou les protéines, en formant une conjugaison entre ces cellules. Les bactéries peuvent également utiliser des nanotubes intercellulaires (extensions tubulaires) qui pontent les cellules voisines pour intervenir dans la communication cellule-cellule. Les nanotubes peuvent servir comme voie d'échange de molécules cytoplasmiques (y compris plasmides, protéines et petites molécules) (Song et al., 2014). Chacun de ces types d'interaction joue un rôle vital dans les échanges métaboliques microbiens et fournit la base de la survie microbienne (Phelan et al., 2011).



**Figure 2.12 Interaction inter-espèces.** Les mécanismes d'interaction microbienne les plus étudiés. Ceux-ci incluent les pili (1), les nanotubes (2), les systèmes de sécrétion (3), la reconnaissance de la surface cellulaire (4), les vésicules (5), aérosols (6), petites molécules (7) transportées via des pompes à efflux ou diffusion (8), phages ou virus (9) et biofilms (10). Tirée de Phelan et al., 2011.

## 2.14. Solutés compatibles

Il existe une grande variété de microorganismes halophiles qui ont été isolés d'habitats salés. Ces microorganismes développent différentes stratégies pour s'adapter au stress osmotique généré à cause d'une forte concentration de sels ou d'autres solutés non ioniques dans le milieu extracellulaire. Certains halophiles modifient la composition des lipides membranaires et régulent la concentration intracellulaire de solutés de faible poids moléculaire, avec une accumulation massive de composés dans le cytoplasme pour maintenir un bon équilibre osmotique et éviter la perte d'eau, ce qui pourrait conduire à la plasmolyse et la déshydratation irréversible (Ventosa et al., 1998; Roessler et al., 2001; Pastor et al., 2010).

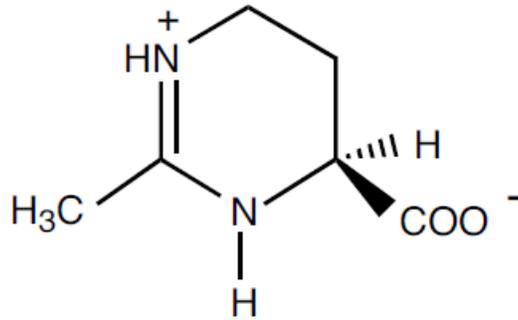
Les composés accumulés peuvent être ioniques ou non ioniques, selon le type de microorganisme, ce qui conduit à deux mécanismes principaux d'accumulation. Le premier d'entre eux, appelé le mécanisme de «salt-in», est typique des Archeas et Haloanaerobiales (bactéries halophiles modérées anoxiques strictes), qui accumulent

dans leur cytoplasme des ions inorganiques, principalement KCl, conduisant à l'adaptation de toutes les protéines et autres composants cellulaires tels que les ribosomes. Le second mécanisme connu sous le nom de «salt-out», est celui utilisé par les bactéries halophiles, non halophiles et les archées méthanogènes halophiles modérées. Ces microorganismes accumulent dans leur cytoplasme des composés organiques de faible poids moléculaire qui aident à maintenir l'équilibre osmotique sans interférer avec le métabolisme cellulaire, c'est pourquoi ils sont dénommés solutés compatibles (Dennis et al., 1997; Galinski, 1995; Wood, 2014).

Les solutés compatibles peuvent s'accumuler après leur transport à l'intérieur de la cellule depuis l'environnement extérieur, ou par synthèse. Les principaux solutés compatibles décrits à ce jour sont: les acides aminés, les sucres, la glycine bêtaïne, l'ectoïne et l'hydroxyectoïne (Galinski et al., 1994; Roberts 2005). Ceux-ci n'interfèrent normalement pas avec le métabolisme et en plus de fournir une activité osmotique. Ils ont la capacité de protéger les protéines, les membranes et même des cellules entières *in vivo* et *in vitro* contre la dénaturation, l'inactivation et l'inhibition par la chaleur ou le stress hyperosmotique (Barth et al., 2000; Diamant et al., 2001).

#### **2.14.1. L'ectoïne**

La molécule d'ectoïne peut être considérée comme un acide aminé hétérocyclique ou comme un dérivé partiellement hydrogéné de la pyrimidine (acide 1,4,5,6-tétrahydro- 2-méthyl-4-pyrimidinecarboxylique) (Fig. 2.13). Elle est synthétisée par un large nombre de bactéries, halotolérantes et halophiles. La concentration d'ectoïne intracellulaire augmente avec l'augmentation du NaCl extracellulaire. Plusieurs études ont montré que l'ectoïne est le principal osmolyte des bactéries chimio-hétérotrophes aérobies et sont plus répandue chez les  $\alpha$ - et  $\gamma$ -Protéobactéries, y compris les genres *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas* et *Marinobacter* (Roberts 2005; Galinski, 1995; Severin et al., 1992). La production d'ectoïne a été observée dans les bactéries méthylophages halophiles comme *Methylophaga marina*, *M. terricola* et *Methylophaga* sp. (Doronina et al., 2000, Doronina et al., 2003). Il a été démontré que les méthylobactéries comme *Methylophaga thalassica* et *M. marina* ont des taux de croissance et d'accumulation d'ectoïne plus élevés que les espèces haloalcaliphiles et les méthanotrophes (Doronina et al., 2010).



**Figure 2.13 Structure chimique de l'ectoïne.** Tirée de Pastor J, 2010

Une fonction secondaire importante des solutés compatibles est qu'ils peuvent servir comme source de carbone, d'énergie ou d'azote, soit en tant que réserves intracellulaires, ou comme des sources externes disponibles pour d'autres organismes. Ceux-ci peuvent être libérés dans l'environnement après la mort ou le choc hypoosmotique des souches productrices (Welsh et al, 2000; Vargas, 2006). Cependant, le catabolisme des ectoïnes (ectoïne et hydroxyectoïne) semble être moins fréquent, de sorte que l'espèce synthétise et accumule les ectoïnes mais ne peut pas les dégrader (Kuhlmann et al., 2002).

Les ectoïnes peuvent accomplir des fonctions telles que la protection de l'intégrité des protéines, des acides nucléiques, des biomembranes et même des cellules entières (da Costa et al., 1998). En plus, les ectoïnes ont des effets positifs sur la stabilité des enzymes (Galinsk et al., 1999). L'ectoïne augmente la stabilité thermique des ADN polymérase à haute température et diminue la température de fusion de la double chaîne d'ADN, améliore l'efficacité des réactions en chaîne par polymérase, améliore l'extension des amorces et les méthodes de séquençage (Lapidot et al., 1999). Les ectoïnes stabilisent non seulement les protéines et autres macromolécules, mais sont également de puissantes protectrices cellulaires. Lorsqu'elles sont ajoutées au milieu de culture, elles peuvent inverser l'inhibition de la croissance des bactéries comme *E. coli* causée par la température et le stress osmotique (Malin et al., 1996).

Les objectifs des différentes études sur la production d'ectoïne sont principalement: (i) Analyser les bénéfices du transfert de résistance aux stress abiotiques à des organismes qui en sont dépourvus, afin d'améliorer certaines de leurs propriétés biologiques ou permettre leur développement en conditions défavorables. (ii) Promouvoir

le développement de procédés pour la production d'ectoïnes qui ne nécessitent pas de milieux hautement salins. Dans nos travaux de recherche, un des objectifs lors de l'évaluation de la production d'ectoïne par la souche JAM1 à différentes concentrations de NaCl était d'observer la réponse de la souche NL23 à l'augmentation de la salinité, lorsqu'elles sont retrouvées en co-culture.

### 3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

#### 3.1. Hypothèses

Plusieurs souches bactériennes ont été isolées du biofilm dénitrifiant provenant du système de dénitrification du Biodôme de Montréal. La souche *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 est la plus abondante dans le biofilm avec *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. En cultures pures, la souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 tolère mal les concentrations de sels au-dessus de 1% p/v (NaCl), et *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 réduit le nitrate en nitrite qui s'accumule dans le milieu. Elle peut toutefois réduire le NO et le N<sub>2</sub>O. Avec leur promiscuité dans le biofilm, les deux souches pourraient interagir entre elles pour une amélioration de l'activité dénitrifiante. La stratégie d'utiliser des co-cultures des deux souches était d'évaluer si :

(i) Les deux souches compétitionnent entre elles pour les substrats impliquant qu'une activité dénitrifiante optimale n'a pas été atteinte dans le biofilm original, ce qui aurait diminuer l'efficacité du bioréacteur.

(ii) Les deux souches sont indifférentes l'une des autres, avec un taux de dénitrification similaire à la souche la plus performante et une croissance similaire des souches aux cultures pures.

(iii) Les deux souches coopèrent dans l'activité dénitrifiante en améliorant le taux de dénitrification et sa croissance au sein du biofilm.

## **3.2. Objectifs**

### **3.2.1. Objectif général**

Mon projet de thèse avait pour but de déterminer l'influence de la souche *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 avec la souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 sur la performance de l'activité dénitrifiante, lorsqu'elles sont ensembles dans des co-cultures.

### **3.2.2. Objectifs spécifiques**

1. Comparer la dynamique de croissance des souches JAM1 et NL23 en présence du nitrate.
2. Détecter la production d'antagonisme entre les souches JAM1 et NL23.
3. Déterminer l'impact des co-cultures planctoniques des souches JAM1 et NL23 sur la croissance respective des souches et le taux de dénitrification.
4. Établir un biofilm dénitrifiant en co-culture avec les souches JAM1 et NL23 et mesurer l'influence de ces biofilms sur l'activité dénitrifiante.
5. Détecter la production de l'osmoprotectant ectoïne le biofilm en co-culture.
6. Mesurer le changement du niveau d'expression des gènes de dénitrification dans les co-cultures.

## 4. MATÉRIEL ET MÉTHODE

### 4.1. Milieux de cultures

*Methylophaga nitratireducenticrescens* a été cultivée en cultures pures avec le milieu *Methylophaga* 1403. Ainsi pour 965 ml de milieu: 24 g NaCl, 3 g MgCl<sub>2</sub>. 6 H<sub>2</sub>O, 2 g MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O, 0.5 g KCl, 1 g CaCl<sub>2</sub>, 0.5 g Bis-tris. Le nitrate (NaNO<sub>3</sub>) a été ajouté selon des concentrations prescrites. Pour les conditions des cultures oxiques le milieu a été ensuite stérilisé par autoclavage. Il a été ajouté de façon stérile (passage à travers un filtre de 0.2 µm) 3 mL de méthanol, 20 mL solution T (par 100 mL: 0.7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 g NH<sub>4</sub>Cl, 10 g Bis-tris, 0.3 g citrate ferrique d'ammonium, pH 8)], 1 mL de vitamine B<sub>12</sub> (0.1 mg/ mL), 10 mL solution minérale du Wolf (ATCC), pH 8.0. La solution de Wolf est composée de 3 g de MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 1,5 g d'acide nitriloacetic, 0,5 g de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O , 1 g de FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 1 g de NaCl, 0,01 g de CoCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,1 g de ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,01 g de CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, 0,01 g 22 de AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 0,01g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et 0,01 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O pour 1 litre d'eau osmose inverse. La solution T et la solution de Wolf ont été autoclavées avant d'être utilisées. Les concentrations du nitrate ont été ajoutées selon les expériences, sous forme de NaNO<sub>3</sub>.

Pour les conditions des cultures anoxiques, un volume de 60 mL de milieu non stérilisé a été distribué dans des flacons de sérum de 120 mL, qui ont été ensuite barbotés pendant 15 minutes avec du N<sub>2</sub> pour éliminer l'oxygène. Les bouteilles ont été scellées avec des bouchons en caoutchouc et des joints métalliques, et finalement autoclavées. Le méthanol, la solution T, la vitamine B<sub>12</sub> et la solution minérale de Wolf ont été ajoutés stérilement aux mêmes concentrations décrites plus haut.

Pour la croissance sur gélose de milieu *Methylophaga* 1403, une solution de base minérale concentrée 2X et une solution d'agar 3% de même volume ont été autoclavées séparément. Les deux solutions ont été réunies et le méthanol, la solution de vitamine B<sub>12</sub>, la solution T et la solution de Wolf ont été ajoutés stérilement. Environ 15 mL de milieu a été ensuite distribué dans des boîtes de Pétri.

*Hyphomicrobium nitrativorans* a été cultivée en cultures pures dans le milieu 337a. La composition de milieu par litre : 1.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.13 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2

g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.09 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2.0 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.88 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  et 10  $\mu\text{g}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pH 7.5)]. Le nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ) a été ajouté selon des concentrations prescrites. Le milieu a été ensuite stérilisé par autoclavage. Il a été ajouté de façon stérile (passage à travers un filtre de 0.2  $\mu\text{m}$ ) 3 mL de méthanol, 1 mL de vitamine  $\text{B}_{12}$ , 5 mL d'éléments traces (ATCC). La solution d'éléments traces est composée de: 0.618 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.176 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  pour 1 litre d'eau osmose inverse. Pour les conditions des cultures anoxiques, les mêmes étapes que celle du milieu 1403 ont été appliquées avec l'ajout à la fin de méthanol, vitamine  $\text{B}_{12}$  et éléments traces aux mêmes concentrations décrites plus haut.

Pour la croissance sur gélose de milieu 337a, une solution de base minérale concentrée 2X et une solution d'agar 3% de même volume ont été autoclavées séparément. Les deux solutions ont été réunies, et le méthanol, la solution de vitamine  $\text{B}_{12}$ , la solution de éléments traces ont été ajoutés stérilement. Environ 15 mL de milieu ont été ensuite distribués dans des boîtes de Pétri.

Pour certaines expériences, la concentration de  $\text{NaCl}$  a été ajustée à 0.5% ou 1% dans les milieux *Methylophaga* 1403 et 337a.

Le milieu d'eau de mer commercial Instant Ocean® salt mix (IO) (Aquarium systems, Mentor, OH, É-U) a été préparé avec 15 g / L (17.5 mil) ou 30 g / L (35 mil). Cette dernière concentration est celle recommandée par la compagnie pour reconstituer l'eau de mer. Il a été ajouté aux milieux du  $\text{NaNO}_3$  à des concentrations prescrites, 3 mL de méthanol, 1 mL de vitamine  $\text{B}_{12}$  et 1 mL des éléments traces, et finalement ajusté à pH 7.8-8.0. Pour les cultures anoxiques, les mêmes étapes décrites pour le milieu 1403 ont été appliquées avec l'ajout à la fin de méthanol, et d'éléments traces aux mêmes concentrations décrites plus haut.

Un milieu d'Eau de Mer Synthétique (EMS) a été utilisé (Atlas, 2004). Chaque litre de ce milieu de culture contenait : 27,5 g de  $\text{NaCl}$ , 10,68 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de  $\text{KCl}$ , 0,5 g de  $\text{CaCl}_2$ , 456  $\mu\text{L}$  d'une solution de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4 g  $\text{L}^{-1}$ , 5 mL d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  51,2 g  $\text{L}^{-1}$ , 5 mL d'une solution de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  34 g  $\text{L}^{-1}$  et 1 mL d'éléments traces ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,9 g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,03 g  $\text{L}^{-1}$  et  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,2 g  $\text{L}^{-1}$ ).

## **4.2. Détermination de la concentration du nitrate et nitrite**

### **4.2.1. Détermination par chromatographie ionique**

Un volume de 700 µL d'échantillon a été prélevé à la seringue dans le milieu de culture et conservé à -20 °C jusqu'à son analyse. Au moment des analyses, les échantillons ont été décongelés à température pièce, puis centrifugés à 13 000 rpm 2 min et analysés par un chromatographe ionique 850 Professional IC (Metrohm, Riverview, FL, É-U) avec une colonne cationique METROSTEP A Supp 5 250 /4.0. Elle contient des particules de 5 µm composées de groupements d'ammonium et d'alcool polyvinyle. La colonne a opéré avec un débit de 0.7 mL / min avec 11 MPA de pression. L'éluant était composé de 3.2 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 1 mM NaHCO<sub>3</sub>. Le nitrate et le nitrite ont été détectés par le VIS détecteur 887 UV Professional / (Metrohm). Les données ont été analysées avec le logiciel MagIC Net 2.3 (Metrohm).

### **4.2.2. Détermination par chlorite de vanadium (VCl<sub>3</sub>)**

Le VCl<sub>3</sub> convertit le nitrate en nitrite. La préparation de 5 solutions de travail a été effectuée. Pour la préparation de 100 mL d'une solution A (VCl<sub>3</sub>) : 800 mg de VCl<sub>3</sub> ont été dissous dans 21.6 mL d'eau, 8.4 mL de HCl concentré (37% wt.%, ~12 M) ont été ajoutés et finalement complétés avec 70 mL d'eau. Pour la préparation de la solution B (NEDD 0.2%) : 200 mg N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride ont été ajoutés à 100 mL d'eau. Pour la préparation de la solution C (sulfanilamide 2%) : 2 g sulfanilamide ont été ajoutés à 100 mL HCl 10% (27 mL HCl concentré + 73 mL eau). La Solution D (Réactif NO<sub>x</sub>) a été préparée avec un mélange des solutions A, B et C dans les proportions 5 :1 :1 respectivement. La solution E (Réactif nitrite) était un mélange des solutions B et C dans les proportions 1 :1. Des solutions mères de nitrate et de nitrite ont été préparées en dissolvant 1 g de NaNO<sub>3</sub> ou 1 g de NaNO<sub>2</sub> dans 1 L d'eau (100 mg N / L). À partir de cette solution, ont été réalisées différentes solutions de nitrate et nitrite standards avec des concentrations variant de 1 et 100 mg N / L (équivalent d'atome d'azote). La concentration en nitrate et nitrite de la plupart des échantillons analysés se situait entre 100 et 300 mg N / L. Les échantillons ont dû être dilués 1/100 pour atteindre la portion linéaire de la courbe standard.

Pour l'analyse des NOx (nitrate + nitrite), 100 µL de Solution D (Réactif NOx) ont été ajoutés à 120 µL d'échantillon dilué ou des solutions standard de nitrate en duplicata. Les réactions ont été faites dans des plaques à 96 puits (à fond plat). Les plaques ont été couvertes et mises dans une étuve à 45°C ± 5, pendant 60 min. Des mesures ont été effectuées sur le lecteur de plaques en mode d'absorbance (Tecan) en utilisant une longueur d'onde de 540 nm. Pour l'analyse du nitrite, 200 µL d'échantillon dilué ou standards nitrite ont été ajoutés à 20 µL de Solution E (Réactif Nitrite) dans une autre plaque 96 puits. Les plaques ont été couvertes et mises dans une étuve à 45°C ± 5, pour 30 min. Elles ont été brassées par 10 secs pour enlever les bulles et lues à 540 nm. La concentration du nitrate d'un échantillon a été obtenue en soustrayant la concentration du nitrite du NOx.

### **4.3. Concentration de protéines**

La quantité de bactéries dans une culture ou un biofilm a été estimée en mesurant la concentration protéique. Un volume de 1 mL du milieu de culture a été récolté et centrifugé pendant 1 min à 16 000 x g. Le culot obtenu a été dispersé dans 1 mL de NaOH 0,1 M. Dans le cas de la biomasse en biofilm, 5 supports ont été ajoutés dans 3 mL de NaOH 0,1 M, afin d'enlever le plus possible de biomasse. Les échantillons ont été vortexés et incubés 30 minutes dans un bloc chauffant à 70°C. Les échantillons ont été vortexés une seconde fois et incubés 30 minutes à 70°C. Certains échantillons ont été dilués selon la quantité de biomasse entre 10 et 100 fois dans NaOH 0,1 M. La courbe standard a été effectuée avec la solution d'albumine de sérum bovin dans une gamme de 0 à 50 µg/mL dans du NaOH 0,1M et un blanc ne contenant que du NaOH 0,1 M à également été réalisé pour éliminer le bruit de fond. Des triplicatas des standards et des échantillons ont été distribués dans une plaque de 96 puits, à raison de 160 µL. Ce volume a été mélangé avec 40 µL du réactif de Bradford « Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent » (Bio-Rad Laboratories) à tous les puits. Le tout a été incubé 5 minutes. La plaque a été lue au lecteur Infiniti® M1000 PRO (Tecan, Maennedorf, Suisse) à une longueur d'onde 595 nm.

La concentration protéique des échantillons a été calculée en plaçant les valeurs sur la courbe standard et en prenant compte des dilutions effectuées.

#### 4.4. Calcul du taux de dénitrification spécifique

Le taux de dénitrification spécifique a été calculé en  $\text{mg-N L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg-protéines}^{-1}$  pour chaque réplikat en divisant le taux de dénitrification (section 4.6.) par la quantité en protéine retrouvée dans la fiole correspondante (section 4.6.1.), ((Taux de dénitrification) / (Quantité de protéines)).

#### 4.5. Dénombrement des souches JAM1 et NL23 par qPCR

##### 4.5.1. Extraction de l'ADN

Un volume de 1 mL de biomasse en suspension a été centrifugé (16 000 g 2 min); le culot a été recueilli pour l'extraction d'ADN. La biomasse attachée sur un support colonisé a été également extraite. L'ADN a été extrait avec la trousse commerciale FastDNA® spin (MP Biomedicals). Le culot de la biomasse en suspension a été homogénéisé avec des billes de verre dans 1 mL de la solution de CLS-TS (solution 1 de la trousse commerciale) pour 40 secs à vitesse 6.0 dans l'appareil FastPrep. Les tubes ont été centrifugés à 13 000 g 5 min, et 800  $\mu\text{L}$  du surnageant a été mis dans un tube de 2 mL avec un volume égal de Binding matrix. Les tubes ont été mélangés et incubés 5 min à température pièce avec agitation douce, et centrifugés à 13 000 g pendant 1 min. Les culots ont été dispersés avec 500  $\mu\text{L}$  de la solution SEWS-M. L'ADN a été ensuite purifié avec les SPIN modules (SPIN filters + catch tube). Les tubes ont été centrifugés à 13 000 g 1 min deux fois. L'élution de l'ADN a été réalisée avec 100  $\mu\text{L}$  de solution DES, en incubant les tubes 5 min à 55 °C et centrifugeant à 13 000 g 2 min. La concentration de l'ADN a été mesurée par spectrophotométrie avec l'appareil « NanoDrop 2000c Spectrophotometer » (Thermo Scientific, Welmington, États-Unis), en utilisant 1  $\mu\text{L}$  d'ADN dans un ratio de 260/280 nm, par méthode de fluorescence, dans le mode Nucleic Acid (DNA).

Pour évaluer la qualité de l'ADN extrait, celui-ci a été migré par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% (p/v) réalisé avec le tampon de migration TAE 1 X (TAE 50 X: Tris 242 g  $\text{L}^{-1}$ , EDTA.2Na 0,5 M pH 8,0 100 mL  $\text{L}^{-1}$  et acide acétique glaciale 57,1 mL  $\text{L}^{-1}$ ) et 2  $\mu\text{L}$  de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, (10,000X). Pour chaque échantillon à tester, 7  $\mu\text{L}$  d'ADN ont été mélangés avec 3  $\mu\text{L}$  de tampon de chargement à 6 X contenant glycérol 30 % (v/v), xylène cyanol 0,25 % (p/v) et bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), et le tout a été déposé sur gel. Le marqueur de poids moléculaire 1 kb a été ajouté sur chaque gel.

La migration des échantillons dans le gel a été effectuée à 90 V pour environ 90 minutes. L'ADN présent sur le gel a été visualisé suite à une exposition aux rayons UV émis par l'appareil Molecular Imager Gel Doc (Bio Rad), utilisé conjointement avec son logiciel informatique. L'ADN extrait a été conservé à -20 °C.

#### **4.5.2. Réaction en chaîne par polymérase (PCR) des ADN standards**

Les gènes de la nitrate réductase des deux espèces, *narG1* pour *Methylophaga nitratireducentescens* JAM1 et *napA* pour *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, ont été ciblés pour leur quantification par qPCR. Une première série d'amplification PCR dans ces gènes respectifs a été effectuée pour obtenir des amplicons qui serviront pour effectuer la courbe standard lors des essais de qPCR.

Les PCR ont été effectuées dans un volume de 50 µL : 38.5 µL d'eau, 2.5 µL de Tampon Taq 10X ThermoPol™ Reaction Buffer (Biolabs, Ipswich, MA, É-U), 1 µL d'albumine sérique bovine 20 µg/µL (Sigma-Aldrich), 1 µL de dNTPs (10 µM), 1 µL de chaque amorce (10 pmoles/µL) (Tableau 4.1), 0.5 µL de Taq DNA polymérase (2.5 U/µL) et 2 µL d'ADN (20 ng) des souches NL23 ou JAM1. Pour chacune des réactions PCR, un contrôle négatif a été effectué avec tous les éléments sauf l'ADN. Les amplifications pour la souche NL23 ont été ensuite effectuées avec le programme suivant : dénaturation initiale de 94 °C pendant 5 min, suivi par 30 cycles de 94 °C pendant 30 s, une hybridation à 55 °C pendant 30 s, et de l'élongation à 72 °C pendant 30 s. Avec une élongation finale à 72 °C pendant 7 min. Les amplifications pour la souche JAM1 ont été réalisées avec une dénaturation initiale à 94° C pendant 5 min, suivi par 30 cycles à 94 °C pendant 45 s, de l'hybridation à 55 °C pendant 45 s, et de l'élongation à 72 °C pendant 45 s. L'élongation finale a une durée de 7 minutes 72 °C. À la fin de la réaction, les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1 %.

Nom	Séquence 5' – 3'	Température d'hybridation (°C)	Longueur Amplicon (pb)
napA 1171f (NL23) <sup>1</sup>	TACAACGTCCACCTGCTGAC	55	625
napA 1846r (NL23) <sup>1</sup>	TCCGCTTCGTGGTTTTTCGTA		
narG1_G (JAM1) <sup>1</sup>	ATGACAAGATCGTGCGTTCT	57	664
narG1_D(JAM1) <sup>1</sup>	GGTGTACGGGTCATTGGTAAG		

Source <sup>1</sup> : Payette, 2014.

**Tableau 4.1 Paires d'amorces utilisées pour l'amplification PCR de l'ADN extrait de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, et ayant servi comme standard dans les essais de qPCR.**

#### 4.5.3. Purification des ADN standards

Les produits obtenus de la PCR à partir de l'amplification d'ADN (section 4.5.2), des souches JAM1 et NL23 ont été concentrés par vacuum avec le « Savant SpeedVac Concentrator » (Savant Instrument Inc., Farmingdale, NY, É-U). Ceux-ci ont migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (p/v) à 90 V. Les bandes correspondant aux produits de PCR ont été découpées et purifiées avec un système de nettoyage PCR (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) (Promega, Madison, WI, É-U). Les bandes ont été placées dans un tube de 1.5 mL. La solution de liaison de la trousse a été ajoutée dans les tubes et le tout a été incubé à 50 - 55 °C jusqu'à les tranches de gel soient complètement dissoutes. Ce mélange a été transféré à une minicolonne et incubé à température pièce pendant 1 min. La minicolonne a été centrifugée à 16 000 g pendant 1 min. Un volume de 700 µL de solution de lavage a été ajouté, et la minicolonne a été centrifugée à 16 000 g pendant 1 min. Un volume de 500 µL d'eau a été ajouté à la colonne et le tout a été incubé à température pièce pendant 1 min. Finalement, la minicolonne a été centrifugée à 16 000 g pendant 1 min. Les extraits d'ADN ont été entreposés -20 °C.

#### 4.5.4. Les essais de qPCR pour les ADN standards

Les extraits des ADN standards ont été dosés avec la trousse Quant-it Pico Green® dsDNA reagent and Kits (Invitrogen). Celle-ci comprend un colorant fluorescent se liant à l'ADN double-brin. Un ADN contrôle avec une concentration connue a permis de déterminer la concentration des extraits d'ADN. Pour ce faire, 4 dilutions séquentielles 1:2 de l'ADN contrôle (10 ng / µL; phage λ) pour créer une courbe standard. En fonction

de la quantité d'ADN dosée, une dilution appropriée dans 50 µL des extraits d'ADN standard a également été effectuée afin que la quantité d'ADN totale dans le tube soit inférieure à 100 ng et se situe ainsi à l'intérieur de la courbe standard de l'ADN contrôle de la trousse. Ensuite 50 µL de solution Pico Green 1X ont été ajoutés à tous les tubes. Après un repos de 5 min, l'ADN a été quantifié dans le mode « Nucleic Acid Measurement » du logiciel « Rotor- Gene 6000 Series Software », pour une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et d'émission de 520 nm. Cette valeur a été convertie en nombre de copies µL<sup>-1</sup> de *narG1* (souche JAM1) ou de *napA* (souche NL23). À partir de cette concentration, les courbes standards pour les essais de qPCR ont été établies avec des séries de dilutions séquentielles s'étalant de 10<sup>8</sup> à 10<sup>0</sup> copies / 5 µL.

#### 4.5.5. PCR quantitative (qPCR)

Le volume de chaque réaction des essais qPCR totalisait 20 µL et contenait : 4.2 mL d'eau, 10 µL de SYBRgreen mix (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, É-U), 0.4 µL amorce R (10 pmoles/µL), 0.4 µL amorce F (10 pmoles/µL) (Tableau 4.2) et 5 µL d'ADN (20 ng/µL). Un blanc a été également effectué avec 5 µL d'eau miliQ en lieu d'ADN. Les essais de quantification d'ADN ont été effectués par qPCR avec l'appareil Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Concord, Australie), dans le mode « Three Steps with Melt », pour une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et d'émission de 525 nm. Le programme utilisé pour la quantification du gène *napA* de la souche NL23 a débuté par une étape de dénaturation initiale à 95 °C pour 10 min, ensuite des étapes de dénaturation à 95 °C pour 15 s, d'hybridation des amorces à 61 °C pour 30 s et d'élongation à 72 °C pour 30 s, sont répétées pendant 40 cycles. Un cycle de terminaison de 81 °C pour 15 s, suivi par une courbe de dissociation de 65 à 99 °C en augmentant de 1 °C par pas avec une pause de 5 s pour chaque pas. Dans le cas du gène *narG1* de la souche JAM1, l'amplification a commencé par une étape de dénaturation initiale à 95 °C pour 10 min, ensuite des étapes de dénaturation à 95 °C pour 10 s, d'hybridation des amorces à 60 °C pour 15 s et d'élongation à 72 °C pour 20 s, sont répétées pendant 40 cycles. Un cycle de terminaison de 81 °C pour 15 s, suivi par une courbe de dissociation de 65 à 95 °C en augmentant de 1 °C par pas avec une pause de 5 s pour chaque pas.

Nom	Séquence 5' – 3'	Température d'hybridation (°C)	Longueur Amplicon (pb)
napA1415f (NL23) <sup>1</sup>	AGGACGGGCGGATCAATTTT	61	131
napA1526r (NL23) <sup>1</sup>	CGGATATGCATCGGACACGA		
narG1313f-JAM1 (JAM1) <sup>1</sup>	AGCCCACATCGTATCAAGCA	61	149
narG1461r-JAM1 (JAM1) <sup>1</sup>	CCACGCACCGCAGTATATTG		

Source <sup>1</sup> : Payette, 2014.

**Tableau 4.2 Paires d'amorces spécifiques utilisées pour la quantification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 par qPCR**

#### 4.5.6. L'amplification PCR de séquences des gènes de l'ARN 16S ribosomal

Les séquences des gènes de l'ARN 16S ribosomal (ARNr 16S) ont été amplifiées par PCR en utilisant des amorces universelles pour bactéries (Tableau 4.3) à une concentration 10 µM, et correspondant aux positions 8 à 27 et de 1521 à 1540 dans les gènes de l'ARNr 16S d'*Escherichia coli* (GenBank accession n° J01695). Les amplifications PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25 µL avec 15.25 µL d'eau, 2.5 µL de Tampon Taq (10X), 0.25 µL d'albumine sérique bovine (20 µg/µL), 0.5 µL de dNTPs (10 µM), 0.5 µL de chaque amorce (10 pmoles/µL) (Tableau 4.3), 0.25 µL de Taq DNA polymérase (2.5 U/µL) et ADN (20 ng) des souches NL23 et JAM1. Les amplifications ont été ensuite effectuées à 94 °C pendant 5 min, 55 °C pendant 5 min, puis 30 cycles à 72 °C pendant 45 s, 94 °C pendant 45 s, 55 °C pendant 45 s, et enfin une période d'extension de 10 min à 72 °C. À la fin de la réaction, les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1 %.

Nom	Séquence 5' – 3'	Température d'hybridation (°C)
PA 27 fym <sup>1</sup>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55
PH <sup>1</sup>	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	55

Source <sup>1</sup> : Bruce *et al.*, 1992.

**Tableau 4.3 Paires d'amorces utilisées pour l'amplification de PCR des gènes de l'ARNr 16S chez *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23**

#### **4.6. Cinétique de dénitrification des souches JAM1 et NL23**

La première pré-culture a été faite avec l'ensemencement d'une colonie dans 15 mL de milieu sans nitrate *Methylophaga* 1403 ou 337a complet (selon la souche utilisée), et incubée en conditions oxiques pendant 3 jours avec agitation à 30°C. Pour la deuxième pré-culture, 1 mL de la première pré-culture a été ajouté à 30 mL milieu sans nitrate, et celle-ci a été incubée en conditions oxiques pendant 20 heures afin de s'assurer que la culture soit en phase exponentielle de croissance. La deuxième pré-culture a servi d'inoculum pour ensemencer des vials avec 60 mL de milieux anoxiques avec des concentrations initiales en nitrate de 28, 70, 140, 280, 350, 560 mg NO<sub>3</sub>-N/L. La densité optique (DO<sub>600 nm</sub>) de départ des cultures était de 0,025, et celles-ci ont été incubées à 30°C sans agitation dans le noir pendant 72h. La croissance bactérienne a été mesurée par spectrophotométrie (DO<sub>600 nm</sub>) à des intervalles réguliers. Les différentes concentrations de nitrate ont été testées en triplicata avec un témoin négatif non-inoculé pour chaque concentration.

Les concentrations du nitrate et nitrite ont été déterminées à des intervalles réguliers durant la croissance (sections 4.2.1. et 4.2.2). Le taux de dénitrification a été mesuré par la pente de la portion linéaire de la réduction des NO<sub>x</sub> (nitrate + nitrite). Le taux de croissance (DO<sub>600 nm</sub>) a été déterminé par la pente de la portion linéaire de la phase exponentielle de la culture.

#### **4.7. Co-cultures planctoniques des souches JAM1 et NL23**

Dans une première série d'expériences, les pré-cultures de chaque souche ont été effectuées sans nitrate comme décrite à la section 4.6. Les deuxièmes pré-cultures ont été centrifugées (15 min à 16 000 g) et dispersées dans son propre milieu de culture avant l'inoculation. Ces dispersions bactériennes ont constitué l'inoculum pour les co-cultures. Les inoculums des deux souches ont été ensemencés dans des vials de 120 mL contenant chacune 60 mL avec du milieu *Methylophaga* 1403 modifié à 0.5% NaCl avec 300 mg NO<sub>3</sub>-N / L. Les ratios de DO<sub>600 nm</sub> des souches JAM1 et NL23 de 1 :10, 1 :5 et 1 :1 (JAM1:NL23), pour une DO<sub>600 nm</sub> de 0.1, ont été testés. Les co-cultures ont été incubées en conditions anoxiques à 30°C, sans agitation pendant 144 heures. Les essais ont été réalisés en triplicata, en utilisant comme contrôle des cultures pures des souches JAM1 et NL23 dans le milieu *Methylophaga* 1403 et 337a, respectivement. Des prélèvements à

des intervalles réguliers ont été faits pour mesurer la  $DO_{600\text{ nm}}$ , et les concentrations de nitrate et nitrite. Un dénombrement de chaque souche a été effectué à la fin des essais par qPCR, en ciblant des gènes spécifiques à chaque souche (*narG1* et *napA*) (comme décrit à la section 4.5).

Dans une deuxième série d'expériences, la deuxième pré-culture de la souche NL23 a été effectuée en conditions anoxiques dans 60 mL de milieu 337a avec 300 mg  $NO_3^-$ -N / L de nitrate et 3 ml d'inoculum provenant de la première pré-culture à 30 C, sans agitation pendant 3 jours. Après cette période de temps, le milieu de culture a été centrifugé à 16 000 g pendant 15 min pour concentrer la biomasse de la souche et être utilisé comme inoculum pour la co-culture.

#### **4.8. Développement de biofilm**

##### **4.8.1. Développement de biofilm des souches JAM1 et NL23 sur différentes surfaces**

Des tubes de 20 mL de polystyrène, de polypropylène et de verre ont été testés. Des volumes de 5 mL de milieu 1403 modifié (0.5% NaCl) ont été ajoutés à ces tubes inoculés avec les souches JAM1 et NL23, chacune avec une  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,05 et une  $DO_{600\text{ nm}}$  final de 0,1. Les co-cultures ont incubées à 30°C sans agitation pendant une semaine, sous conditions oxiques avec et sans nitrate à une concentration de 300 mg  $NO_3^-$ -N / L, ou sous conditions anoxiques avec 300 mg  $NO_3^-$ -N / L de nitrate. Des cultures pures ont été faites comme contrôle dans le même milieu et dans les mêmes conditions. À la fin de l'incubation, les tubes ont été soigneusement rincés à l'eau et une solution à 1% de cristal violet a été ajoutée pour colorer les cellules attachées aux surfaces des tubes (O'Toole et Kolter. 1998). Après 10 à 15 min à température ambiante, les tubes ont été rincés à l'eau une seconde fois. Le cristal violet attaché à la biomasse a été solubilisé en vortexant pendant 20 min avec 2 mL d'éthanol 95% à l'aide de billes de verre. La quantité de cristal violet a été mesurée par spectrophotométrie à DO de 600 nm. La croissance des cultures a été suivie en parallèle dans d'autres tubes, ainsi que de la concentration en nitrate et nitrite. La concentration de chaque souche a été déterminée par qPCR.

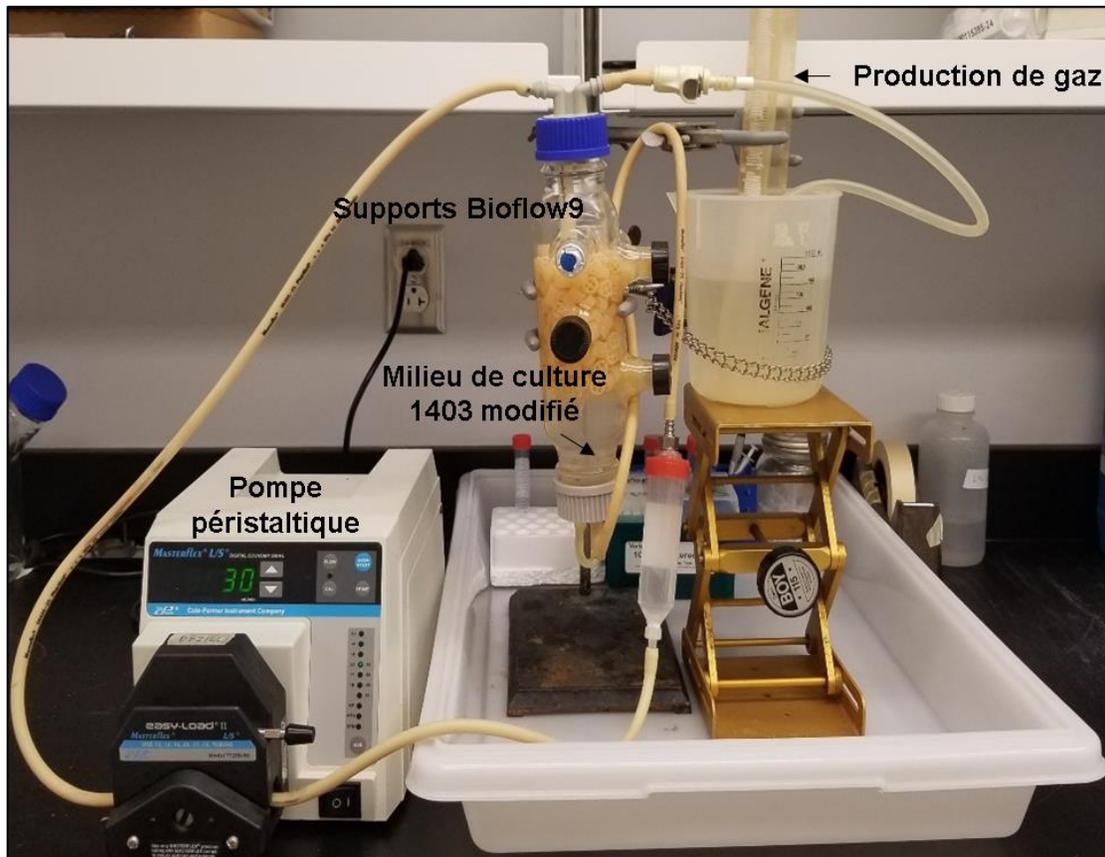
#### 4.8.2. Développement du biofilm en Bio-réacteur

Ces expériences ont été réalisées pour obtenir un biofilm dans un réacteur sur de supports de plastique vides, en conditions anoxiques. La co-culture en biofilm a été acclimatée progressivement aux conditions marines, étant donné la sensibilité de la souche NL23 à la concentration de NaCl.

Le milieu de culture *Methylophaga* 1403 modifié a été utilisé pour l'adaptation des souches JAM1 et NL23 à différentes concentrations de NaCl. Cette concentration a été graduellement augmentée à 0.5%, 1%, 2% et 2.75%. Ensuite, un changement final avec le milieu IO avec et sans suppléments (la solution de Wolf, la solution T, du méthanol, et de la vitamine B<sub>12</sub>), a été effectué. Le réacteur a été démarré avec 260 supports Bioflow 9 et 500 ml du milieu en recirculation avec un débit de 30 ml/min (Fig. 4.1). Le biofilm a été produit avec les deux souches JAM1 et NL23. La première étape d'acclimatation du biofilm dans le bioréacteur a débuté avec la production de l'inoculum des souches NL23 et JAM1 (3 g de biomasse environ), en phase exponentielle. Les inoculums ont été préparés dans un volume de 60 mL de milieu. La souche JAM1 a été cultivée sans nitrate et dans des conditions oxiques dans le milieu *Methylophaga* 1403. Pendant la préparation de l'inoculum de la souche NL23 une stimulation des gènes de dénitrification a eu lieu avec l'ajout de 300 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / L de nitrate en conditions anoxiques en utilisant le milieu de culture 337a. Les cellules ont été centrifugées à 13 000 g pendant 15 min. Les souches ont été inoculées au réacteur sans nitrate et dans des conditions oxiques (entrée d'air par barbotage) pendant 3 jours pour permettre la croissance et la colonisation de la surface des supports. A partir du jour 4, l'alimentation d'air a été coupée et du nitrate a été ajouté. Après environ une semaine ou en fonction du taux de dénitrification observé dans le réacteur, le milieu ainsi que les bactéries en suspension ont été jetés, et remplacé par un milieu frais. Seules les bactéries qui ont colonisées la surface des supports et la paroi du bioréacteur ont été conservées. Le nitrate a été graduellement augmenté de 100 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / L jusqu'à 300 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / L pour permettre aux cellules de continuer à respirer. Pendant des intervalles de temps réguliers, les niveaux du nitrate et du nitrite ont été mesurés. Lorsque le nitrate et nitrite étaient réduits, le bioréacteur était vidangé et un milieu frais ajouté. Le milieu a été préparé stérilement, mais le changement de celui-ci dans le réacteur a été fait de manière non-stérile, dans des conditions oxiques. Étant donné que le système était fermé et en recirculation, la consommation d'O<sub>2</sub> par le métabolisme microbien fut rapide et les conditions anoxiques ont pu s'établir.

La concentration des souches a été suivie par qPCR. Également, la production de gaz a été suivie comme un autre indicateur d'activités dénitrifiantes du réacteur. Finalement, des supports ont été prélevés et congelés par azote liquide dans un « glove box » avec une atmosphère balayé de N<sub>2</sub> (exempt de O<sub>2</sub>) avec le but d'en extraire l'ARN, de déterminer la concentration des protéines et pour déterminer le niveau d'expression de certains gènes de la dénitrification lors du changement de concentration de NaCl (Tableau 4.4).

Deux réacteurs ont été réalisés avec les souches NL23 et JAM1 (co-cultures biofilm) et un dernier avec seulement la souche NL23 (mono-culture biofilm). Les conditions d'opération des trois réacteurs sont décrites au Tableau 4.4.



**Figure 4.1 Bioréacteur.** La co-culture des souches JAM1 et NL23 a été effectuée dans 500 ml du milieu de culture Methylophaga 1403 modifié à différentes concentrations de NaCl, avec un système en recirculation qui a permis le développement d'un biofilm des deux souches sur des supports Bioflow 9. La production de gaz provenant du processus de dénitrification a été suivie à travers le déplacement de l'eau contenue dans un cylindre gradué.

Bio-réacteur	NaCl% (w / v)	Concentration du nitrate (mg-N/L)	Méthanol% (v / v)	C / N	Déterminations réalisées				
					NO <sub>3</sub> / NO <sub>2</sub>	Quantification par qPCR	Production de gaz (ml)	Concentration en protéines (mg)	Extraction ARN et RT- qPCR
<b>B1</b> JAM1/NL23	0.5 air	100	0,1	7,4	M	M	Nm	Nm	Nm
	0.5	100	0,1	7,4	M	M	Nm	Nm	Nm
	0.5	200	0,2	7,4	M	M	Nm	Nm	Nm
	0.5	300	0,3	7,4	M	M	M	Nm	Nm
	1.0	300	0,3	7,4	M	M	M	Nm	Nm
	2.0	300	0,3	7,4	M	M	M	Nm	Nm
	2.75	300	0,3	7,4	M	M	M	Nm	Nm
	IO	300	0,3	7,4	M	M	M	M	Nm
	IO + suppl.	300	0,3	7,4	M	M	M	Nm	M
<b>B2</b> JAM1/NL23	0.5 air	100	0,1	7,4	M	M	Nm	Nm	Nm
	0.5	100	0,1	7,4	M	M	M	Nm	Nm
	0.5	200	0,2	7,4	M	M	M	Nm	Nm
	0.5	300	0,3	7,4	M	M	M	M	M
	1.0	300	0,3	7,4	M	M	M	M	Nm
	2.0	300	0,3	7,4	M	M	M	M	Nm
	2.75	300	0,3	7,4	M	M	M	M	M
	IO + suppl.	300	0,3	7,4	M	M	M	M	Nm
	IO	300	0,3	7,4	M	M	M	Nm	M
<b>B3</b> NL23	0 air	300	0,1	2,5	M	M	Nm	Nm	Nm
	0	300	0,1	2,5	M	M	M	Nm	Nm
	0.5	300	0,1	2,5	M	M	M	M	M
	1.0	300	0,3	7,4	M	M	M	M	Nm
	2.0	300	0,3	7,4	M	M	M	M	M
	2.75	300	0,3	7,4	M	M	M	M	Nm
	IO + suppl.	300	0,3	7,4	M	M	M	Nm	Nm

Tableau 4.4 Conditions d'opération des trois réacteurs. M : mesuré. Nm : non mesuré.

#### 4.9. Quorum sensing (QS)

Les acyl homosérine lactones (acyl-HSL) sont molécules de signalisation de QS. *Chromobacterium violaceum* produit un pigment violet (violacéine) en présence d'acyl-HSL. La souche mutante de *C. violaceum*, est déficiente dans la production de cette molécule de signalisation, mais conserve la capacité de synthétiser la violacéine en réponse à la présence d'acyl-HSL. Pour la croissance de *Chromobacterium violaceum*, le milieu YEM agar a été préparé. Ainsi par un litre de milieu a été ajouté :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g / L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,1 g / L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,3 g / L, extrait de levure 5 g / L, agar 10 g / L. Le tout a été autoclavé. Les solutions stériles suivantes ont été ajoutées : 5 mL / L de  $\text{FeSO}_4$  1 mM, 500  $\mu\text{L}$  / L de  $\text{MgSO}_4$  1M et 50  $\mu\text{L}$  / L de  $\text{CaCl}_2$  1 M. La solution de  $\text{FeSO}_4$  a été stérilisée par filtration. Des pré-cultures liquides en milieu TSB des souches CVO26 et VIR24 de *C. violaceum* ont été préparées et incubées à 30°C avec agitation pendant 12 h. Les suspensions bactériennes ont été étalées sur la surface des géloses YEM.

Des cultures de 1 mL des souches NL23 et JAM1 ont été préparées à partir de milieu de culture de 337a et *Methylophaga* 1403, respectivement, jusqu'en phase exponentielle. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  de standard interne (HHQ-D<sub>4</sub>) avec 750  $\mu\text{L}$  d'acétate d'éthyle ont été ajoutés au milieu recueilli. Les échantillons ont été centrifugés à 16 000 g pendant 5 min. Le surnageant a été recueilli, évaporé sous jet d'azote et dissous dans 300  $\mu\text{L}$  d'acétate d'éthyle. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  a été déposé sur un disque d'acétate de cellulose (5 mm) et mis sur la surface de la gélose YEMensemencée avec *C. violaceum*. Les géloses ont été incubées à 30°C jusqu'à l'apparition de zones violacées en présence d'acyl-HSL. Comme contrôlé positive, des disques imbibés de C<sub>4</sub>-HSL ou de C<sub>8</sub>-HSL ont été utilisés, et comme contrôlé négative d'acétate d'éthyle.

#### 4.10. Production de l'ectoïne

##### 4.10.1. Ectoïne extracellulaire

La souche JAM1 a été cultivée jusqu'en phase exponentielle (24 h) avec le milieu *Methylophaga* 1403. La culture a été centrifugée à 4 °C et 16 000 g pendant 15 min. Le surnageant a été recueilli pour l'analyse par HPLC (Zhang, 2009).

#### 4.10.2. Ectoïne intracellulaire

Un volume de 1 ml de culture de la souche JAM1 en suspension et en phase exponentielle a été centrifugé à 16 000 g pendant 10 min. Le culot a été extrait avec 2 mL de solution méthanol / chloroforme / eau (10: 5: 4) et vortexé pendant 3 h. L'extrait a ensuite été centrifugé à 16 000 g pendant 10 min. Le surnageant (1 mL) a été récolté et un volume égal de chloroforme / eau (1: 1) a été ajouté. Le mélange a été agité pendant 30 min. La phase aqueuse contenant l'ectoïne a été récupérée et lyophilisée. L'extrait a été dissous dans 1 mL d'eau filtrés à travers un filtre à membrane de 0,2 µm. Un volume de 5 µL de standard interne (SI) (6-hydrox 2031HHQ-D4550) a été ajouté à chaque échantillon et ensuite analysés par HPLC (Chen, 2015; Zhang, 2009). Pour l'extraction de l'ectoïne du biofilm du réacteur 2, un support a été pris et extrait avec 2 mL de solution méthanol / chloroforme / eau (10: 5: 4) en suivant le même protocole que le culot.

#### 4.10.3. Détermination d'ectoïne

L'analyse quantitative a été développée en utilisant des échantillons de 15 µL, analysés par une HPLC couplée à un spectromètre de masse (Waters Milford MA USA). Le système HPLC Waters 2795 était équipé d'une colonne LC à phase inverse Kinetex (100 x 4,6 mm) de 2,6 µm C8 (Phenomenex City). La phase mobile était un gradient de 1% d'acide acétique dans l'eau (solvant A) et 1% d'acide acétique dans l'acétonitrile (solvant B) programmé comme suit: 2% initial de solvant B (0 à 4 min), 2 à 70% de solvant B (4–5 min), 100% solvant B (5–8 min), suivi de 3 min de rééquilibrage. Le débit HPLC était de 400 pl / min divisé à 40 pl / min par un séparateur en T Valco. Le spectromètre de masse Quattro Premier XE était équipé d'une interface Z-spray utilisant une ionisation par électro-spray en mode positif (ESI-MS / MS). Le mode de surveillance des réactions multiples (MRM) a été utilisé pour quantifier l'ectoïne. Les logiciels MassLynx et QuanLynx (Ver. 4.1) ont été utilisés. La tension capillaire a été réglée à 3,0 kV et la tension du cône à 30 V. La température de la source a été maintenue à 120 ° C. De l'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et de séchage à des débits de 15 et 100 ml / min, respectivement. En mode MRM, les transitions suivantes ont été suivies: pour l'ectoïne 143 → 98; l'étalon interne: 5,6,7,8-tétradeutéro-4-hydroxy-2-heptylquinoléine (HHQ-d4) 248 → 163; La pression du gaz de collision (argon) a été fixée à 2 × 10<sup>-3</sup> mTorr et l'énergie de collision à 30 V pour toutes les transitions. L'aire de chaque pic

chromatographique a été intégrée et la concentration d'ectoïne a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage ( $R^2 = 0,9945$ ).

L'ectoïne ((S)-b-2-méthyl-1, 4, 5, 6-tétrahydropyrimidine-4-carboxylique, pureté de 97%) a été achetée chez Sigma Aldrich (City) et utilisée pour dériver une courbe standard pour quantifier la concentration d'ectoïne produite.

#### **4.11. Évaluation de l'action antagoniste des souches JAM1 et NL23**

Plusieurs tests d'antagonisme ont été réalisés. Pour chacun des tests, trois réplicats ont été faits. Tous les tests sur plaque ont été testés sur géloses *Methylophaga* 1403 modifié (0,5% NaCl). Les géloses ont étéensemencées sur toute leur surface avec une suspension bactérienne de la souche JAM1 ou NL23 à une densité optique (D.O.<sub>600nm</sub>) de 0.5. Un volume de 200 µL de la souche JAM1 a été placé au milieu de la géloseensemencée avec la souche NL23, et vice versa. Les géloses ont été incubées à 30°C pendant une semaine en aérobiose. L'activité inhibitrice de croissance a été quantifiée en observant la présence de halos d'inhibition (test positif) autour de la colonie au milieu de la gélose.

Pour déterminer s'il existe un type quelconque d'interaction négative ou de synergie entre les souches NL23 et JAM1, la production de métabolites diffusibles dans le milieu a été évaluée à l'aide de différentes techniques.

- a. Inhibition simultanée:** Les souches NL23 et JAM1 ont été semées massivement. Ensuite, à l'aide d'une micropipette, des gouttes ont été mises radialement avec 5 µL de la souche antagoniste (NL23 ou JAM1, selon le test) sur les plaques de gélose inoculées. Les plaques ont été laissées à incuber pendant une semaine à 30°C dans des conditions oxiques.
  
- b. Diffusion en gélose:** Un mL de suspension cellulaire de la souche JAM1 ou NL23 (selon le test) a étéensemencé dans la gélose du milieu *Methylophaga* 1403 modifié sur le point de se solidifier. Ce mélange a été mis dans des plaques de Pétri et laissé refroidir pendant 20 min. Par la suite, dans chacune des géloses ont été faits 3 puits de 6 mm de diamètre sur 1 cm de hauteur, sans qu'ils touchent complètement le fond de la plaque, dans lesquels 30 µL des souches respectives ont été déversés. Enfin, les géloses ont été incubées à 30 °C pendant une semaine.

**c. Détection sensi-disque:** un étalement de la souche NL23 ou JAM1 a été effectué sur la surface complète de géloses à une  $DO_{600nm}$  de 0.5. Ensuite, des disques de papier filtre stériles de 5 mm de diamètre préalablement humidifiés avec chacune des souches utilisées comme antagonistes ont été déposés sur les géloses. Enfin, celles-ci ont été incubées à 30°C pendant une semaine.

L'activité antagoniste se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques ou des puits. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés. Un résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2 mm.

#### **4.12. Changement du niveau d'expression des gènes de dénitrification dans les co-cultures**

Des cultures pures des souches JAM1 et NL23 ont été effectuées en conditions anoxiques avec 300 mg-N / L de nitrate. A des intervalles où le nitrate et le nitrite ont été complètement réduits, un échantillon a été prélevé. Pour l'analyse de l'expression génique des souches en co-cultures biofilm, nous avons choisi trois concentrations de NaCl sur les cinq concentrations évaluées pendant le développement du biofilm dans le deuxième bioréacteur. Ces concentrations ont été 0,5 % et 2,75 % NaCl en milieu de culture 1403 modifié et le milieu de culture IO. Pour le réacteur en cultures pures de la souche NL23 dans le troisième bioréacteur, deux concentrations de NaCl (0,5% et 2%) ont été évaluées, en raison de la faible capacité de la souche à croître à des concentrations plus élevées de NaCl. Les supports obtenus de chaque concentration de NaCl et utilisés pour l'extraction de l'ARN ont été pris au moment où la réduction de nitrate était réalisée de manière active.

Les niveaux de transcription ont été mesurés par RT-qPCR, pour les gènes *napA* et *nirK* de la souche *H. nitrativorans* NL23 ainsi que pour les gènes *narG1* et *narG2* de la souche *M. nitratireducenticrescens* JAM1. Les niveaux des gènes *dnaG* et *rpoB* (spécifiques à chaque souche) ont également été mesurés par RT-qPCR et ont servi à la normalisation des niveaux des transcrits des gènes de dénitrification.

#### 4.12.1. Extraction de l'ARN total

L'extraction d'ARN du biofilm a été réalisée à partir de deux supports mis avec un volume de 2 mL de TEN (50mM Tris-HCl, 100mM EDTA 2- Na, 150mM NaCl) et 1 mL de phénol à pH 4.3, pour détacher les cellules de la surface du support. Pour la culture pure un volume de 2 ml de milieu de culture a été récolté. Les cellules ont été centrifugées à 16 000 g pendant 1 minute. Le culot des cultures pures a été dispersé dans 500 µL de TEN et centrifugé à nouveau une deuxième fois. Le culot bactérien a été remis dans 500 µL de TEN séparé dans deux tubes différents, puis 500 µL de phénol à pH 4.3 ont été ajoutés.

Le mélange a été transféré dans un tube avec un bouchon étanche contenant 200 mg de billes de verres 0,1 mm stérilisé. Les tubes ont été homogénéisés avec l'appareil «FastPrep» (MP Biomedicals, Santa Ana, États-Unis) 2 fois consécutives à -4 m/s pendant 20 secondes. Les cellules ont été centrifugées à 16 000 g par 15 minutes à 4 °C, pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube contenant 500 µL d'un mélange phénol à pH 4.3/chloroforme/ isoamyl-alcool (24 :24 :1), vortexé 10 secondes et recentrifugé à 16 000 g pendant 1 minute à 4 °C. Cette étape a été répétée deux autres fois, puis le surnageant a été transféré dans un nouveau tube contenant 500 µL de chloroforme/isoamyl-alcool (24 :1), vortexé 10 secondes et centrifugé à 16 000 g, 1 minute à 4 °C. Le surnageant (environ 400 µL) a été transféré dans un nouveau tube et puis 80 µL d'acétate d'ammonium 10M et 800 µL d'éthanol 95% y ont été ajoutés. Le mélange a été vortexé 15 secondes puis laissé à précipiter 16 heures à -20 °C ou pendant une nuit. Le mélange a été centrifugé à 16 000 g pendant 1 heure à 4 °C. Le surnageant a été retiré et le culot a été laissé à sécher sous une flamme pendant 20 minutes. Le culot a été dispersé dans l'eau contenant la turbo DNase. Pour suspendre le culot dans 50 µL d'eau, 43 µL d'eau ont été mélangés à 5 µL de tampon DNase 10X et 2 µL de Turbo DNase. La suspension a été incubée à 30 °C pendant 30 minutes ; après 5 µL de la suspension d'inactivation de la DNase ont été ajoutés. Le mélange a été laissé à reposer pendant 5 minutes à température pièce. Il a été centrifugé à 16 000 g pendant 1 minute, et la solution d'ARN a été transférée dans un nouveau tube et conservé à -20 °C. La présence d'ADN dans les échantillons d'ARN a été évaluée en réalisant une PCR avec une des paires d'amorces du Tableau 4.5.

#### 4.12.2. Quantification de l'expression des gènes par RT-qPCR

L'ADN complémentaire des extraits d'ARN a été généré en utilisant des amorces hexamériques et le Reverse Transcription System de Promega (Madison, WI, USA) avec 1 µg d'ARN. Les essais de qPCR ont été réalisés avec le Faststart SYBR Green Master (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) selon les instructions du fabricant. Toutes les réactions ont été réalisées dans l'appareil Rotor-Gene 6000 avec les amorces décrites aux Tableaux 4.5 et 4.6. La PCR a débuté par une étape de dénaturation de 10 min à 95 °C suivie de 40 cycles de 10 sec à 95 °C, de 15 sec à la température d'hybridation (Tableaux 4.5 et 4.6) et de 30 sec à 72 °C. Pour confirmer la pureté des produits amplifiés, une courbe de dissociation a été effectuée en augmentant la température de 65 à 95 °C par incréments de 1 °C par étape avec une pause de 5 sec pour chaque étape. Les gènes de référence utilisés étaient : *dnaG* (primase) et *rpoB* (sous-unité β de l'ARN polymérase) de chaque espèce (Tableaux 4.5 et 4.6). Leurs séquences ont été déduites du génome des souches JAM1 et NL23.

L'efficacité d'amplification a été testée pour chaque ensemble de paires d'amorces par qPCR en utilisant une dilution de l'ADN génomique des souches JAM1 et NL23 comme matrice. Les gains d'efficacité d'amplification pour toutes les paires d'amorces se situaient entre 0,9 et 1,1. Le nombre de copies de chaque gène a été calculé selon des courbes standards en utilisant des dilutions de l'ADN génomique des souches respectives. Les résultats ont été exprimés en nombre de transcrits des gènes cibles et normaliser selon le nombre de transcrits des *dnaG* et *rpoB* dans les échantillons pris à différentes phases de croissance. Ces gènes de références ont été choisis dans des études précédentes dans le laboratoire du Prof. Villemur comme étant les plus stables dans l'expression durant les différentes phases de croissance des souches. L'extraction d'ARN et le RT-qPCR ont été réalisées en trois répétitions indépendantes. La signification des niveaux d'expression entre les co-cultures et les cultures pures a été testée par ANOVA avec un test post-test Tukey pour effectuer la comparaison multiple entre les souches en co-cultures et un test de Student pour les souches pures.

Nom	Séquence 5' – 3'	Température d'hybridation (°C)	Longueur de l'amplicon (pb)
napA-NL23f (NL23) <sup>1</sup>	GGCAATGTGGGTGGAAAAGG	55	130
napA- NL23r(NL23) <sup>1</sup>	GCGCTTCGAAAACCTCCATGA		
nirK-NL23f (NL23) <sup>1</sup>	CGCACAAACATCGACTTCCA	55	130
nirK-NL23r (NL23) <sup>1</sup>	GCGCAGTGATAGACGAAAAC		
dnaG-NL23f (NL23) <sup>1</sup>	CCCGATCAAAAACGCCAAGTA	55	141
dnaG-NL23r (NL23) <sup>1</sup>	CGCATCCATGTAGCCTTCGA		
rpoB-NL23f (NL23) <sup>1</sup>	GCCATCAACAAGCAGTACGA	55	128
rpoB-NL23r (NL23) <sup>1</sup>	GCCACGAAGACCTTGACCAT		

Source <sup>1</sup> : Martineau et al., 2015

**Tableau 4.5 Paires d'amorces spécifiques utilisées pour *Hyphomicrobium nitratorans* NL23 par RT-qPCR**

Nom	Séquence 5' – 3'	Température d'hybridation (°C)	Longueur de l'amplicon (pb)
narG1 (276F) <sup>2</sup>	GCTTCCGCATTTCAACCTG	60	157
narG1 (433R) <sup>2</sup>	ATTACCGCCACCCAGTTT		
narG2 (597F) <sup>2</sup>	TTACGCTGCAGGATCACGTT	60	126
narG2 (723R) <sup>2</sup>	TGACTCGGGTACATCGGTCT		
nosZ (826F) <sup>2</sup>	GAGCGTGAAGGGTAGTCGT	60	126
nosZ (952R) <sup>2</sup>	GTGTCAACTCGCTCCCTTTG		
dnaG (774F) <sup>2</sup>	CATCCTGATCGTGGAAGGTT	60	120
dnaG (894R) <sup>2</sup>	GCTGCGAATCAACTGACGTA		
rpob (3861F) <sup>2</sup>	TGAGATGGAGGTTTGGGCAC	60	145
rpob (4006R) <sup>2</sup>	GCATACCTGCATCCATCCGA		

Source <sup>2</sup> : Mauffrey et al., 2015

**Tableau 4.6 Paires d'amorces spécifiques utilisées pour *Methylophaga nitratreducens* JAM1 par RT-qPCR**

## 5. RÉSULTATS

Les résultats présentés dans cette thèse font partie d'un article publié dans :

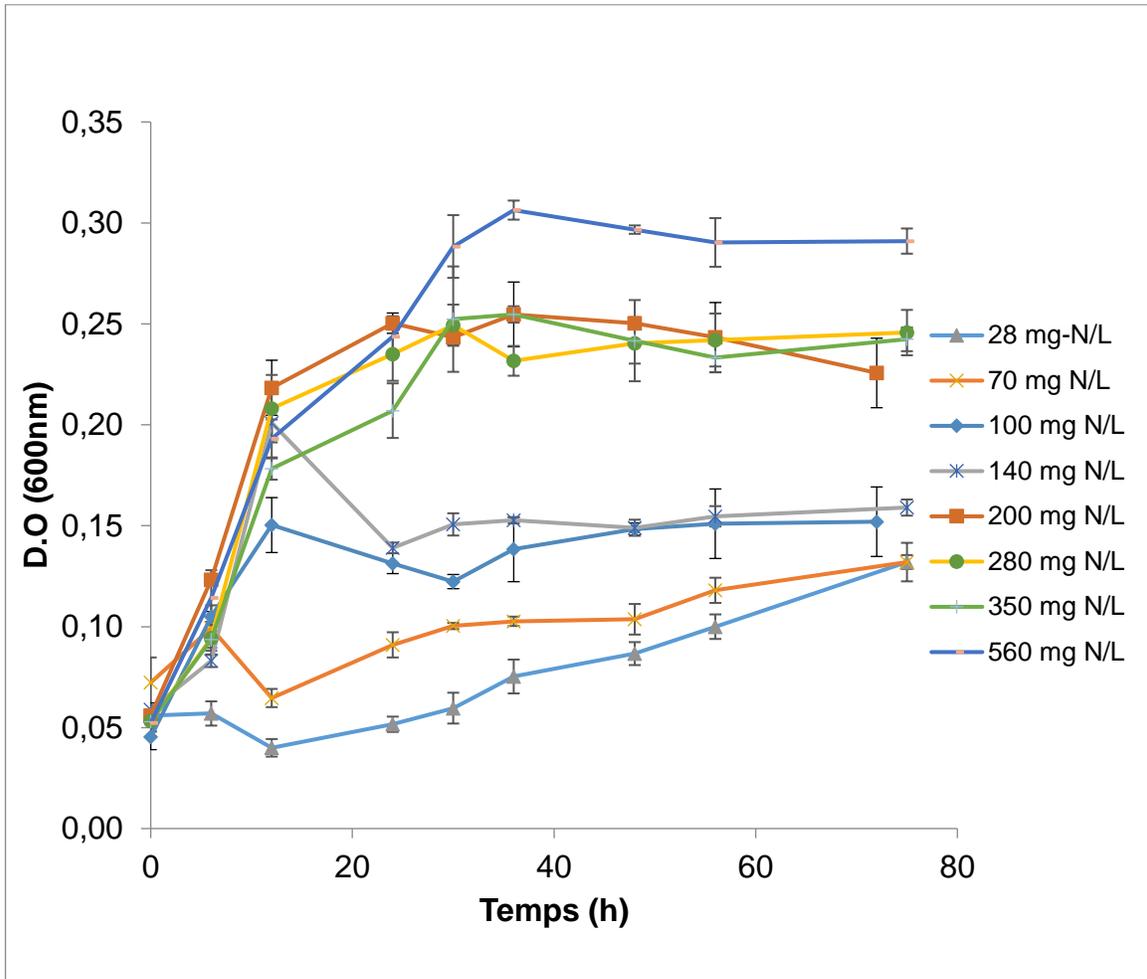
Cucaita A, Piochon M, Villemur R. 2021. Co-culturing *Hyphomicrobium nitratorans* strain NL23 and *Methylophaga nitratireducenticrescens* strain JAM1 allows sustainable denitrifying activities under marine conditions. *PeerJ* 9: e12424

### **Objectif 1 : Comparer la dynamique de croissance des souches JAM1 et NL23 en présence du nitrate**

#### **5.1. Affinité du nitrate par les souches JAM1 et NL23**

La dynamique de la consommation de nitrate par les deux souches a été comparée avec l'objectif d'estimer s'il pouvait y avoir une compétition entre les deux souches qui génèrerait un avantage de croissance de l'un par rapport à l'autre. Des cultures planctoniques pures de la souche JAM1 et de la souche NL23 ont été réalisées avec différentes concentrations de nitrate pour dériver leurs taux de croissance maximaux respectifs ( $\mu_{max}$ ) et les constantes de demi-saturation de la concentration de nitrate pour la croissance. Les souches JAM1 et NL23 ont été cultivées à 30°C, en conditions anoxiques, avec le nitrate à différentes concentrations initiales de 28, 70, 140, 280, 350 et 560 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / L.

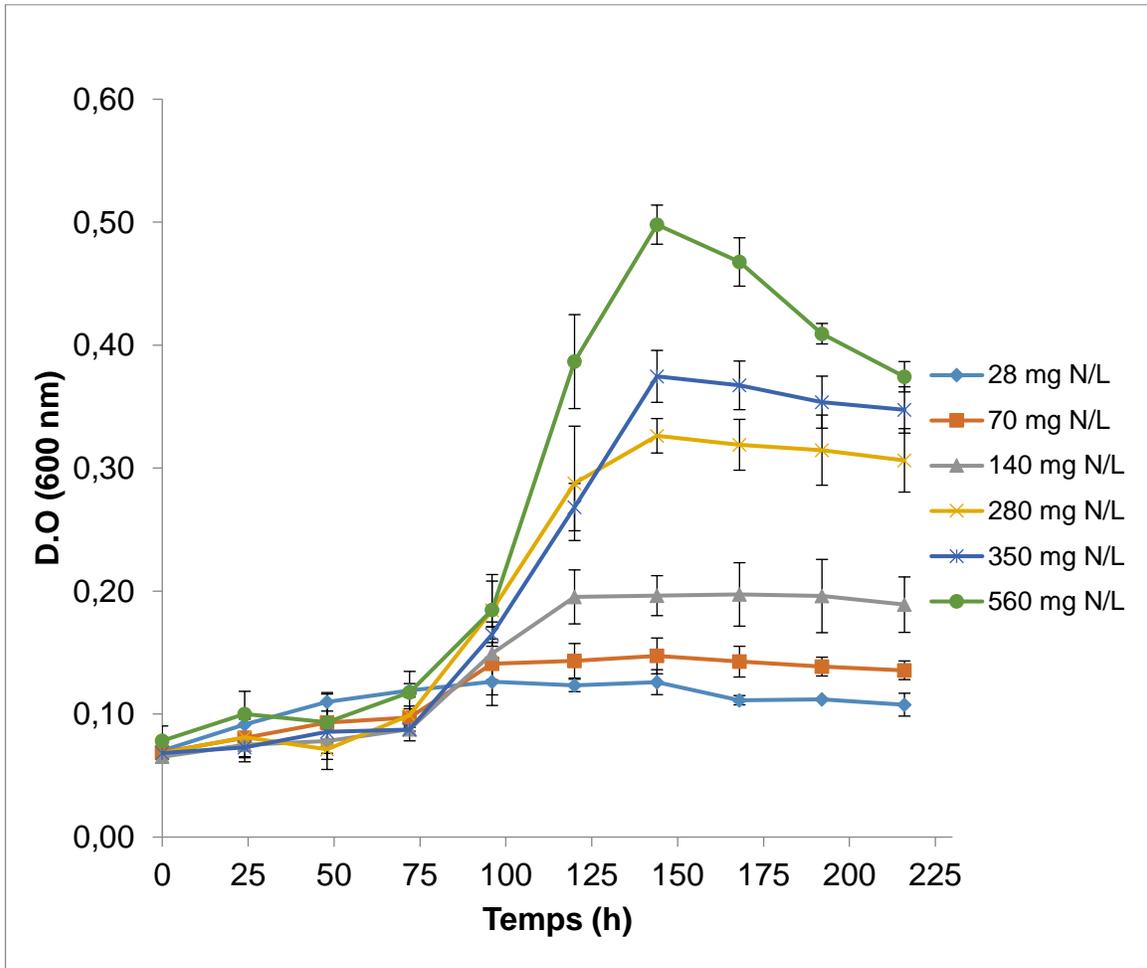
### 5.1.1. Croissance de la souche JAM1



**Figure 5.1 Cinétique de croissance de la souche JAM1 à différentes concentrations initiales de nitrate (28, 70, 100, 140, 200, 280, 350, et 560 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / L respectivement).** La souche a été cultivée dans le milieu Methylophaga 1403, en conditions anoxiques à 30°C. Le suivi a été réalisé pendant 72 h et la croissance a été déterminée par spectrophotométrie à une densité optique (600 nm). Données issues de triplicata de cultures.

La cinétique de croissance de la souche JAM1 (Fig. 5.1) à différentes concentrations de nitrate a permis d'établir que la croissance atteinte par celle-ci augmente avec l'augmentation de la concentration de nitrate. Cette croissance est maximale à une DO<sub>600nm</sub> entre 0.25 et 0.30 à partir 200 mg de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / L.

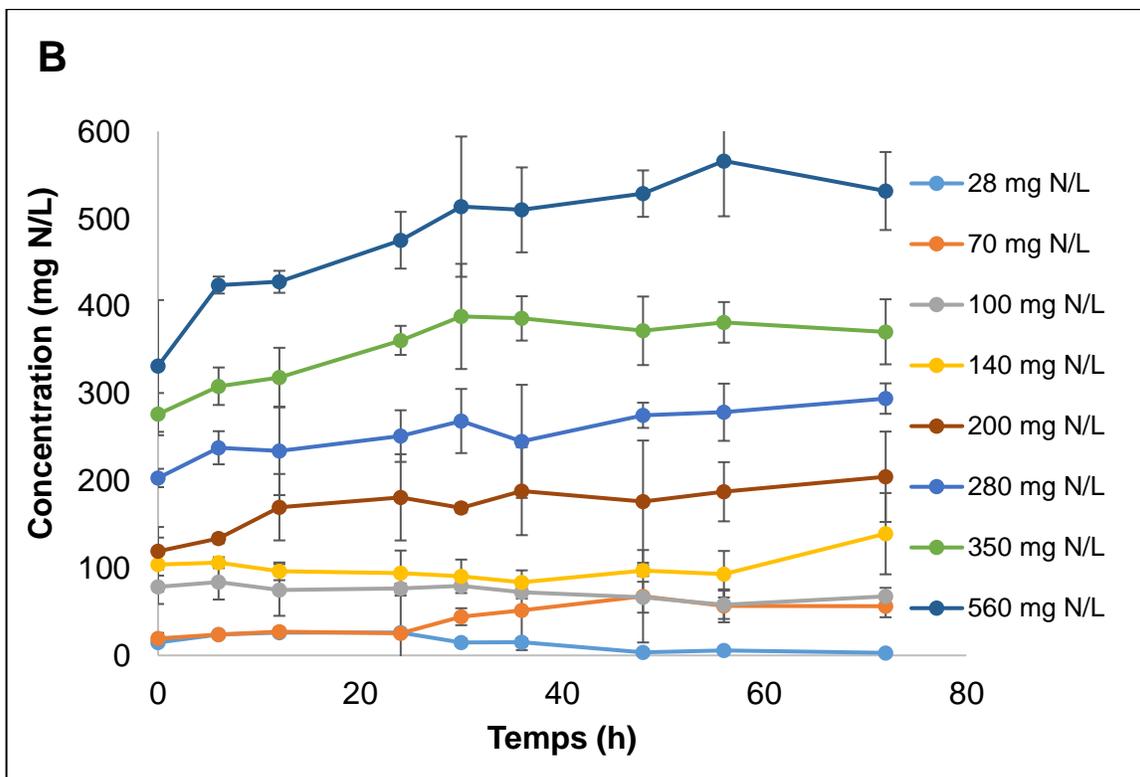
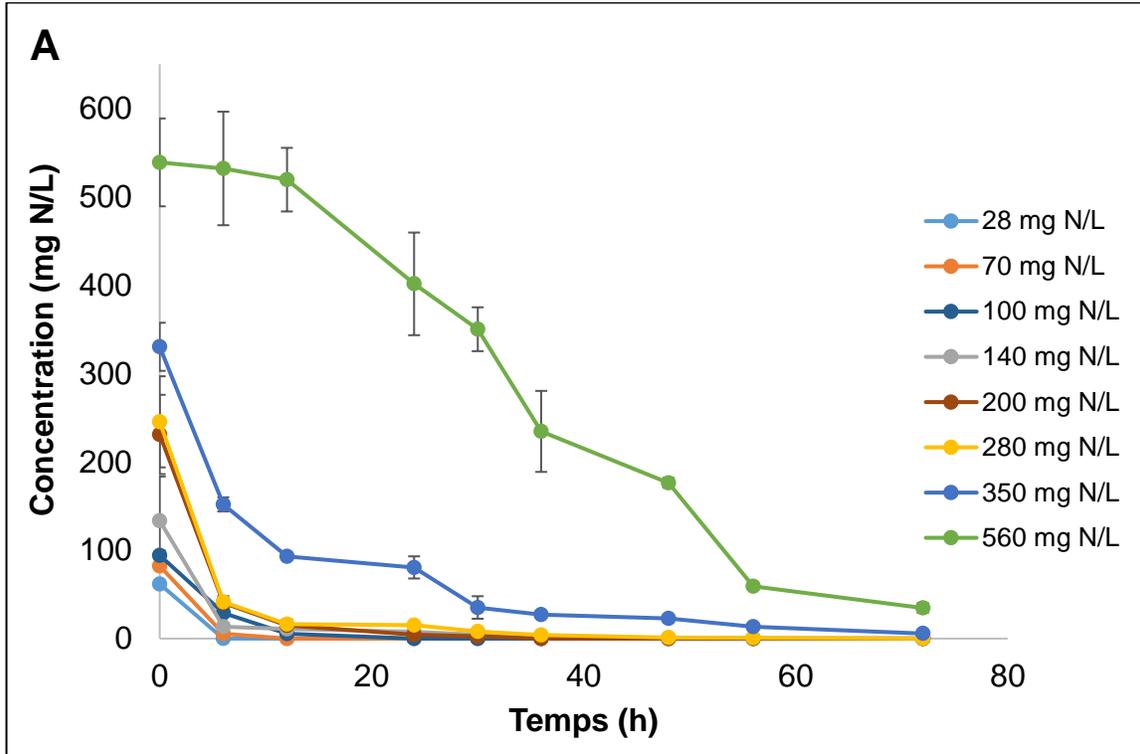
### 5.1.2. Croissance de la souche NL23

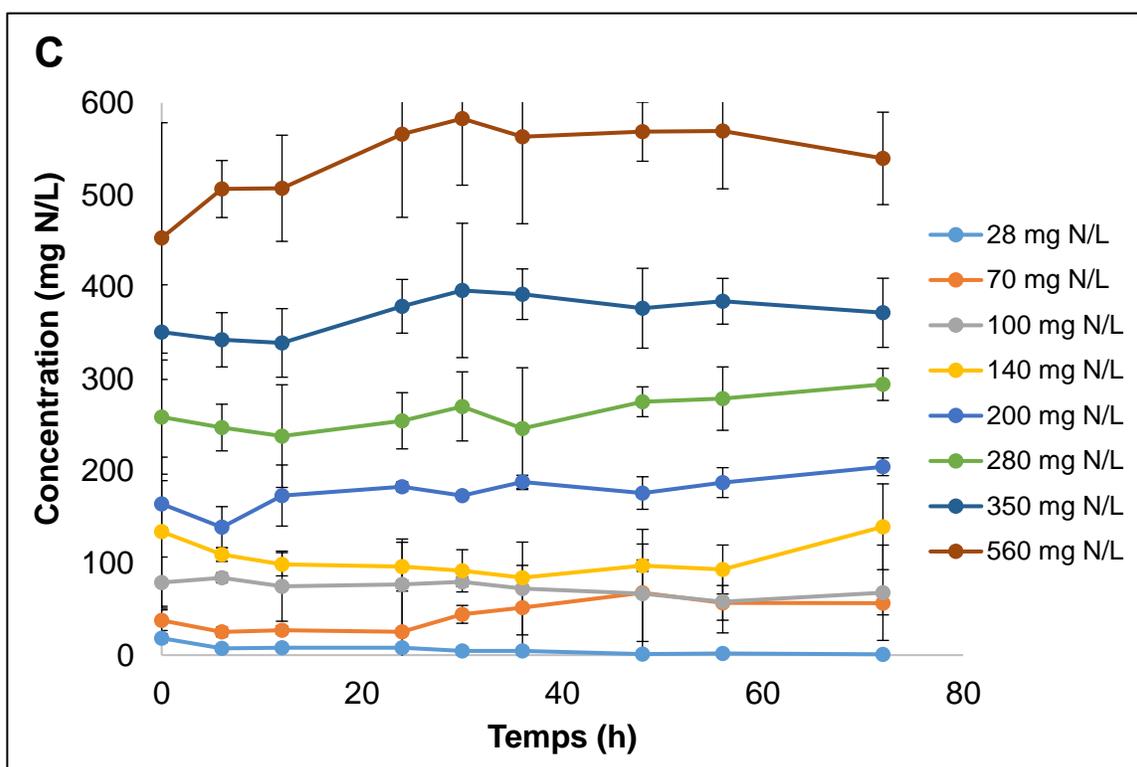


**Figure 5.2 Croissance de la souche NL23 à différentes concentrations initiales de nitrate (28, 70, 140, 280, 350, et 560 mg NO<sub>3</sub>-N / L respectivement).** La souche a été cultivée dans le milieu 337a, en conditions anoxiques à 30°C Le suivi a été réalisé pendant 216 h et la croissance a été déterminée par spectrophotométrie à une densité optique (600 nm) Données issues de triplicata de cultures.

Dans le cas de la souche NL23 (Fig. 5.2), la tendance de croissance était similaire à l'atteinte par la souche JAM1, à mesure que la concentration de nitrate initiale augmente, la croissance augmente. La croissance a été maximale avec une concentration de nitrate initiale de 560 mg de NO<sub>3</sub>-N/L. Il a été observé que quelle que soit la concentration en nitrate, la souche NL23 a nécessité un temps supérieur à 72 heures pour démarrer une phase exponentielle. On peut remarquer que les croissances maximales atteintes pour la souche NL23 sont plus élevées que celles obtenues pour la souche JAM1.

### 5.1.3. Réduction du nitrate et du nitrite par la souche JAM1



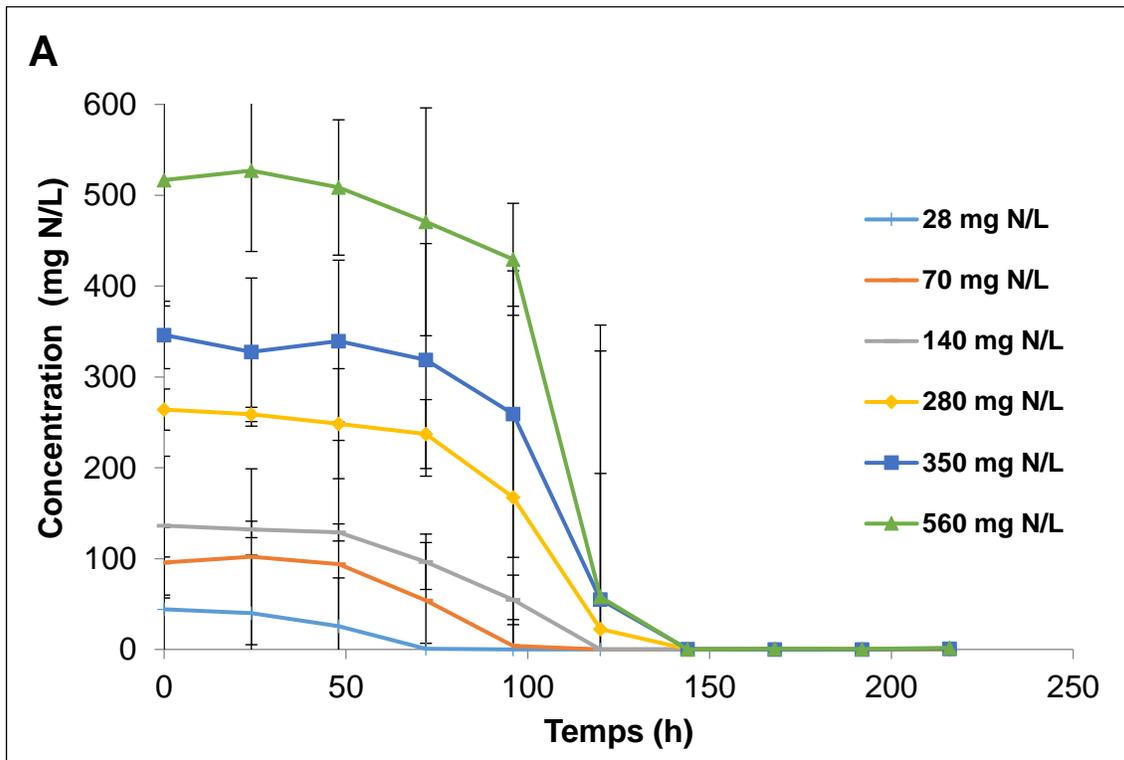


**Figure 5.3 Réduction du nitrate (A), du nitrite (B) et de l'azote total (Nox)(C) réalisée par la souche JAM1 à différentes concentrations initiales du nitrate (28, 70, 100, 140, 200, 280, 350, et 560 mg  $\text{NO}_3^- \text{N} / \text{L}$  respectivement).** La souche a été cultivée dans le milieu Methylophaga 1403, en conditions anoxiques à 30°C Le suivi a été réalisé pendant 72 h et la détermination du nitrate et du nitrite a été déterminée par chromatographie ionique (CI). Données issues de triplicata de cultures.

La souche JAM1 a été capable de réduire toutes les concentrations initiales de nitrate testées. À des concentrations inférieures à 350 mg  $\text{NO}_3^- \text{N} / \text{L}$ , la réduction du nitrate a débuté dans les 6 premières heures. Le nitrate a été réduit complètement par la souche dans une période de temps entre 24 et 36 heures à des concentrations inférieures 280 mg  $\text{NO}_3^- \text{N} / \text{L}$  et à concentrations supérieures une réduction plus lente du substrat a été observée. La figure 5.3 illustrant la réduction du nitrate à des concentrations de 28, 70, 100, 140, 200, 280, 350, et 560 mg  $\text{NO}_3^- \text{N} / \text{L}$ , nous permet d'observer la relation entre la concentration du nitrate et celle du nitrite en fonction du temps. Tandis que la concentration en nitrate diminue, une production de nitrite est accumulée en concentrations équivalentes, avec une réduction de nitrate totale. La production maximale du nitrite résultant de chacune des concentrations évaluées a été de (26, 68,84, 139, 204, 294, 388, 566 mg  $\text{NO}_2^- \text{N/L}$  respectivement). À des concentrations du nitrate de 350 et

560 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / L une plus grande accumulation du nitrite dans le milieu de culture a été observée. Il a été possible de trouver des résultats de 0 mg de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / L dans des expériences avec une faible concentration (< 280 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / L), ou avec une concentration inférieure à la concentration initiale ajoutée pendant la réduction de nitrate chez la souche JAM1, à cause d'une rapide assimilation du substrat, faisant que le nitrate soit presque immédiatement réduit dans le milieu de culture.

#### 5.1.4. Réduction du nitrate et nitrite par la souche NL23



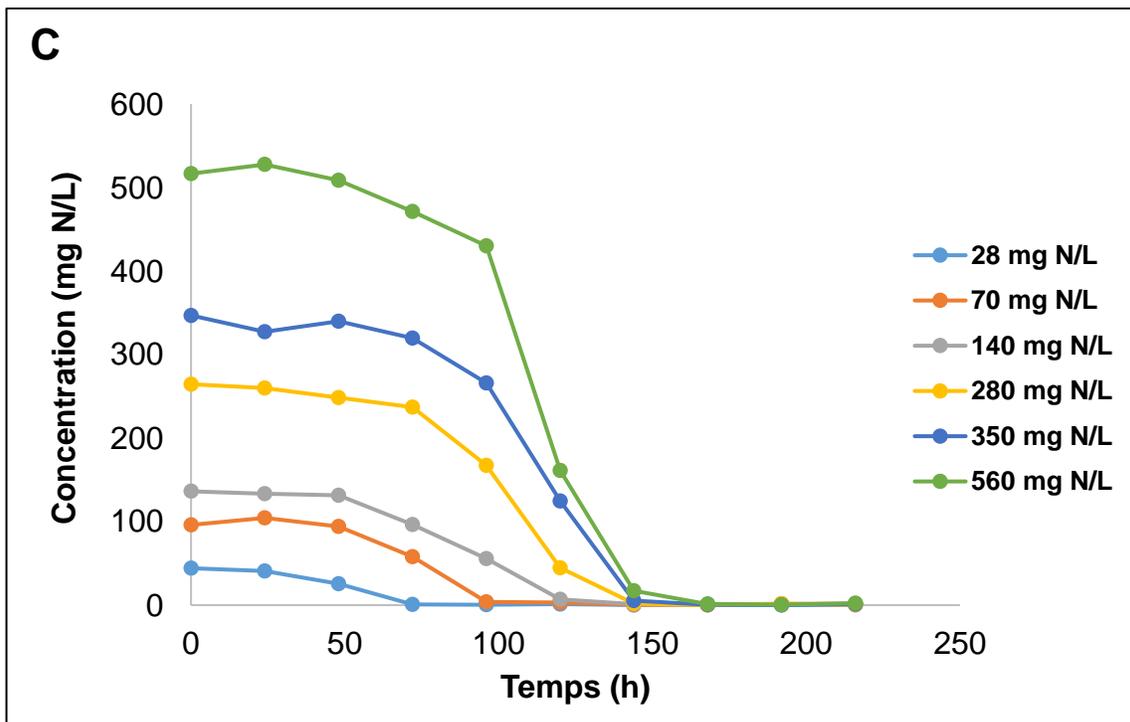
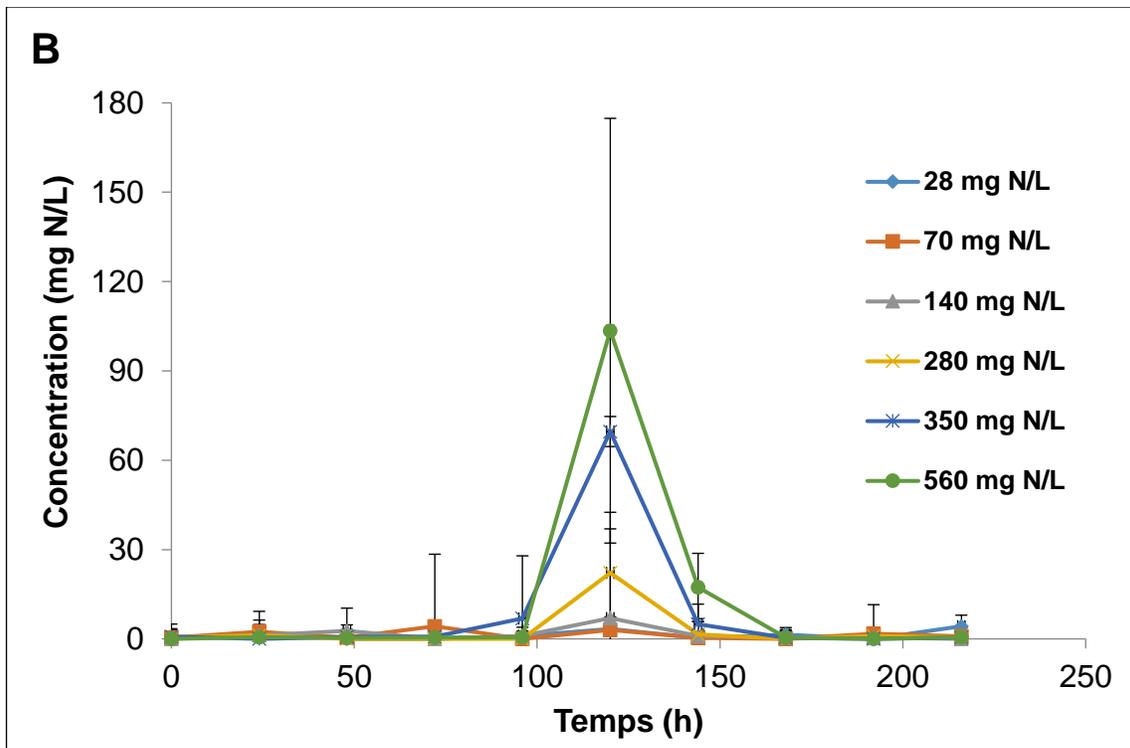
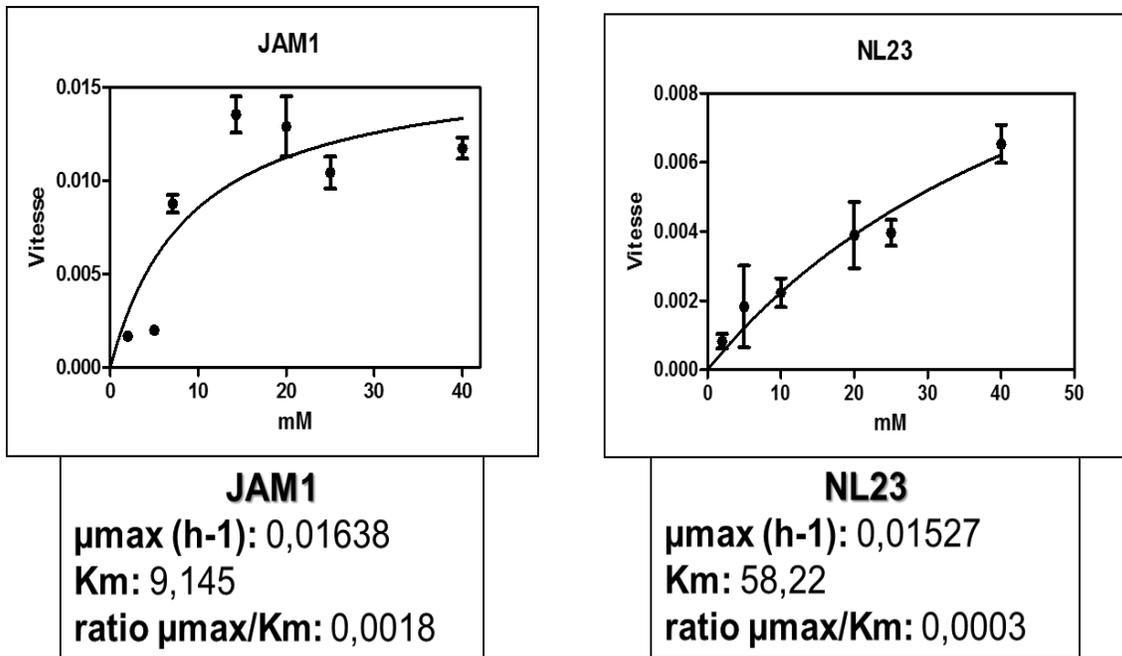


Figure 5.4 Réduction de nitrate (A), nitrite (B) et de l'azote total (Nox) (C) réalisée par la souche NL23 à différentes concentrations initiales de nitrate (28, 70, 140, 280, 350 et 560 mg  $\text{NO}_3\text{-N}$  / L). La souche a été cultivée en milieu 337a. en conditions anoxiques à 30°C. Le suivi a été réalisé pendant 216 h et la détermination du nitrate et du nitrite a été déterminée par Cl. Données issues de triplicata de cultures.

La cinétique de dénitrification pour la souche NL23 (Fig. 5.4) a permis d'observer une réduction complète du nitrate dans toutes les concentrations évaluées pour cette souche. On voit un temps de latence d'environ 72 heures dans le début de la réduction du nitrate similaire à celui trouvé pendant la croissance pour cette souche. En ce qui concerne la production de nitrite, il a été observé que l'augmentation des concentrations initiales de nitrate ont entraîné des concentrations transitoires plus élevées de nitrite. Nous avons pu observer le comportement d'accumulation de nitrite entre le temps 96 et 144 h, avec des pics supérieurs à 100 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N / L à une concentration de 560 mg N / L de nitrate suivi d'une réduction complète.

#### **5.1.5. Vitesse de croissance des souches JAM1 et NL23**

Les résultats obtenus sur les profils de croissance et de réduction du nitrate nous ont permis d'établir une relation entre la vitesse de croissance ( $\mu$ ) de chacune des souches en fonction de la concentration de substrat (S). Cette cinétique a permis de calculer la vitesse de croissance maximale ( $\mu_{max}$ ) et la constante de demi saturation en fonction de la concentration du nitrate pour cette croissance ( $K_m$ ). Ainsi, les deux souches ont un  $\mu_{max}$  similaire (Fig. 5.5). Par contre leur  $K_m$  est largement différent avec  $K_m$  de 9,14 mM pour la souche JAM1 et 58,22 mM pour la souche NL23 soit une différence de plus de 6 fois. Ces résultats suggèrent que la souche JAM1 a une affinité plus grande au nitrate et donc lui permet d'utiliser ce substrat beaucoup plus rapidement que la souche NL23.



**Figure 5.5** Vitesse de croissance des souches NL23 et JAM1 selon la concentration initiale de nitrate en conditions anoxiques. Données issues de triplicatas.

Les données obtenues de cette analyse ont démontré que la mesure de l'efficacité catalytique (ratio  $\mu_{\max}/K_m$ ) de la souche JAM1 est plus grande (6,3 fois) que dans la souche NL23. Cela signifie qu'à une concentration de substrat plus faible la souche JAM1 a un avantage sur la souche NL23.

## Objectif 2: Détecter la production d'antagonisme entre les souches JAM1 et NL23

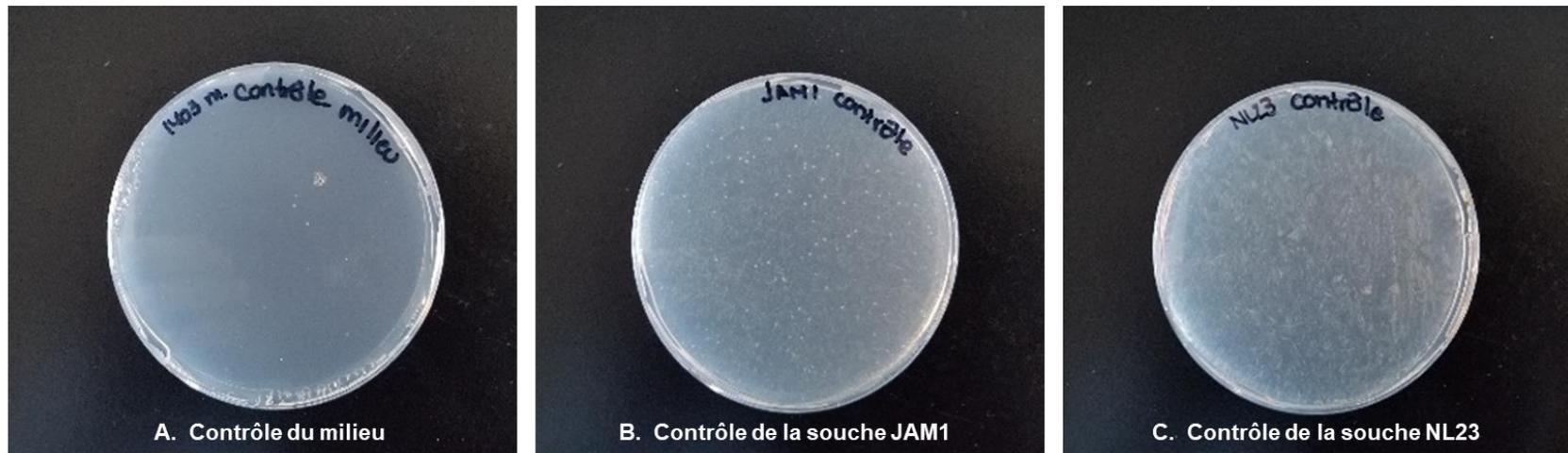
Pour évaluer s'il existe une relation entre les deux souches *M. nitratireducentescens* JAM1 et *H. nitrativorans* NL23 dans laquelle une d'entre elles a des effets délétères ou négatifs sur l'autre, des tests d'antagonisme ont été réalisés sur la gélose du milieu de culture Methylophaga 1403 (0,5% NaCl).

### 5.2. Évaluation de l'action antagoniste

Le milieu Methylophaga 1403 (0,5% NaCl) a été établi comme milieu de culture pour la croissance des deux souches sur un même milieu. En effet, la croissance de la souche NL23 est inhibée avec un milieu salin. Cependant, à cette concentration de NaCl et dans ce milieu de culture (voir section 5.3), sa croissance est adéquate.

La production de métabolites diffusibles a été évaluée par trois méthodes : l'inhibition simultanée, la diffusion en gélose et la détection en sensi-disques. Un contrôle de milieu de culture et un contrôle de la croissance des souches JAM1 et NL23 ont été réalisés afin d'évaluer sa capacité à former des colonies sur le milieu solide *Methylophaga* 1403 (0,5% NaCl) et ainsi pouvoir comparer les résultats des méthodes utilisées (Fig 5.6).

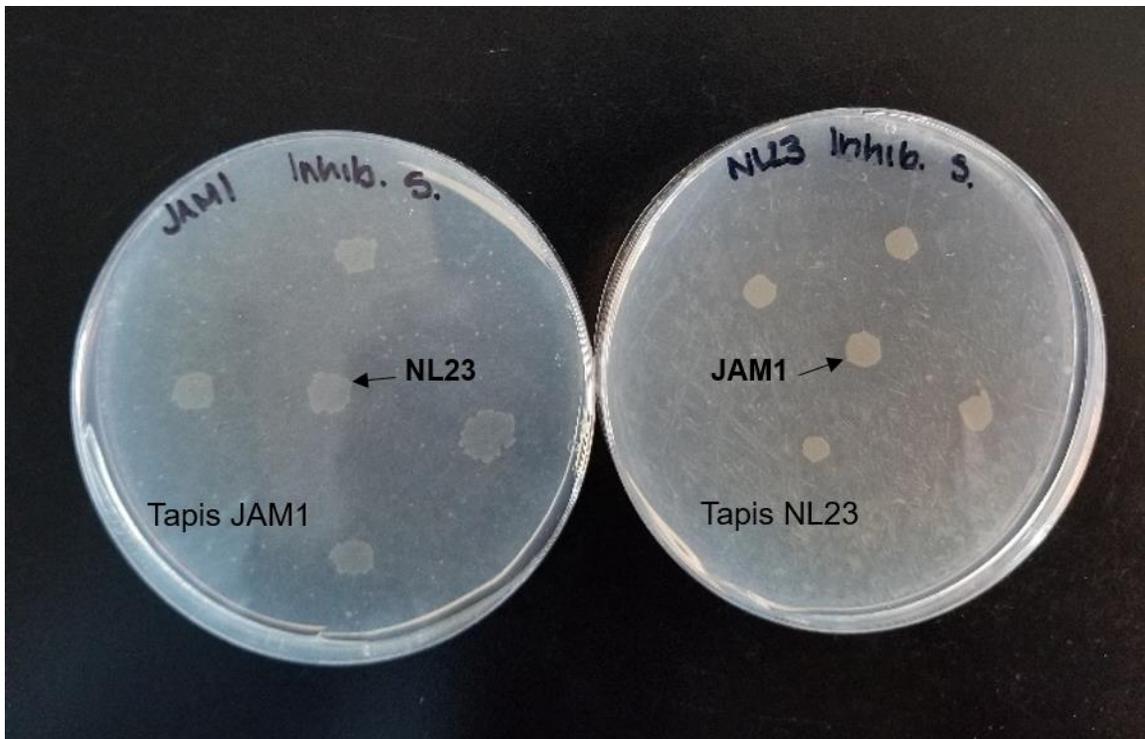
Une croissance homogène des souches NL23 et JAM1 a été observée sur le milieu de culture 1403 (0,5% NaCl). La souche JAM1 a formée de petites colonies beiges et lisses d'un diamètre inférieur à celui observé quand elle pousse dans le milieu *Methylophaga* 1403 non modifié (2,4% NaCl) de 2-3 mm (Villeneuve et al., 2013). Les colonies sur le milieu modifié ont montré un diamètre de 1–2 mm. La souche NL23 a formée de petites colonies crémeuses, circulaires de moins de 1 mm. Elles avaient une couleur blanche à beige claire, similaires à celles vues au milieu 337a (Martineau et al., 2013).



**Figure 5.6 Contrôle de croissance de chacune des souches sur le milieu 1403 modifié (0,5% NaCl).** Des géloses sans inoculum (A) et inoculées avec une culture pure des souches JAM1 (B) ou NL23 (C) ont été utilisées. Les milieux ont été incubés à une température de 30°C pendant une semaine en conditions oxygènes.

### 5.2.1. Inhibition simultanée :

Les résultats observés sur la figure 5.7 montrent que la boîte dans laquelle le tapis a étéensemencé avec la souche JAM1 et sur lequel 5 µl de l'inoculum de la souche NL23 a été placé n'a pas présenté de halos d'inhibition du tapis de croissance de la souche JAM1. De plus, la souche NL23 a pu croître sur ce tapis. L'inverse a été également observé (Fig. 5.7; souches JAM1 sur le tapis de la souche NL23). Ces résultats indiquent qu'aucune des deux souches JAM1 ou NL23 a la capacité de produire des substances qui puissent inhiber la croissance de l'autre souche dans les conditions testées.



**Figure 5.7 Test d'inhibition simultanée entre les souches JAM1 et NL23.** À gauche, on observe la croissance du tapis de la souche JAM1 et sur celle-ci l'inoculum de la souche NL23 placé en gouttes de 5 µl. À droite, le tapis de la souche NL23 sur laquelle la souche JAM1 a été inoculée. Les inoculums des souches ont été évalués à une D.O de 0,5 sur le milieu 1403 (0,5% NaCl) et incubées à une température de 30°C pendant une semaine en conditions oxygènes.

### 5.2.2. Diffusion en gélose :

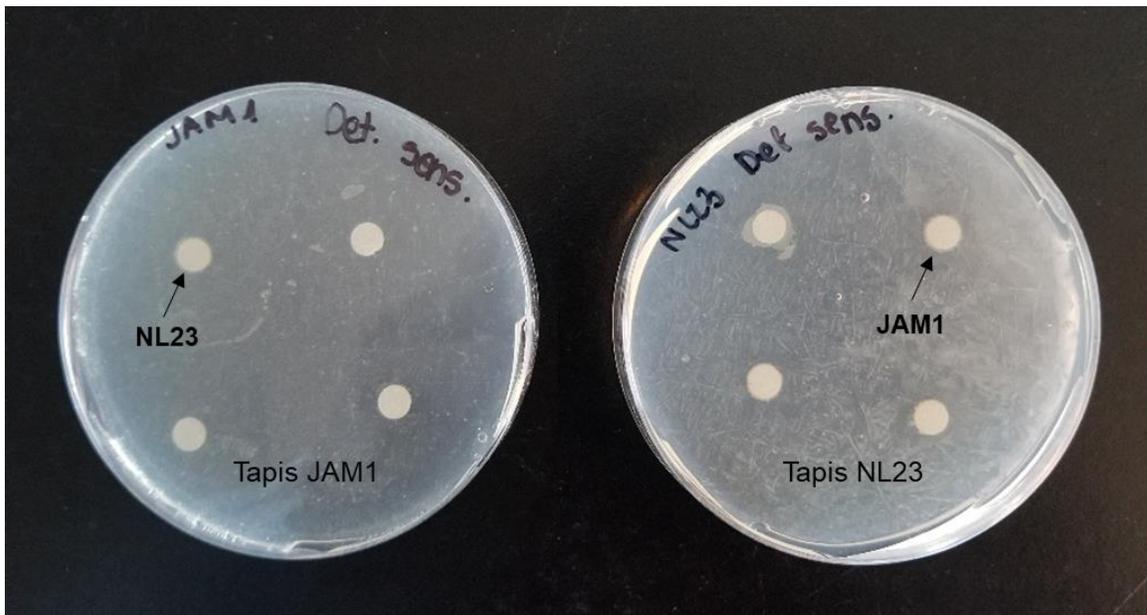
Des géloses avec le milieu Methylophaga 1403 0,5% NaCl ont été réalisées et auxquels des puits ont été effectués. Des tapis bactériens ont été réalisés avec la souche NL23 ou la souche JAM1, et les puits ont été remplis avec 30 µl de la souche qui devait produire le composant inhibiteur. La figure 5.8 montre qu'il n'y a pas de zones d'inhibition de la croissance du tapis de la souche JAM1 autour des puits inoculés par la souche NL23. Au contraire, une croissance de la souche NL23 autour de ces puits a été observée. L'inverse a été observé. Ces résultats indiqueraient à nouveau qu'aucune des deux souches est capable de produire des substances diffusibles inhibitrices de croissance.



**Figure 5.8 Test de diffusion sur gélose.** À gauche, on observe la croissance du tapis de la souche JAM1 et dans la gélose en puits, l'inoculum de la souche NL23. À droite, le tapis de la souche NL23 dans laquelle la souche JAM1 a été inoculée. Les inoculums des souches ont été évalués à une D.O de 0,5 sur le milieu 1403 (0,5% NaCl) et incubées à une température de 30°C pendant une semaine en conditions oxygènes.

### 5.2.3. Détection en sensi-disque :

La technique de détection en sensi-disque a permis de montrer une croissance uniforme des souches NL23 ou JAM1 sur la gélose en forme de tapis, ainsi que sur les disques imbibés de la solution bactérienne à une D.O de 0,5 (soit des souches JAM1 ou NL23). Elles ont pu croître de la même manière qu'avec les deux techniques précédemment utilisées. Aucun halo d'inhibition ou de croissance anormale autour des disques sur la gélose n'a pas été observé (Fig. 5.9).



**Figure 5.9 Détection dans les sensi-disques.** À gauche, on observe la croissance en tapis de la souche JAM1 et sur celle-ci en disques imbibés de l'inoculum de la souche NL23. À droite, le tapis de la souche NL23 sur laquelle la souche JAM1 a été placée. Les inoculums des souches ont été évalués à une D.O de 0,5 sur le milieu 1403 (0,5% NaCl) et incubées à une température de 30°C pendant une semaine en conditions oxiques.

En général, les différentes techniques utilisées dans l'évaluation de l'action antagoniste des souches JAM1 et NL23 l'une sur l'autre ont montré qu'il n'y a pas une relation biologique négative entre elles, qu'elles sont capables de croître ensemble sans affecter le développement de l'autre dans le milieu de culture *Methylophaga* 1403 modifié.

### 5.3. Quorum sensing

Afin de démontrer l'existence d'une communication entre les deux souches lors du développement du biofilm sur les supports, les surnageants des cultures des souches JAM1 et NL23 ont été examinés pour évaluer la production de phéromones diffusibles, les acyl-homosérine lactones (acyl-HSL), qui pourraient être sécrétés lors de la synergie du biofilm et qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. La détection de la production de HSL a été réalisée à l'aide de souches indicatrices *Chromobacterium violaceum*. Deux souches ont été utilisées. La souche CV026 de *C. violaceum* qui est un mutant Tn5 déficient dans la production de violacéine, un pigment violet. La production de violacéine est rétablie lorsque CV026 est incubé en présence d'un surnageant de culture contenant des acyl-HSL de chaîne court d'acides gras (contenant entre 4 et 8 C). La deuxième souche (VIR24) de *C. violaceum* répond aux acyl-HSL de chaîne longue d'acides gras qui content entre 8 et 14 C (McClellan et al., 1997).

Les résultats obtenus pour cette analyse ont montré qu'aucune des deux souches n'a pas été capable de produire de la vioacéine. Ces résultats suggèrent que les souches NL23 et JAM1 ne produisent pas d'acyl-homosérine lactones (acyl-HSL), soit à chaîne courte, soit à chaîne longue.

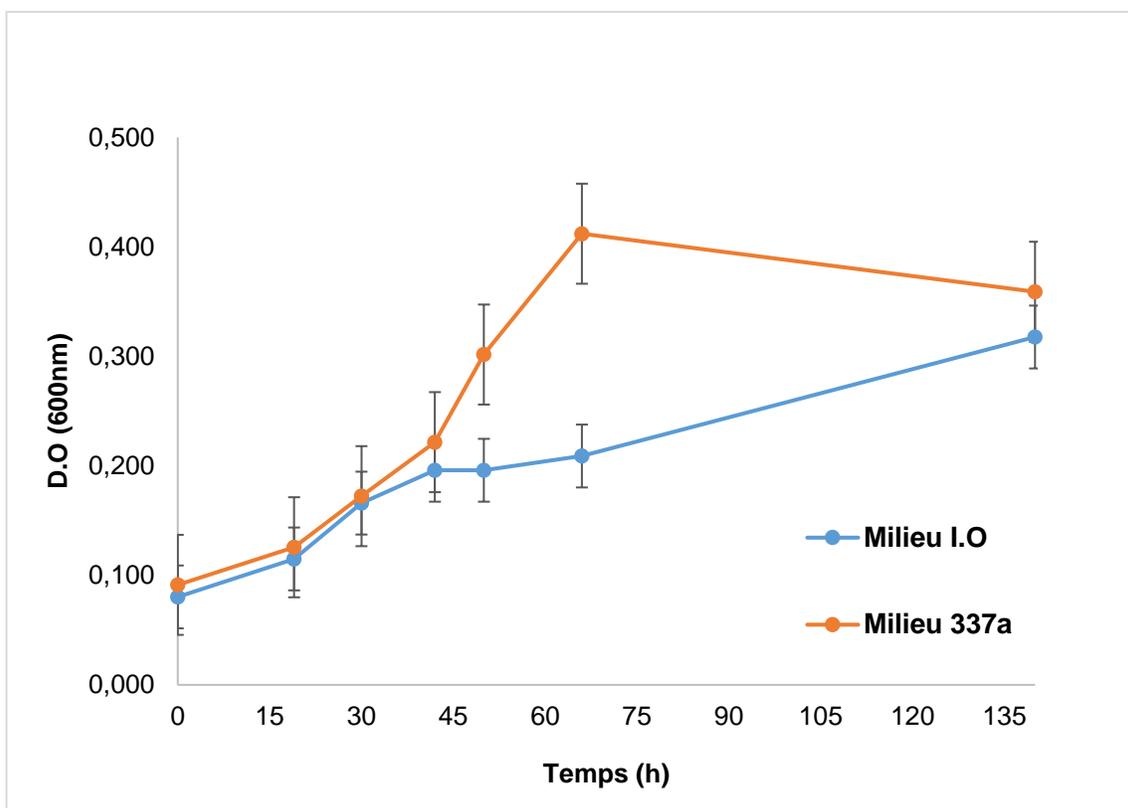
### **Objectif 3 : Déterminer l'impact des co-cultures planctoniques des souches JAM1 et NL23 sur la croissance respective des souches et le taux de dénitrification**

### **5.4. Évaluation de la concentration de NaCl sur la croissance de la souche JAM1 et la souche NL23**

Des analyses préliminaires de la croissance en état planctonique avec les milieux de culture IO (eau de mer commerciale artificielle), *Methylophaga* 1403 et le milieu 337a ont été effectuées pour établir un milieu de culture optimal qui permettrait la croissance des deux souches en co-cultures.

#### 5.4.1. Croissance de la souche NL23 dans le milieu Instant Océan (IO)

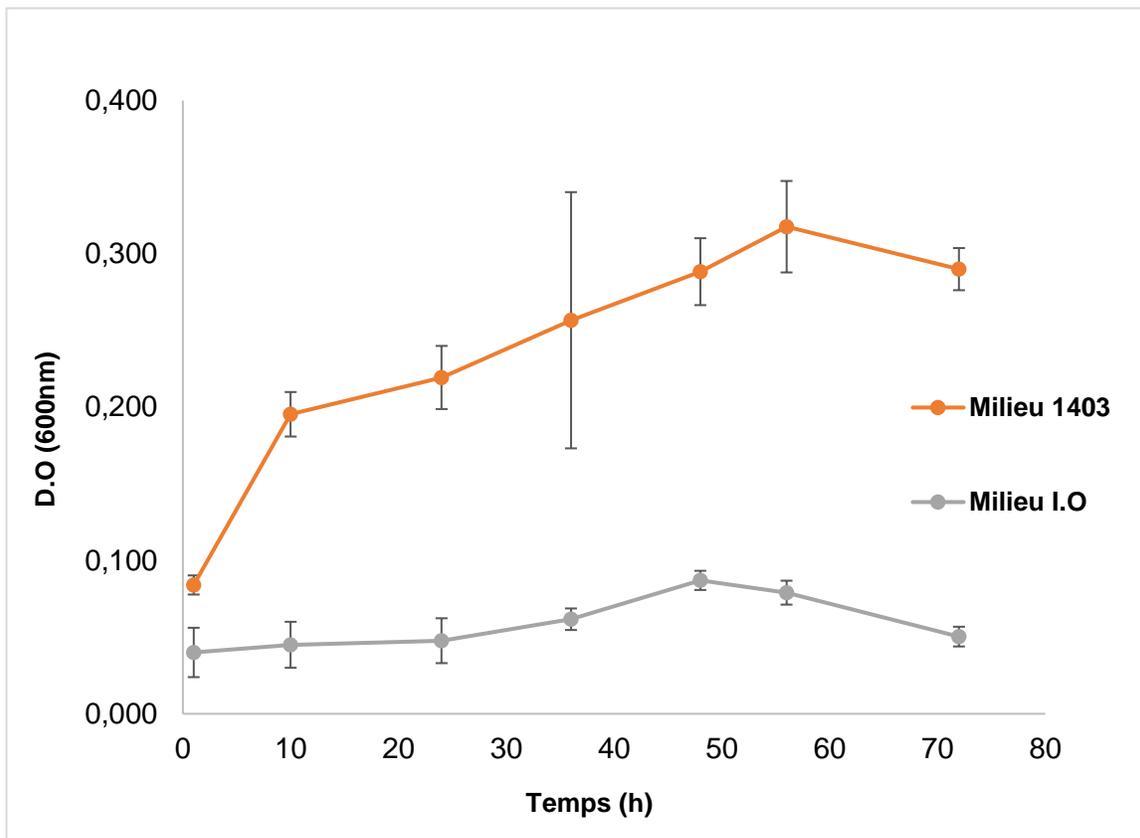
En raison de l'intolérance de la souche NL23 à croître dans un environnement salin et parce que le milieu marin IO est un milieu commercial qui ne permet pas d'être modifié, l'évaluation de la croissance des souches NL23 et JAM1 dans ce milieu a été réalisée avec une préparation diluée à moitié. Le suivi de la croissance a mis en évidence une faible croissance de la souche dans le milieu IO, la densité optique n'a pas dépassé 0,300, (Fig. 5.10). La souche NL23 dans le milieu 337a (avec une faible teneur en sel) a présenté une phase exponentielle pour atteindre une densité optique maximale de 0,400 après 72h.



**Figure 5.10 Croissance de la souche NL23 dans le milieu Instant Océan (IO).** Le milieu IO a été dilué à 50% de la concentration recommandée et un contrôle de la croissance de la souche NL23 a été réalisé dans le milieu 337a, sous conditions anoxiques. Données issues de triplicatas.

#### 5.4.2. Croissance de la souche JAM1 dans le milieu Instant Océan

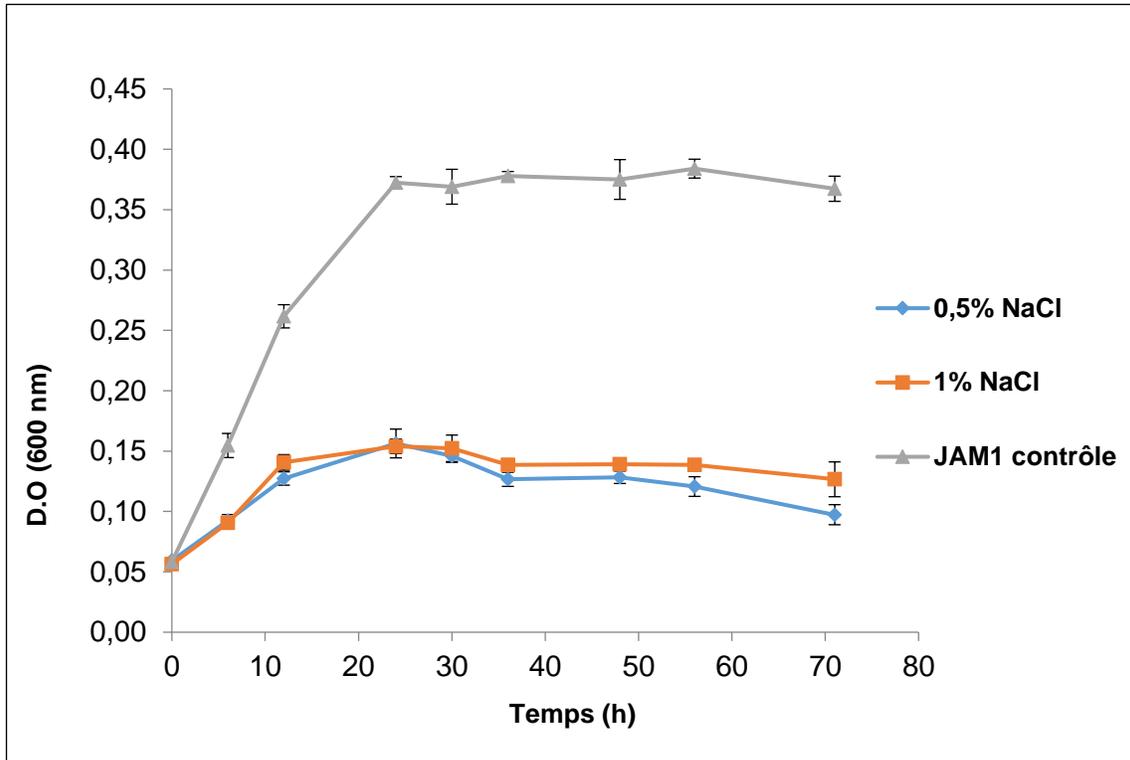
La souche JAM1 a également été inoculé dans un milieu IO dilué à moitié. Un contrôle a été effectué avec l'inoculation de la souche JAM1 dans le milieu Methylophaga 1403. Les résultats ont montré une faible croissance de la souche JAM1 dans le milieu IO, en comparaison avec le contrôle (Fig. 5.11). Ces résultats montrent que le milieu IO n'était pas un milieu adéquat pour les essais de co-cultures, même si ce milieu est le milieu d'origine où les deux souches se sont développées.



**Figure 5.11 Croissance de la souche JAM1 dans le milieu Instant Océan (IO).** Le milieu IO a été dilué à 50% de la concentration recommandée et un contrôle de la croissance de la souche JAM1 a été réalisé dans le milieu Methylophaga 1403, sous conditions anoxiques. Données issues de triplicatas.

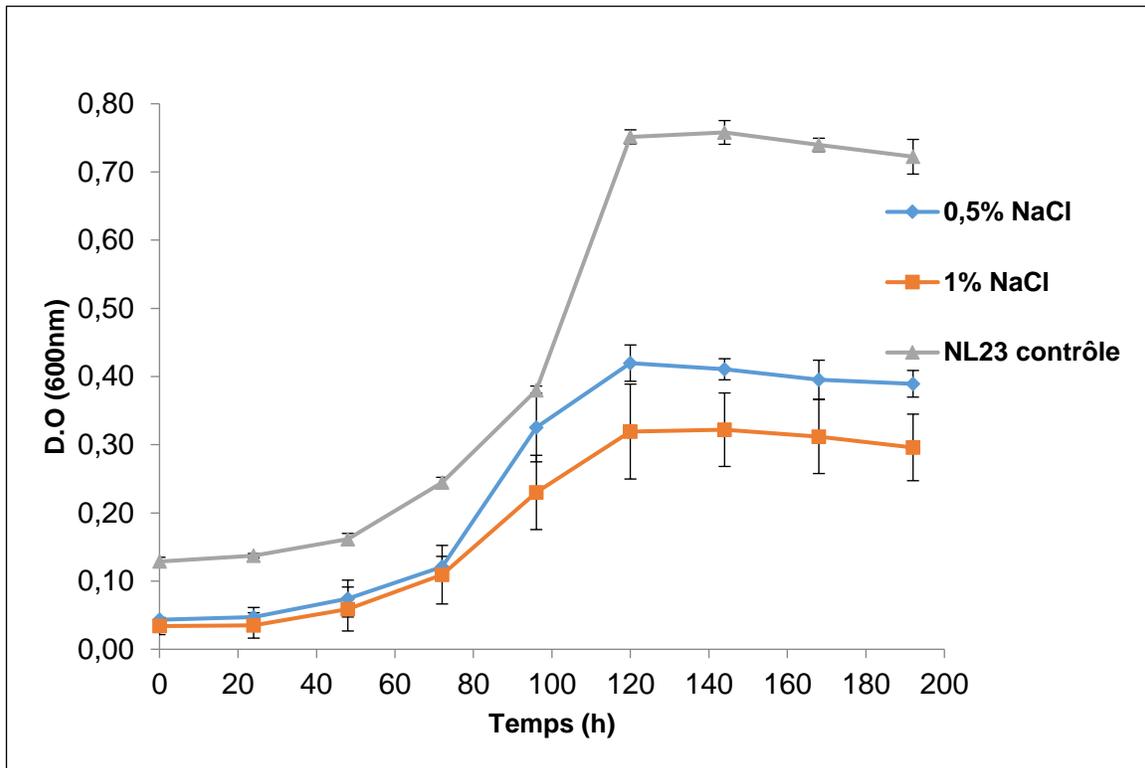
### 5.4.3. Croissance des souches JAM1 et NL23 dans le milieu 337a avec une concentration de 0,5% et 1% de NaCl.

Une modification concernant la concentration de NaCl a été réalisée sur le milieu de culture 337a, en ajustant à 0,5% et 1% (p/v). Les souches JAM1 et NL23 ont été cultivées dans ce milieu. Des contrôles ont été faits avec des cultures de la souche JAM1 dans le milieu Methylophaga 1403, et de la souche NL23 dans le milieu 337a.



**Figure 5.12 Croissance de la souche JAM1 dans le milieu 337a modifié à une concentration de 0,5% et 1% de NaCl en conditions anoxiques.** Données issues de triplicatas.

Les concentrations de 0,5 et 1 % de NaCl évaluées dans le milieu 337a ont montré une baisse de la croissance de la souche JAM1, reflétée par les faibles valeurs de la densité optique trouvée par rapport au milieu Methylophaga 1403, qui a montré une croissance supérieure de presque le double (Fig. 5.12).



**Figure 5.13 Croissance de la souche NL23 dans le milieu 337a modifié à des concentrations de 0,5% et 1% de NaCl en conditions anoxiques.** Données issues de triplicatas.

Les résultats du suivi de la croissance de la souche NL23 en milieu 337a modifié (Fig. 5.13) ont montré que l'influence de la concentration de NaCl a affecté également la croissance de la souche NL23, laquelle a montré une baisse dans sa croissance, malgré l'utilisation de son propre milieu. Il a été constaté que la densité optique ne dépasse pas de 0,450, ce qui est inhabituel pour cette souche dans ce milieu de culture car elle peut atteindre des valeurs jusqu'à 1,0. La culture pure de la souche NL23 dans le milieu de culture 337a sans ajout de NaCl a atteint une densité optique de 0,760.

5.4.4. Croissance des souches JAM1 et NL23 dans le milieu 337a et Methylophaga 1403 avec une concentration de 0,5 % de NaCl

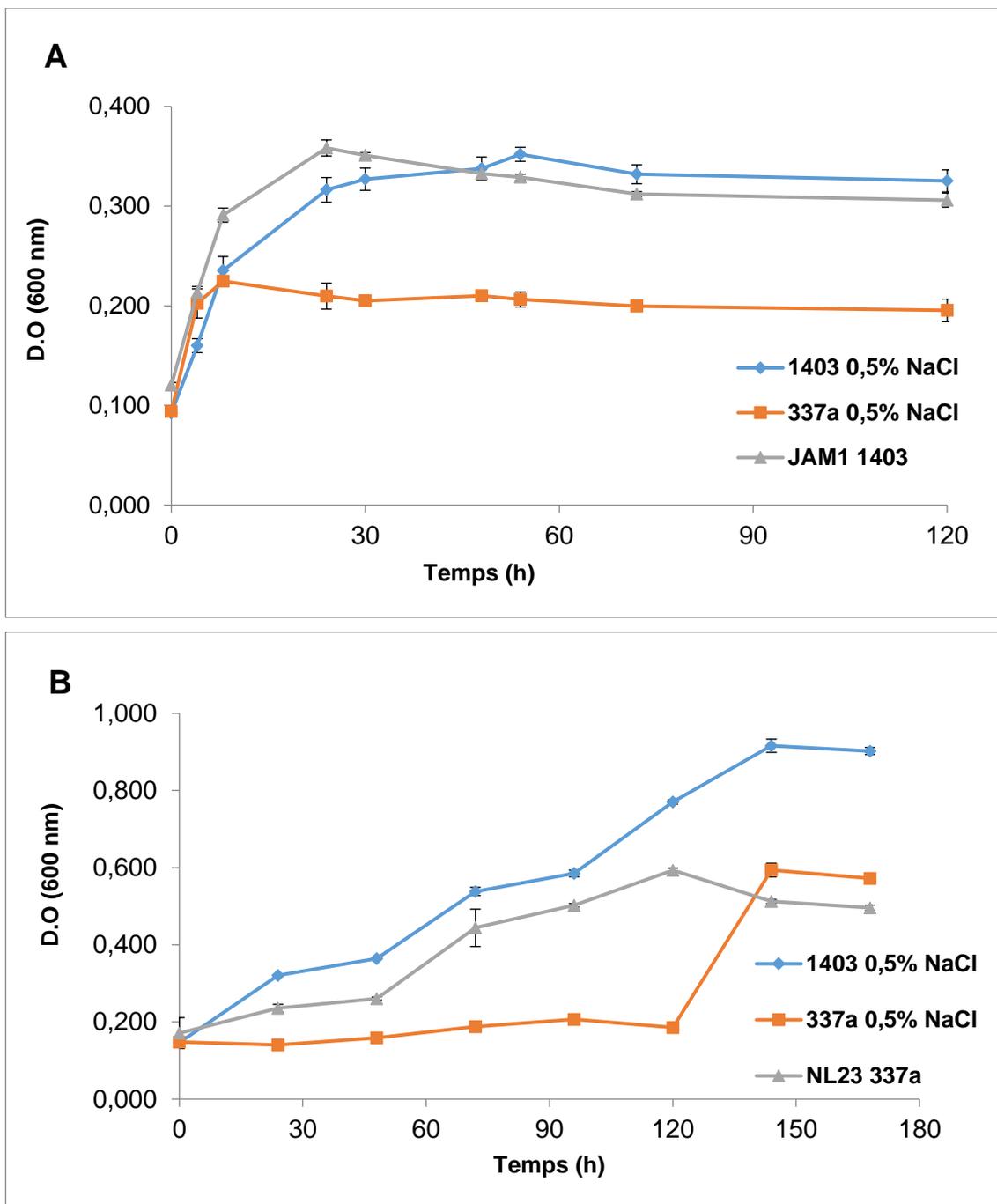


Figure 5.14 Suivi de la croissance des souches JAM1 et NL23 dans les milieux de culture pour leur croissance pure Methylophaga 1403 et 337a, modifiée à une concentration de 0,5% NaCl. (A) Croissance de la souche JAM1. (B) Croissance de la souche NL23. Données issues de triplicatas.

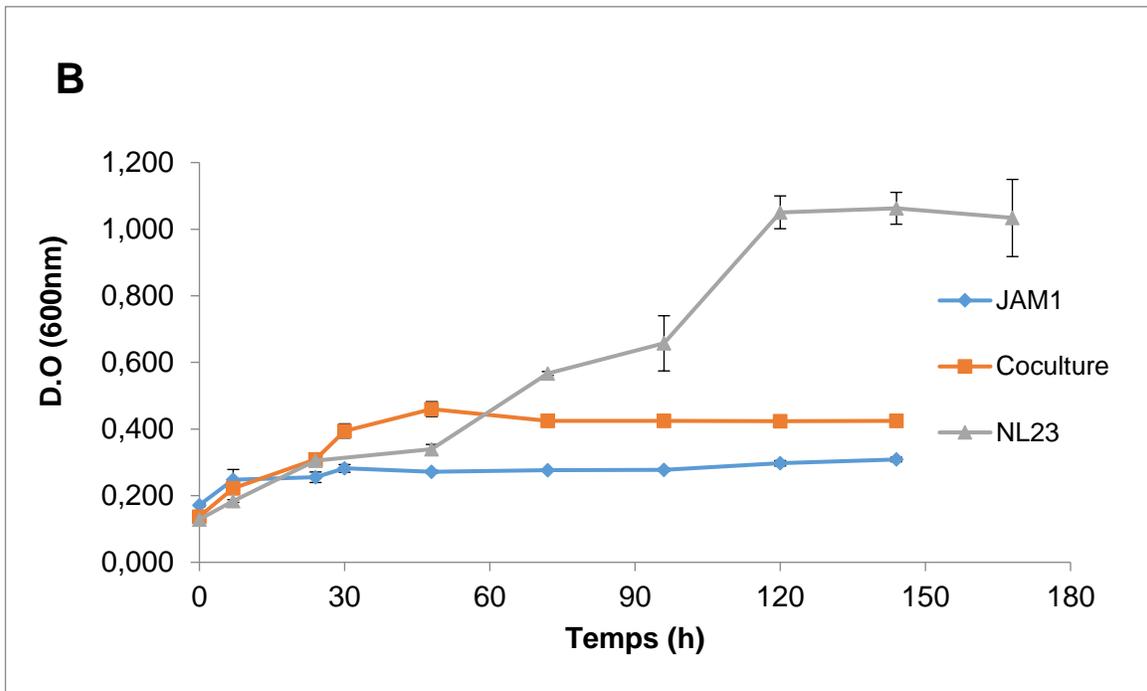
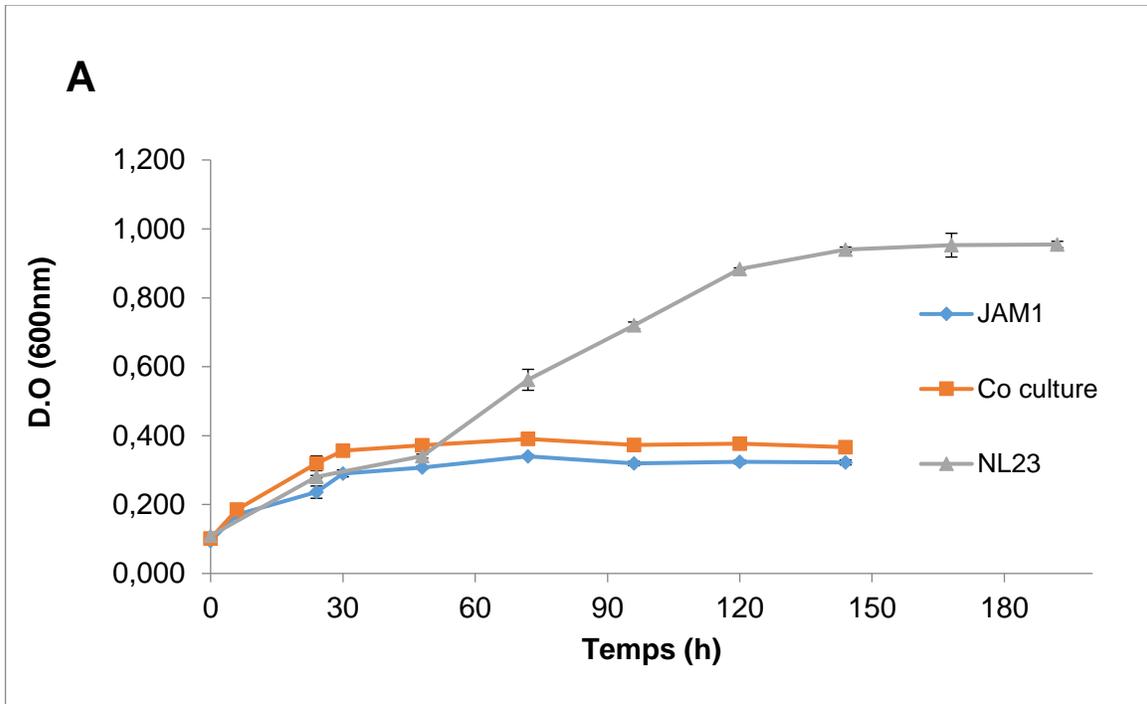
La croissance de la souche JAM1 (fig. 5.14 A) a montré une valeur maximale dans le milieu Methylophaga 1403 et une valeur similaire en densité optique a été obtenue pour cette souche dans le milieu 1403 modifié à 0.5% NaCl. Il a été observé à nouveau que cette souche présente des difficultés de croissance dans le milieu 337a; dans ce cas, la densité optique est presque la moitié de celle normalement obtenue pour la souche dans son propre milieu de culture. Pour sa part, la souche NL23 s'est bien adaptée au milieu Methylophaga 1403 avec une concentration en NaCl de 0,5% (fig. 5.14 B). La tendance de croissance est encore plus élevée que celle établie par la souche dans son propre milieu de culture (milieu 337a). On peut également voir que la souche NL23 n'a pas pu croître efficacement dans le milieu 337 à 0.5% NaCl; la souche a montré une phase de latence prolongée jusqu'à 120 heures.

Ces résultats ont montré qu'une concentration de NaCl à 0.5% pour le milieu de culture Methylophaga 1403 a permis un suivi fiable de la croissance des souches JAM1 et NL23, et donc à être utilisé ultérieurement comme milieu de culture lors du développement des co-cultures.

## **5.5. Croissance en co-cultures des souches JAM1 et NL23**

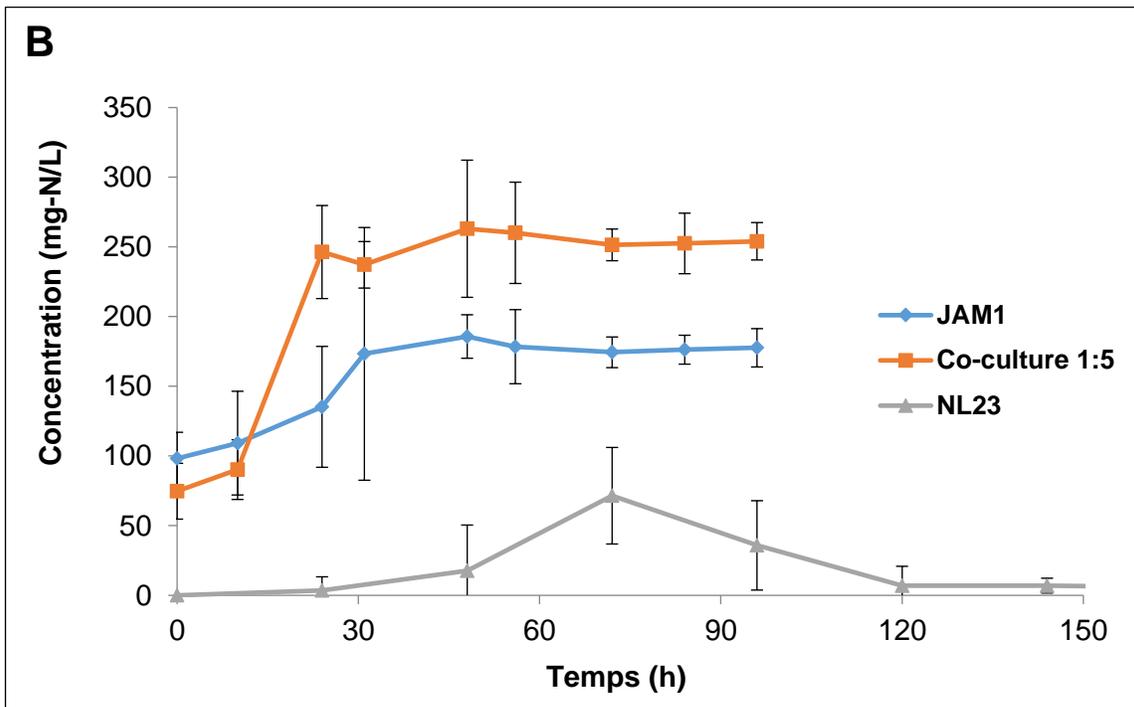
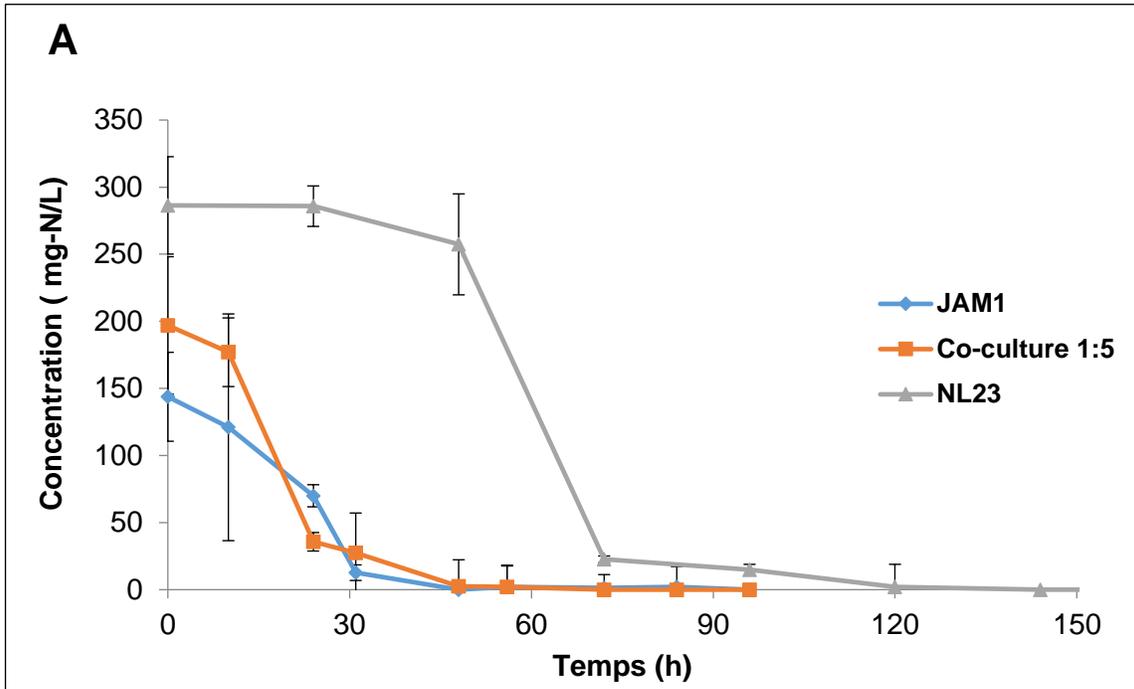
### **5.5.1. Co-cultures avec un inoculum de la souche NL23 non-stimulée**

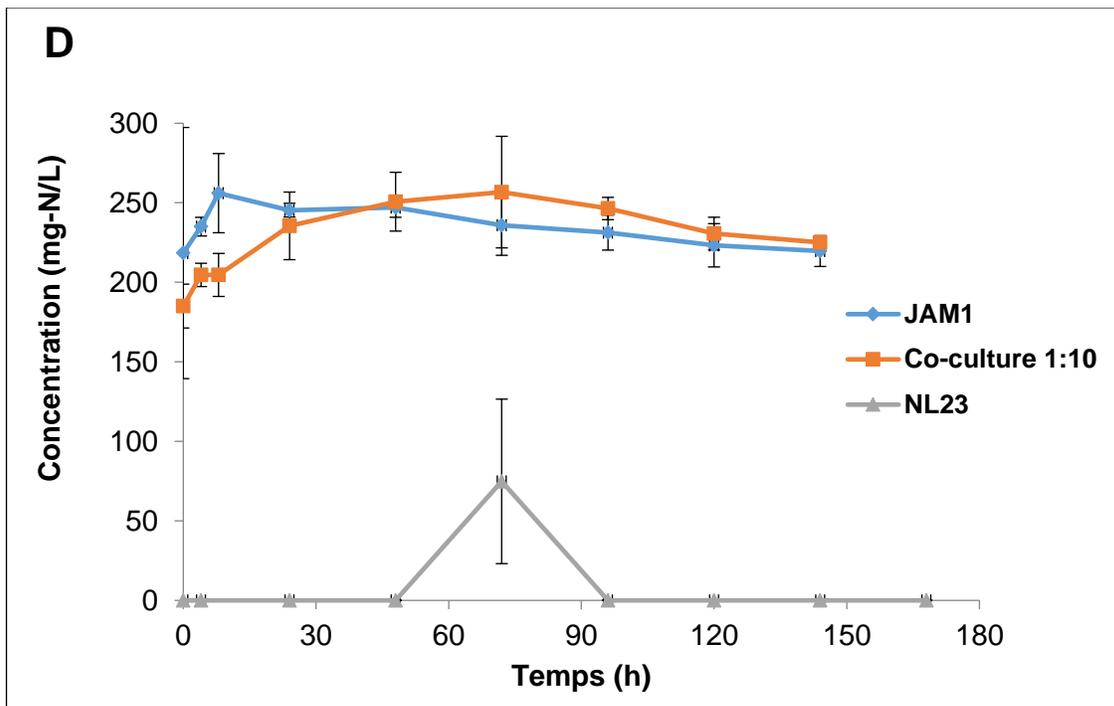
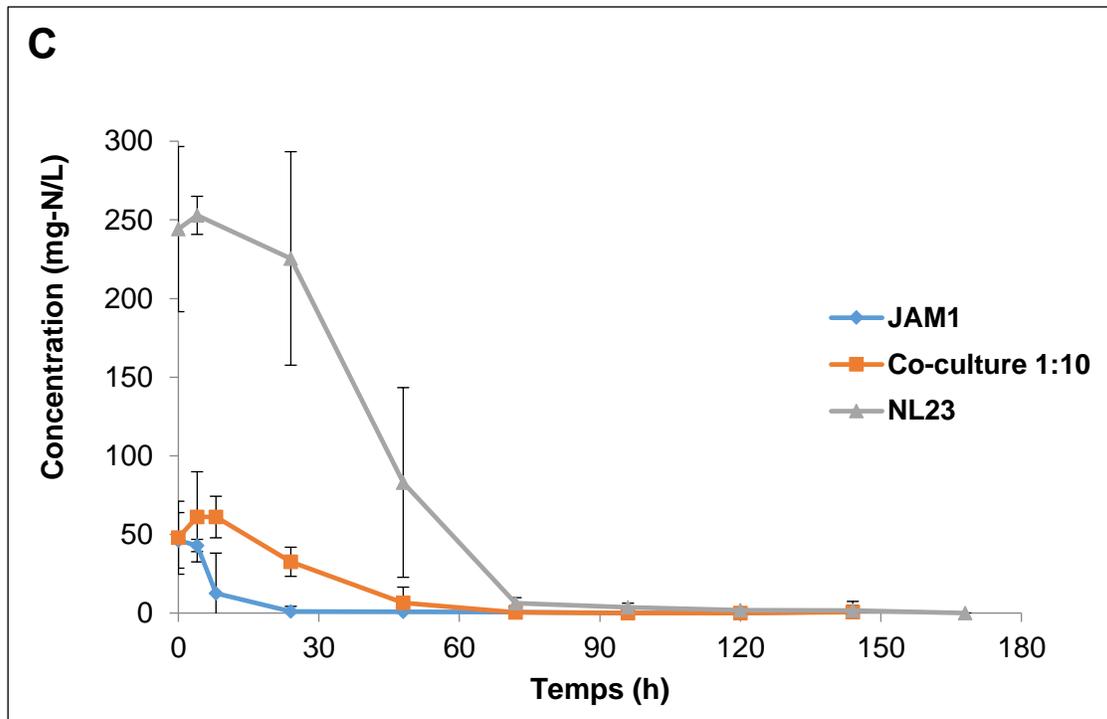
Les souches JAM1 et NL23 ont été cultivées en co-cultures avec un inoculum initial d'un ratio de 1/5 et 1/10 (JAM1:NL23) sous conditions anoxiques dans le milieu Methylophaga 0.5% NaCl. Ces ratios en faveur de la souche NL23 ont été choisis en raison de la forte dynamique de la souche JAM1 face au nitrate. Les souches JAM1 et NL23 ont été cultivées dans leur propre milieu pour être utilisés comme contrôles dans l'expérience.



**Figure 5.15 Croissance en co-cultures des souches JAM1 et NL23 dans le milieu Methylophaga 1403 modifié (0,5% NaCl).** (A) Co-cultures à un ratio 1/5 (JAM1-NL23) inoculum de départ. (B) Co-cultures à un ratio 1/10. Données issues de triplicatas. Les cultures pures des souches JAM1 et NL23 ont été effectuées dans les milieux Methylophaga 1403 et 337a respectivement.

Pour un ratio 1/5 (JAM1-NL23), les co-cultures ont eu une croissance similaire aux culture pures de la souche JAM1 (Fig. 5.15A). Des résultats semblables ont été obtenus avec les co-cultures issus d'un inoculum avec un ratio 1:10 (JAM1-NL23) (Fig. 5.15B).



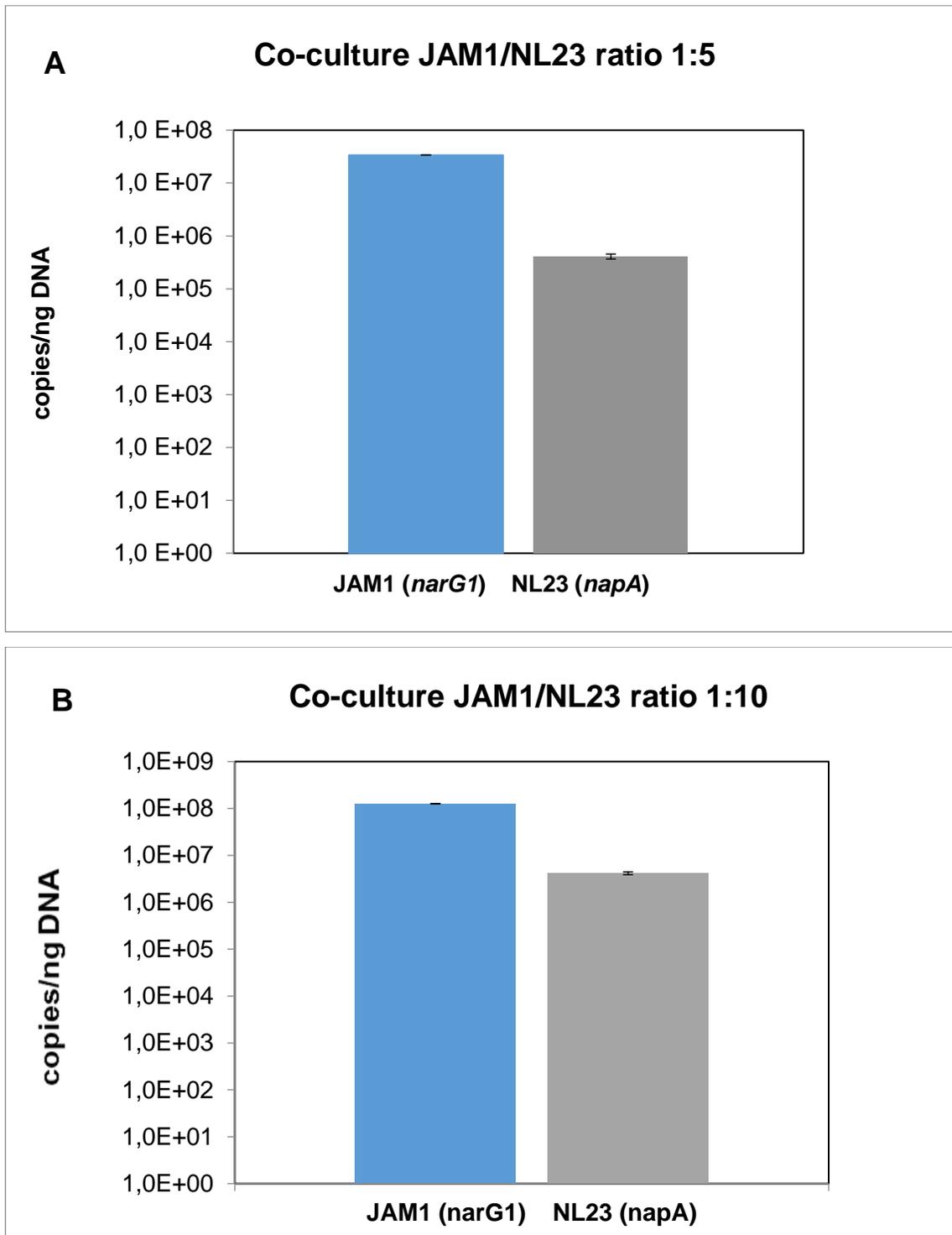


**Figure 5.16 Suivi de la réduction du nitrate et du nitrite avec différents ratios des souches JAM1 et NL23 dans les co-cultures.** Les cultures des souches pures et les co-cultures ont été réalisées dans le milieu Methylophaga 1403 modifié avec 0,5% NaCl à un ratio 1/5 des souches JAM1-NL23 (A, C) et à un ratio 1/10 des souches JAM1-NL23 (B, D), sous conditions anoxiques avec 300 mg-N-NO<sub>3</sub>/L, correspondant à 21.4 mM. Données issues de triplicatas.

Comme pour les résultats de la croissance, les profils de réduction du nitrate et nitrite ont suivi les profils de celle des cultures pures de la souche JAM1 (Fig. 5.16). Les cultures pures des souches JAM1 et NL23 ainsi que les co-cultures (ratio 1:5 et 1:10) ont totalement réduit le nitrate dans le milieu. La production de nitrite était similaire pour les co-cultures et les cultures pures de la souche JAM1 et NL23. La souche JAM1 et les co-cultures ont accumulé le nitrite proportionnellement à la consommation de nitrate. De même, la souche NL23 avait une production transitoire de nitrite similaire à celle observée précédemment lors de la réduction du nitrate. (Fig. 5.16B et 5.16D)

Lors du suivi des concentrations du nitrate et nitrite dans le milieu de culture, une différence significative a été observée dans les concentrations initiales du nitrate dans les deux proportions. Pour déterminer pourquoi une telle différence était présente dans les dosages en nitrate et en nitrite, la concentration initiale en nitrate dans les flacons a été évaluée, avant et après l'inoculation des souches. Les résultats ont permis d'observer qu'en effet les flacons commençaient à la même concentration en nitrate, mais après son inoculation, la souche JAM1 démarrait presque immédiatement le processus de réduction du nitrate, ce qui a été mis en évidence par une concentration inférieure au moment de la détermination.

### 5.5.1.1. Quantification des souches JAM1 et NL23 par qPCR

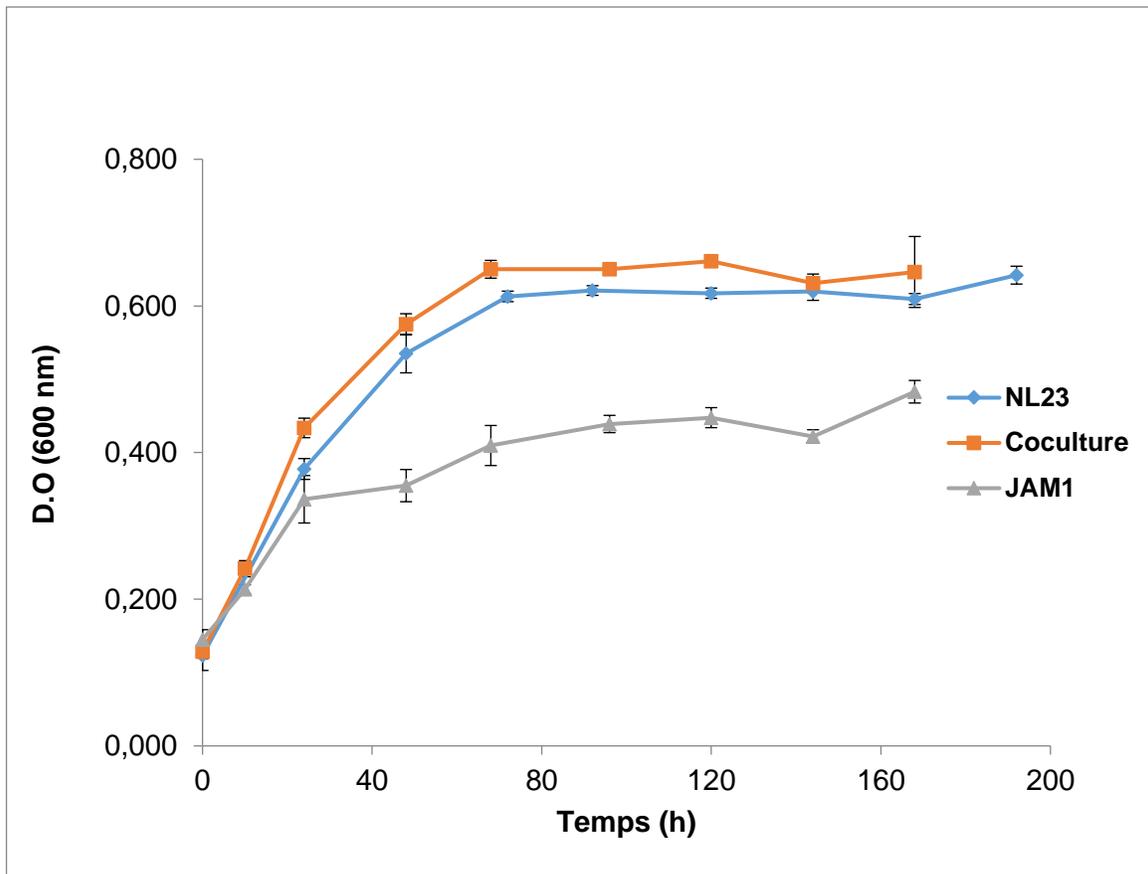


**Figure 5.17** Quantification des gènes des souches JAM1 (*narG1*) et NL23 (*napA*) par qPCR à la fin du suivi des co-cultures. (A) ratio des souches 1/5 (JAM1-NL23) et (B) ratio des souches 1/10 (JAM1-NL23) dans le milieu *Methylophaga* 1403 modifié. Données issues de triplicatas.

Les résultats obtenus à partir de la qPCR ont confirmé ce qui a été observé lors de la croissance des souches et de la cinétique de dénitrification. Pour le ratio 1/5 initial en faveur de la souche NL23 (fig. 5.17A), la souche JAM1 était 82 fois plus abondante ( $3,39E+07$  copies de *narG1* / ng) que la souche NL23 ( $4,11E+05$  copies de *napA* / ng) à la fin du suivi des co-cultures. Pour le ratio 1/10 (fig. 5.17B), des résultats similaires ont été obtenues. La souche JAM1 ( $1,26E+08$  copies de *narG1* / ng) était 30 fois plus abondante que la souche NL23 ( $4,15E+06$  copies de *napA* / ng). Ces différences en faveur de la souche JAM1 pourraient être dues à la grande affinité qui présente la souche JAM1 pour le substrat. Les résultats obtenus ont montré l'échec d'établir une activité complète dénitrifiante en co-cultures planctoniques dans les conditions testées.

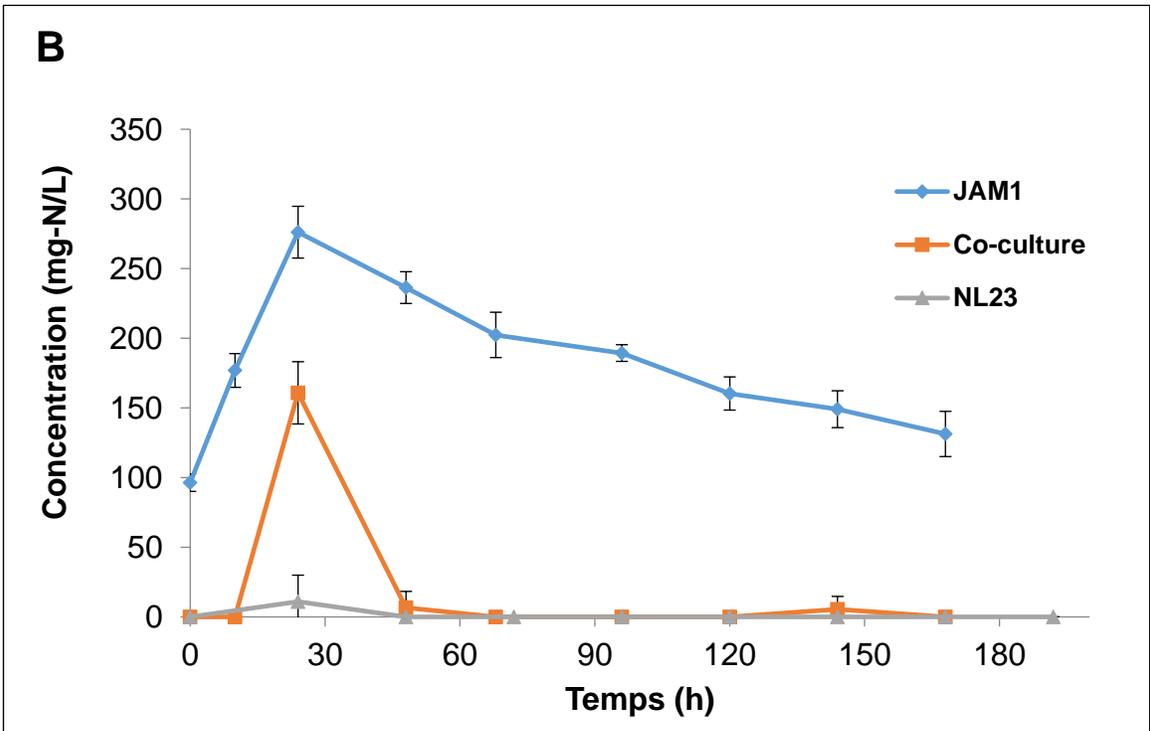
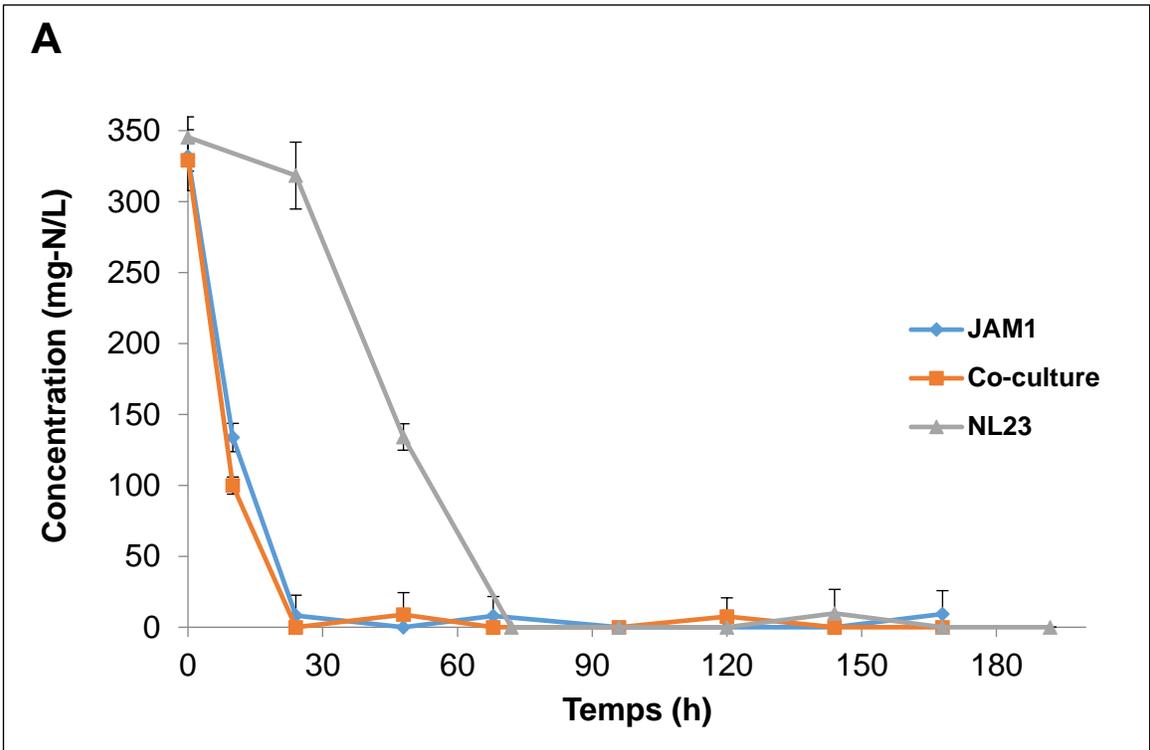
### **5.5.2. La stimulation de l'activité dénitrifiante de la souche NL23**

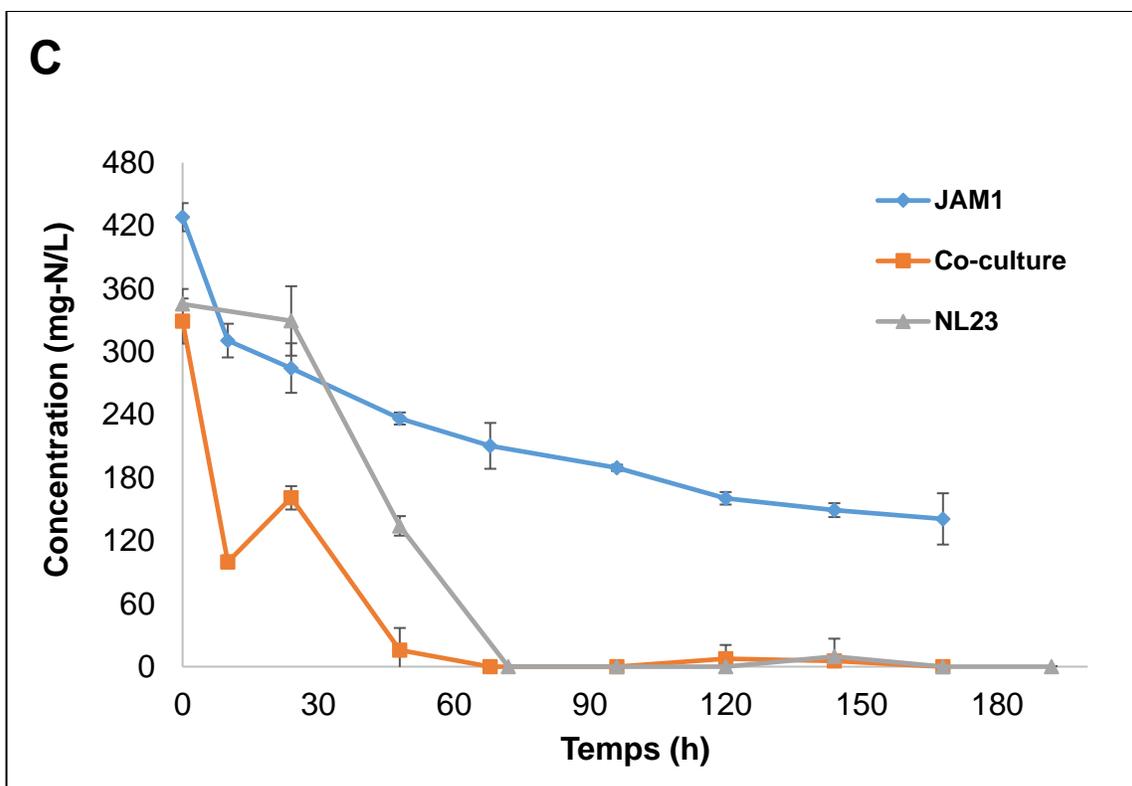
Une des raisons de l'échec d'établir une co-cultures dénitrifiantes serait que la souche NL23 n'était pas compétente immédiatement à réduire le nitrate. En effet, l'inoculum de la souche NL23 pour l'ensemencement des co-cultures provenait d'une pré-culture qui avait aucun nitrate en conditions oxiques. Dans la prochaine série de co-cultures, la pré-culture de la souche NL23 a été poussé en présence de nitrate ( $100 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / L}$ ) en conditions anoxiques pour que sa voie de dénitrification soit pleinement active lors de l'inoculation des co-cultures.



**Figure 5.18 Croissance en co-cultures de la souche JAM1 avec la souche NL23 stimulée, avec un ratio 1/1 dans le milieu de culture Methylophaga 1403 modifié.** Données issues de triplicatas.

Les co-cultures ont donc été faites avec un ratio de 1/1 (JAM1/NL23). Ce ratio 1:1 a été évalué avec le but de vérifier si en stimulant la souche NL23 à partir de l'inoculum, la souche était réellement capable de rivaliser au même niveau que la souche JAM1. Les résultats ont montré un changement significatif de la croissance des co-cultures. Cette fois, les co-cultures ont suivi un profil de croissance de la souche NL23 (Fig. 5.18).

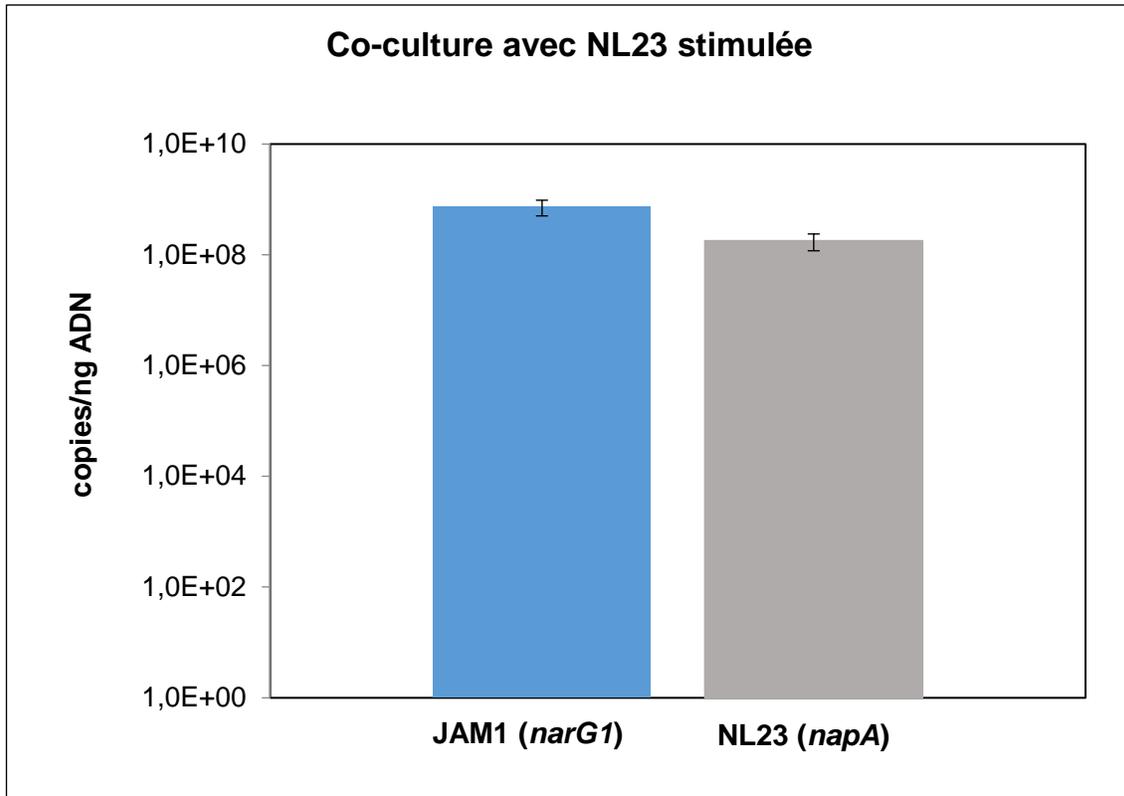




**Figure 5.19 Suivi du processus de dénitrification des co-cultures réalisées avec la souche JAM1 et la souche NL23 stimulée.** (A) Réduction du nitrate (B). Reduction du nitrite. (C) Azote total ( $\text{NO}_x$ ). Les cultures ont été réalisées dans le milieu Methylophaga 1403 modifié (0,5% NaCl) à un ratio 1/1 (JAM1-NL23), sous conditions anoxiques avec une stimulation préalable de l'inoculum de la souche NL23 avec  $100 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / L}$  de nitrate. Données issues de triplicatas.

Les co-cultures issues d'un inoculum stimulé de la voie de dénitrification de la souche NL23 ont montré un comportement supérieur aux cultures pures de la souche NL23 (Fig. 5.19A). Le temps dépensé par les co-cultures pour réduire complètement le nitrate était semblable aux cultures pures de la souche JAM1, mais largement plus rapide que les cultures pures de la souche NL23. Pour ce qui est du nitrite (Fig. 5.19B), une accumulation transitoire a été observée après 24 h dans les co-cultures et la souche NL23. Dans le cas de la souche JAM1 une accumulation progressive du nitrite a été observé. La figure 5.19C montre la cinétique de l'azote total résultant de la réduction du nitrate et nitrite. Cela a permis de calculer le taux de dénitrification obtenue entre les co-cultures et les cultures pures de la souche NL23. Les co-cultures ont présentées un taux de dénitrification de  $6.53 \text{ mg-N. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  soit 36% supérieur aux taux des cultures pures de la souche NL23 ( $4.79 \text{ mg-N. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

### 5.5.2.1. Quantification des souches JAM1 et NL23 par qPCR



**Figure 5.20** Quantification des gènes des souches JAM1 (*narG1*) et NL23 (*napA*) par qPCR à la fin du suivi des co-cultures. La souche NL23 a été préalablement stimulée avec 100 mg  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  / L, et les souches ont été mis à l'intérieur des co-cultures à un ratio 1/1 (JAM1-NL23) dans le milieu Methylophaga 1403 modifié, sous conditions anoxiques. Données issues de triplicatas.

La figure 5.20 montre que la concentration de la souche JAM1 était de 7,36 E+08 copies/ng de *narG1* soit un niveau 6 fois plus élevé que dans les co-cultures précédentes (1,26 E+08 copies de *narG1* / ng). Pour ce qui est de la concentration de la souche NL23, nous avons constaté une croissance de la souche, passant de 4,15 E+06 copies de *napA* / ng dans les co-cultures précédentes à 1,78 E+08 copies des gènes de *napA* / ng dans les présentes co-cultures, soit une différence de plus de 400 fois. Ces résultats permettent de mettre en évidence la nécessité de stimuler la voie de dénitrification de la souche NL23 pendant la préparation de l'inoculum, afin d'améliorer son rendement et de la rendre plus compétente face à la souche JAM1 en co-cultures.

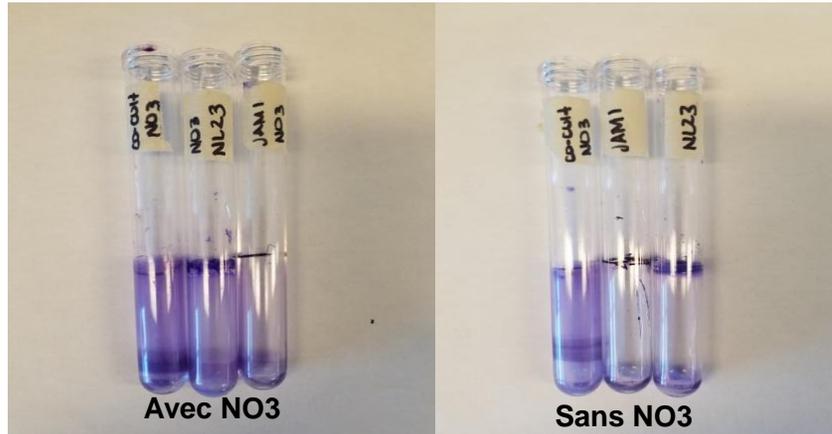
**Objectifs 4 : Établir un biofilm dénitrifiant en co-culture avec les souches JAM1 et NL23 et mesurer l'influence de ces biofilms sur l'activité dénitrifiante.**

#### **5.6. Développement de Biofilm en cultures statiques en tubes**

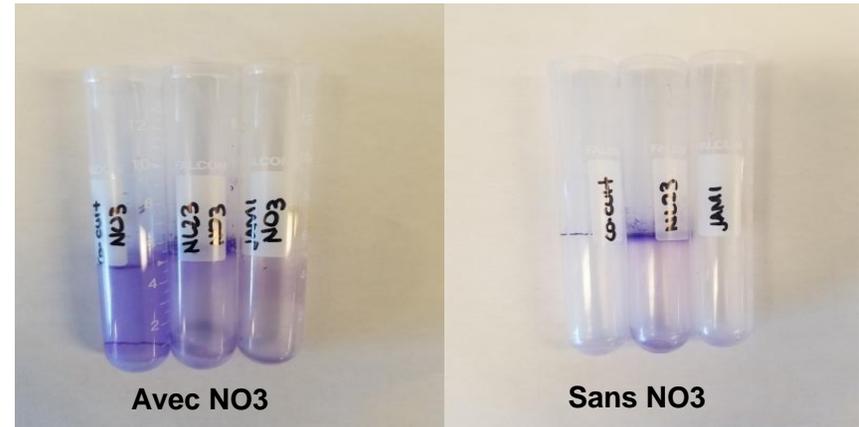
Des expériences effectuées auparavant dans le laboratoire du Prof. Villemur a montré une faible capacité des souches NL23 et JAM1 de former du biofilm sur une surface de verre. Toutefois, ces expériences étaient exploratoires. J'ai fait une étude plus poussée de cette capacité ou non des souches de former un biofilm sur différents matériaux (polystyrène, polypropylène et verre).

La formation du biofilm a été évaluée en tubes de 20 ml avec un volume de 5 ml de milieu de culture. Le milieu utilisé pour la croissance en cultures pures des souches JAM1 et NL23 a été le milieu Methylophaga 1403 et 337a respectivement, et pour la croissance en co-cultures a été le milieu Methylophaga 1403 modifié (0,5% NaCl). Les cultures ont été évaluées avec et sans ajout de nitrate, à une concentration de 300 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L sous conditions oxiques. Les cultures du biofilm ont été incubées à 30°C sans agitation pendant 8 jours pour permettre la croissance et la colonisation de la surface des tubes. La mesure de la formation du biofilm a été réalisée par une coloration au crystal violet.

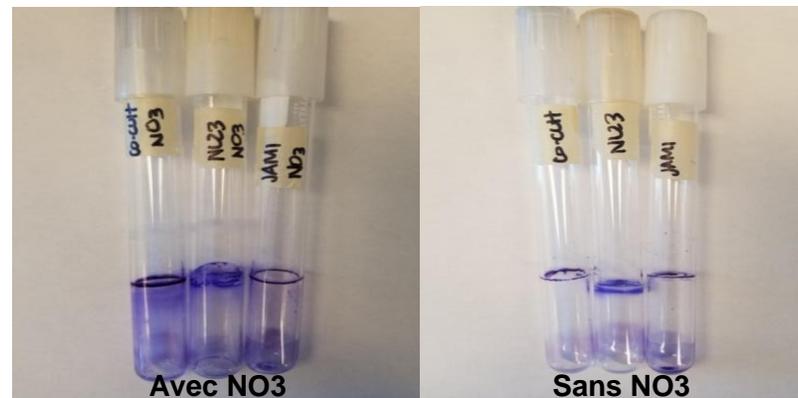
## A. Polystyrène



## B. Polypropylène



## C. Verre

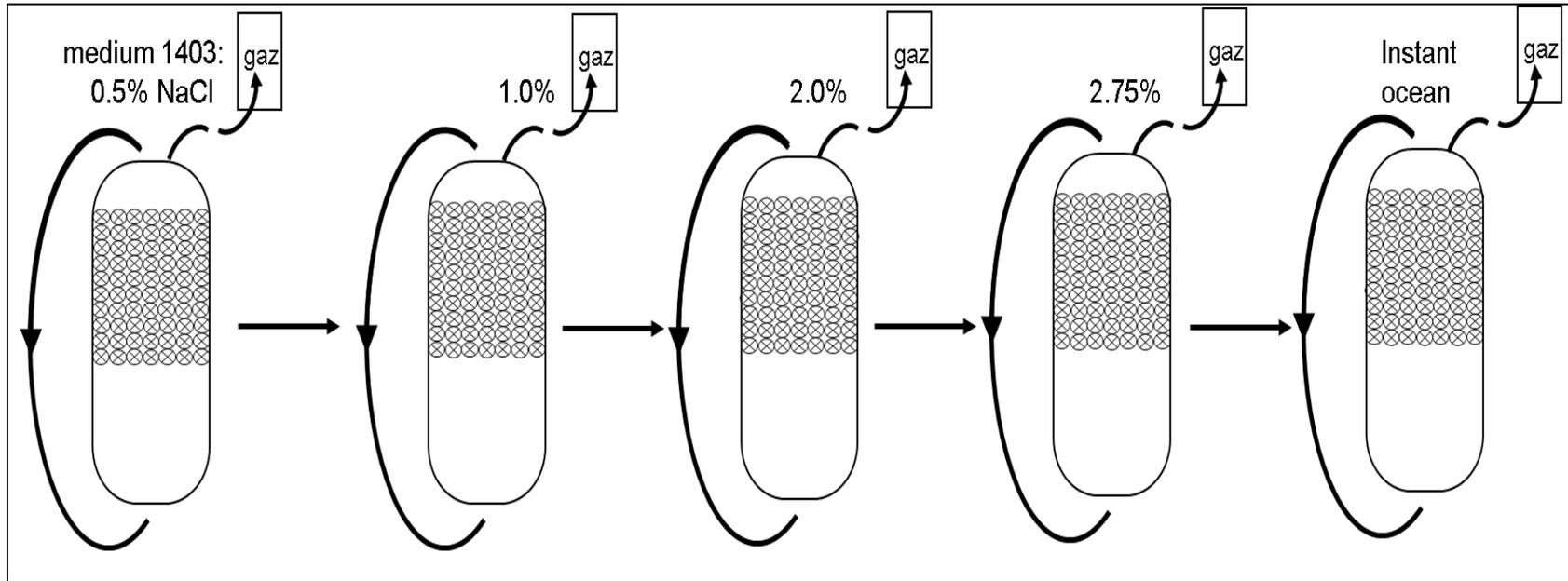


**Figure 5.21 Formation de Biofilm par les souches NL23, JAM1 et les co-cultures en tubes.** Les tubes contenaient 5 mL de cultures avec et sans ajout de nitrate (à une concentration de 300 mg NO<sub>3</sub>-N / L). Les cultures ont été incubées à 30°C, sous conditions oxiques, sans agitation.

Nous avons pu constater la capacité des deux souches à former un biofilm, avec une bonne adhérence sur les parois des tubes quel que soit le matériel utilisé (Figure 5.21). En général, le même comportement des souches a été observé lors du développement du biofilm. En absence de nitrate, un halo de biofilm a pu être observé à l'interface milieu/air des tubes. La disponibilité de l'oxygène a permis aux bactéries de pousser à la surface du milieu en raison de l'appauvrissement de celui-ci dans le milieu de culture. L'addition de nitrate dans le milieu a stimulé la densité cellulaire, ce qui a été reflété dans une plus grande intensité de couleur violet sur les parois des tubes auxquels il a été ajouté. On peut supposer que la région intérieure du tube a vu sa concentration en oxygène dissous diminuée grandement due à l'activité métabolique des bactéries. Ce faisant, en présence de nitrate, les bactéries ont pu se développer sur la paroi intérieure du tube.

### **5.7. Co-cultures en biofilm dans un Bio-réacteur**

Avec les résultats encourageants des expériences précédentes, nous avons voulu créer des co-cultures en biofilm entre les souches JAM1 et NL23 en conditions anoxiques sur des supports et d'adapter les deux souches aux mêmes conditions utilisées initialement dans le dénitrificateur du Biodôme de Montréal. Étant donné la sensibilité de la souche NL23 à la concentration de NaCl, les co-cultures en biofilm ont été acclimatée progressivement aux conditions marines (Fig. 5.22).



**Figure 5.22 Stratégie dans le développement d'une co-culture en biofilm dans un bio-réacteur.** Un volume de 500 ml de milieu 1403 modifié avec des concentrations de 0,5% jusqu'à 2.75% NaCl, puis dans le milieu marin Instant Ocean (IO) a été placé dans un bioréacteur avec 260 supports. Ce réacteur a été inoculé avec les souches NL23 et JAM1, et celui-ci a été opéré en recirculation sous conditions anoxiques. Un suivi de la dynamique de dénitrification a été réalisé dans chacune des concentrations de NaCl.

Le développement et les performances du biofilm établi entre les souches ont été évalués par trois essais successifs en bioréacteur. Chacun de ces bioréacteurs avait un objectif spécifique dans l'étude. Le premier bioréacteur a été conçu dans le but d'établir une co-culture en biofilm des souches JAM1 et NL23 et d'évaluer leur efficacité en termes d'activités dénitrifiantes dans le milieu à différentes concentrations de NaCl. Le second bioréacteur a été réalisée pour reproduire les résultats obtenus par le bioréacteur 1, avec quelques améliorations au niveau des conditions d'opérations. Enfin, un troisième bioréacteur a été réalisé uniquement avec la souche NL23, ce qui nous a permis de comparer jusqu'à quel point cette souche est capable ou non de s'adapter seul à un milieu marin sans perdre sa capacité de dénitrification.

### **5.7.1 Bio-réacteur 1**

Lors de la préparation des inoculum des souches JAM1 et NL23, une stimulation préalable des gènes de dénitrification a été effectuée pour la pré-culture de la souche NL23 avec 300 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$  de nitrate sous conditions anoxiques. Cela a été fait afin de rendre la souche NL23 plus compétente face à la souche JAM1. Les conditions dans lesquelles s'est déroulées le processus d'adaptation et de formation du biofilm par les souches dans le bioréacteur B1 à différentes concentrations de NaCl, sont présentées au Tableau 5.1. Dans ce tableau, nous pouvons observer qu'en ce qui concerne la concentration du nitrate et du méthanol, la progression a été lente au début. Les souches ont été mises dans le milieu de culture *Methylophaga* 1403 modifié, à une concentration de 0,5% de NaCl, sous conditions oxygènes pendant trois jours avec 100 mg  $\text{NO}_3^- -\text{N} / \text{L}$  de nitrate et 0,1% méthanol pour permettre l'augmentation en nombre des cellules. Lors du passage en conditions anoxiques et du changement du milieu, la faible quantité de bactéries restantes dans le bioréacteur (celles formant un faible biofilm sur les supports et les parois) explique la lente adaptation des conditions pour obtenir des activités dénitrifiantes (réduction du nitrate et nitrite). Une augmentation de la concentration de nitrate a été réalisée à 200 mg  $\text{NO}_3^- -\text{N} / \text{L}$  et 0,2 % de méthanol. À cette concentration, la dénitrification opérait de façon constante. Après 8 jours, nous avons remplacé le milieu avec un milieu frais contenant 300 mg  $\text{NO}_3^- -\text{N} / \text{L}$  de nitrate et 0.3% de méthanol. Comme établie dans d'autres études réalisées en laboratoire, la concentration de 300 mg  $\text{NO}_3^- -\text{N} / \text{L}$  de nitrate avec 0,3 % de méthanol a été utilisée comme concentration de référence. À partir de ces conditions, le processus de dénitrification a été suivi, non seulement par la détermination du nitrate et du nitrite (section suivante), mais aussi par la production de

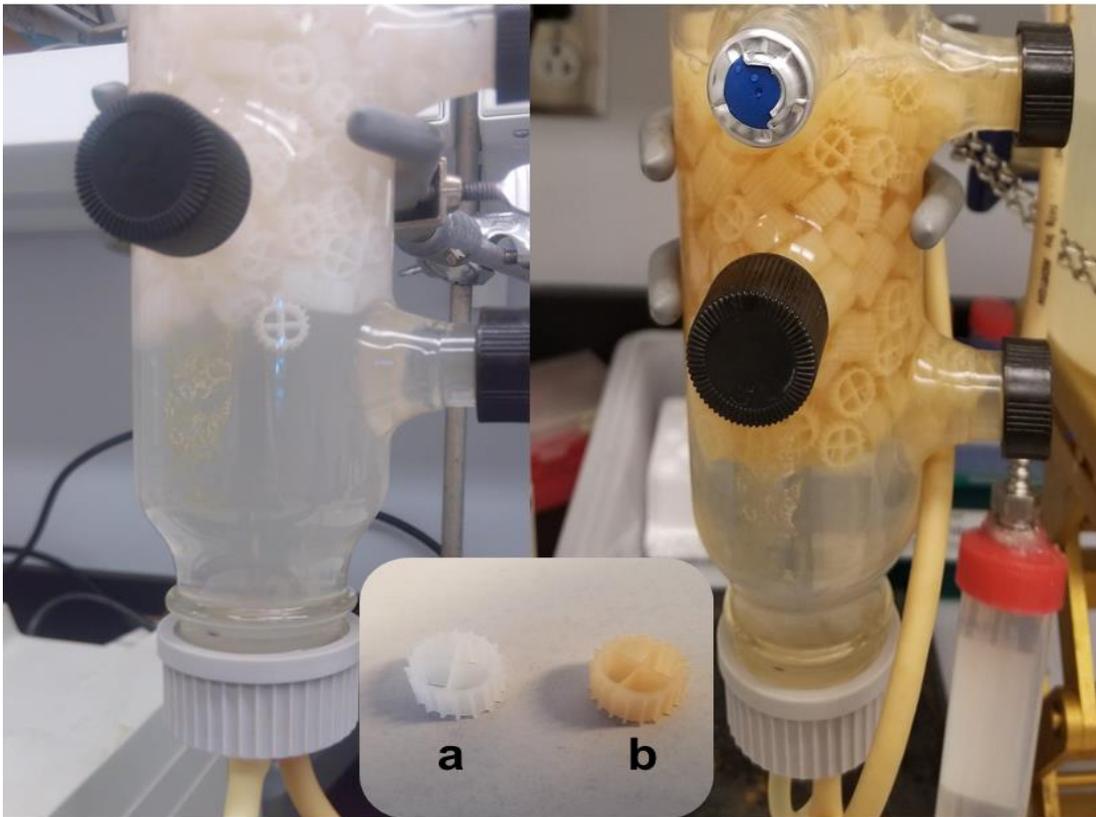
gaz par le système. Au cours de cette période, une production moyenne de 86 ml de gaz a été observée. Après que le processus de dénitrification se soit stabilisé entre 24 et 48 heures, le passage à la concentration de 1% NaCl a été effectué. Le bioréacteur a été opéré dans ces conditions pendant 10 jours. Une production de gaz de 95 ml a été observée suggérant que la dénitrification était opérante.

Bio- réacteur	Concentration NaCl % (w / v)	Concentration NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg-N / L	Méthanol % (v / v)	C / N	Adaptation du Biofilm (jours)	Production Gaz (ml/24h)
B1 JAM1/NL23	0.5 air	100	0,1	7,4	3	Nm
	0.5	100	0,1	7,4	30	Nm
	0.5	200	0,2	7,4	8	Nm
	0.5	300	0.3	7,4	26	86
	1.0	300	0.3	7,4	10	95
	2.0	300	0.3	7,4	5	108
	2.75	300	0.3	7,4	5	98
	IO	300	0,3	7,4	16	0
	IO + suppl.	300	0.3	7,4	28	45

**Tableau 5.1 Conditions d'opération du bio-réacteur 1.** Le réacteur a été réalisé avec des changements successifs de milieu à différentes concentrations de NaCl, suivant l'ordre du Tableau. Le réacteur 1 a d'abord été exécuté dans le milieu Instant Ocean (IO) sans suppléments, puis les suppléments ont été réintroduits. Nm : Non mesuré

Au cours d'une augmentation de la concentration de NaCl à 2%, nous avons constaté que les activités dénitrifiantes étaient similaires aux précédentes conditions en 5 jours. Une augmentation à 2.75% de NaCl a été réalisée. Encore une fois, les activités dénitrifiantes étaient optimales après 5 jours où le nitrate était consommé en moins de 24 heures avec une production de gaz de 98 ml. Un changement final vers le milieu marin IO utilisé par le système original de dénitrification a été réalisé dans le bioréacteur, afin d'évaluer si les deux souches étaient capables de poursuivre le processus de dénitrification. Nous avons constaté plutôt une décélération quasi totale du processus de réduction du nitrate et du nitrite. Les souches ont pris 16 jours pour réduire le nitrate en plus d'une accumulation du nitrite, et aucune production de gaz n'a été observée. Le milieu IO n'ayant pas de suppléments comme dans le milieu *Methylophaga* 1403, nous avons émis l'hypothèse que ce manque d'apport était la cause de cette déficience. Une addition de ces suppléments a été réalisée, montrant une amélioration des performances des souches en co-culture sans toutefois retrouver les pleines activités retrouvées dans les conditions précédentes.

A la fin du processus d'adaptation et après suivi de chacune des concentrations de NaCl, les supports du Bioréacteur ont été sauvegardés et analysés ultérieurement. Une biomasse s'est formée sur les supports, montrant qu'effectivement les souches avaient été en mesure de s'établir sous forme de biofilm (fig. 5.23).



**Figure 5.23** État de colonisation de la biomasse sur les supports de Bioflow 9. (a) Des supports avant la colonisation des souches JAM1 et NL23 (b) Des supports colonisés par les souches JAM1 et NL23, cinq mois après le début de la co-culture.

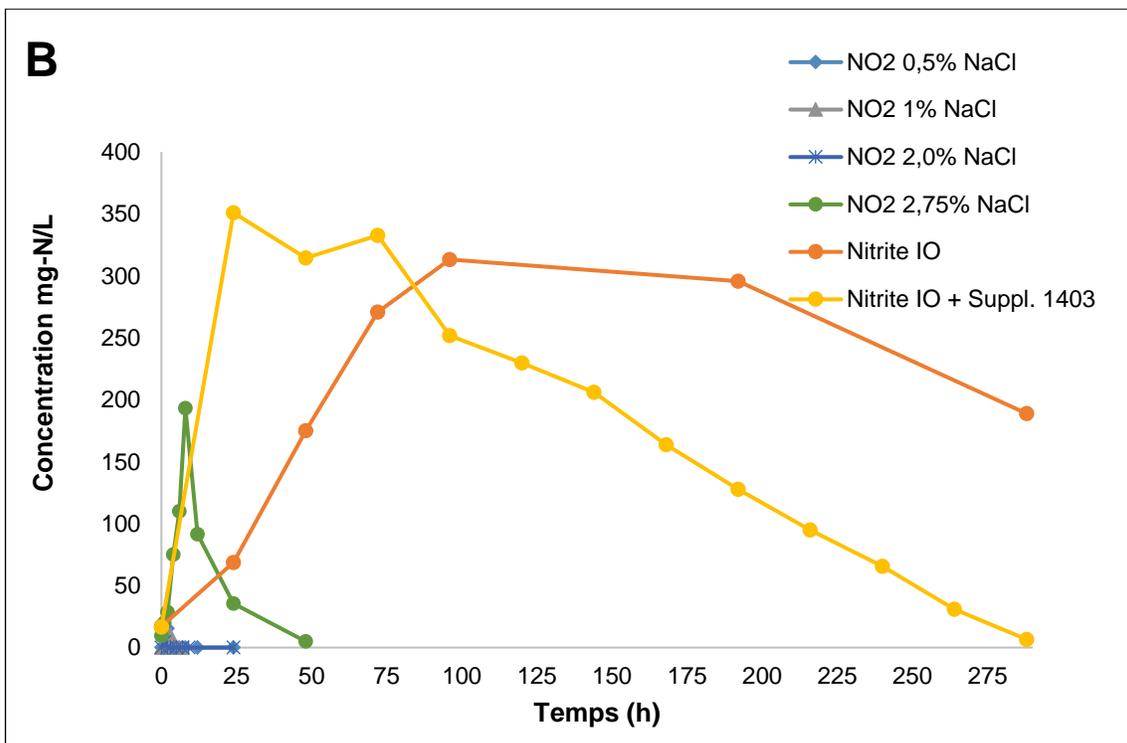
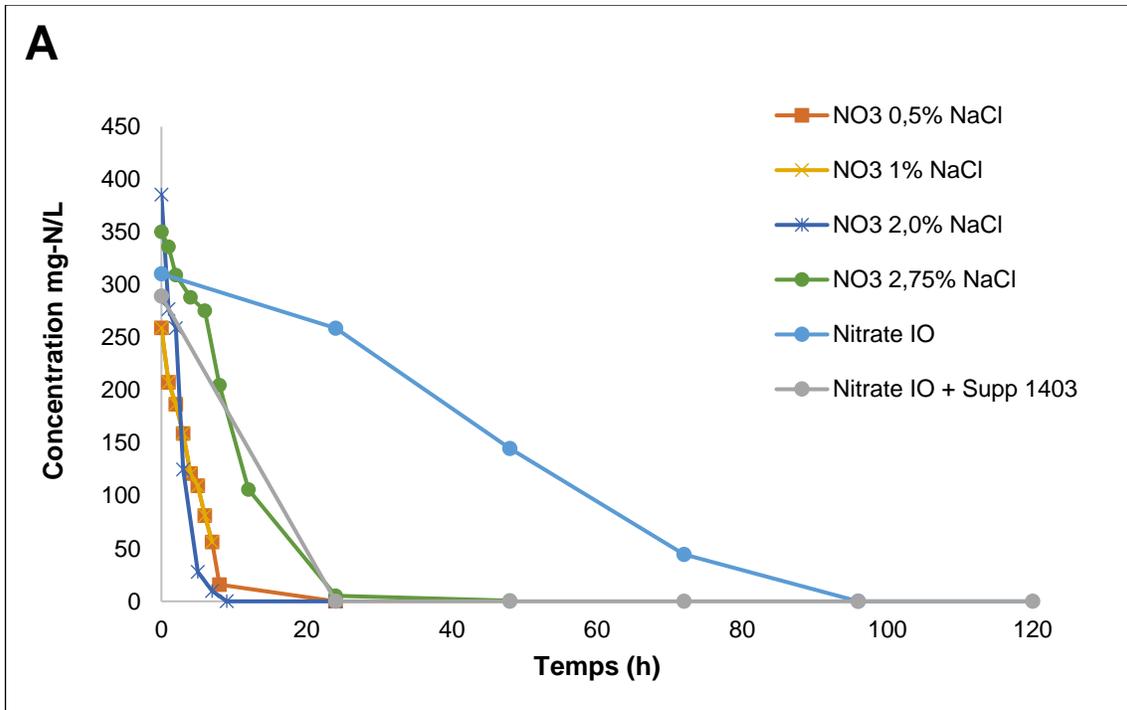
#### 5.7.1.1. Détermination du nitrate et du nitrite

Le suivi de la dynamique de réduction du nitrate et du nitrite a montré que les souches NL23 et JAM1 ont été capables de s'adapter progressivement aux changements de concentration de NaCl. La figure 5.24 montre comment dans la concentration de 0,5% les souches JAM1 et NL23 étaient capables d'assimiler 300 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L de nitrate ajoutés au milieu dans un délai de 24 heures, avec une consommation presque immédiate de celui-ci, comme il avait été observé lors de la réduction de nitrate en fiole. La production de nitrite a montré une concentration de nitrite de 3,05 mg $\text{NO}_2^-$ -N/L à la troisième heure avec une réduction totale pour la quatrième heure. La concentration 1% en NaCl a montré une tendance similaire à la concentration 0,5%; la réduction totale du nitrate et du nitrite a été observée durant les premières 24 heures après le remplacement du milieu de

culture. En ce qui concerne la concentration 2%, la dénitrification complète a été réalisée dans un temps moyen de 12 heures.

À la concentration 2,75% NaCl, la réduction du nitrate s'est effectuée de manière complète, émis en 24h. Une accumulation de nitrite à une concentration de 190 mg  $\text{NO}_2^-$ -N / L a été observée à la huitième heure et a été totalement réduite jusqu'à l'heure 48. A cette concentration, les souches ont été plus lentes à réduire le nitrate présent dans le milieu de culture, ce qui peut être dû à la forte concentration de nitrite produite qui aurait affectée leur performance.

Lors que le réacteur opérait avec le milieu IO, il lui a fallu plus de temps pour effectuer la réduction du nitrate, soit environ 4 jours avec une forte accumulation de nitrite, atteignant une concentration de nitrite de 313 mg  $\text{NO}_2^-$ -N / L dans le milieu de culture, ce qui a pu inhiber la croissance de la souche NL23 à ce moment-là. L'ajout des suppléments a vu une certaine amélioration dans le processus de réduction du nitrate et du nitrite, réduisant le nitrate en 24 h avec une accumulation de nitrite à 350 mg-N/L et qui n'a été complètement réduit qu'au 12<sup>ème</sup> jour. L'ajout de suppléments a favorisé la dénitrification dans des conditions originales. Par conséquent, ce paramètre a été pris en compte dans le bioréacteur 2.



**Figure 5.24** Activité dénitrifiante du bioréacteur 1. Réduction du nitrate (A), et nitrite (B) en fonction du temps pour les différentes conditions d'opération.

Bio- réacteur	Concentration NaCl % (w / v)	Concentration NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg-N / L	Taux de dénitrification (mg-N L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Quantité en mg	Quantité en mg	Taux de dénitrification
				de protéines par 260 support	de protéines par 500 ml	spécifique (mg-N/ L h <sup>-1</sup> mg-protéines <sup>-1</sup> )
				Biofilm	Suspension	
	0.5 air	100	Nm	Nm	Nm	Nm
	0.5	100	Nm	Nm	Nm	Nm
	0.5	200	Nm	Nm	Nm	Nm
	0.5	300	9,74	Nm	Nm	Nm
<b>B1 JAM1/NL23</b>	1.0	300	9,91	Nm	Nm	Nm
	2.0	300	13,24	Nm	Nm	Nm
	2.75	300	8,81	Nm	Nm	Nm
	IO	300	0,44	40,59	120,58	0,003
	IO + suppl.	300	1,24	Nm	Nm	Nm

**Tableau 5.2 Cinétique de dénitrification du Bioréacteur 1.** Les taux spécifiques de dénitrification ont été calculés à partir des données obtenues par la vitesse de réduction du nitrate plus du nitrite (NO<sub>x</sub>) et de la concentration de protéines par 500 ml de milieu de culture. Nm : Non mesuré

Le taux de dénitrification du réacteur a été mesuré à partir du moment où celui-ci a été exposé à la concentration de nitrate de 300 mg  $\text{NO}_3^- \text{-N} / \text{L}$  (Tableau 5.2). Pour la concentration de NaCl 0,5%, le taux de dénitrification a été de 9,74  $\text{mg-N.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . A la concentration 1%, le taux de dénitrification (9,91  $\text{mg-N.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) était similaire. À 2% de NaCl, il a été observé que la dynamique de dénitrification s'est améliorée sensiblement, puisque le temps employé par la co-culture pour s'adapter aux nouvelles conditions a été réduit de moitié, dans ce cas 5 jours, avec un taux de dénitrification de 13,24  $\text{mg-N.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  le plus élevé observé par le bioréacteur. Lorsque le réacteur a été opéré à 2,75% NaCl, une accumulation transitoire de nitrite s'est présentée, entraînant une diminution du taux de dénitrification (8,81  $\text{mg-N.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), un résultat similaire à celui observé à une concentration de 0,5%. À partir du moment où le milieu de culture IO a été introduit dans le réacteur, une forte accumulation de nitrite a été observée ainsi qu'une augmentation du temps mis par les souches pour réduire le nitrate présent dans le milieu; le taux de dénitrification a baissé à 0,44  $\text{mg-N.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Avec l'addition des éléments traces, ce taux a augmenté à 1,24  $\text{mg-N.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , un taux toujours très inférieure à ceux obtenus par les souches dans les autres conditions.

#### **5.7.1.2. Quantification des souches dans le bioréacteur 1**

La quantification des souches dans le bioréacteur 1 n'a été effectuée que dans la fraction planctonique du réacteur (bactéries en suspension), à cause de la faible quantité de biofilm sur les supports. La concentration de la souche JAM1 était plus élevée que la souche NL23 dans toutes les concentrations évaluées (Tableau 5.3). Les proportions les plus élevées de la souche NL23 par rapport à la souche JAM1 se situaient aux concentrations de 0,5, 1 et 2% de NaCl (ratio JAM1:NL23) à 20:1, 5:1 et 6:1 respectivement. La forte proportion de la souche JAM1 aux concentrations 2,75%, IO et IO plus suppléments a été de (ratio JAM1:NL23) 37:1, 122:1 et 169:1, respectivement. Cela est dû à sa capacité à croître dans des concentrations élevées de NaCl, ce qui fait de ces concentrations la condition idéale pour son développement. A 2,75% de NaCl et avec le milieu IO, l'activité dénitrifiante de la souche NL23 a été affectée. Cependant, son dénombrement absolu par qPCR a révélé qu'elle était présente à des concentrations similaires dans les différentes conditions d'opération.

Bioréacteur	NaCl% (w / v)	Concentration totale du gène/support Biofilm			Concentration totale du gène/ml Suspension		
		JAM1 <i>narG1</i>	NL23 <i>napA</i>	Ratio JAM1/NL23	JAM1 <i>narG1</i>	NL23 <i>napA</i>	Ratio JAM1/NL23
<b>B1</b> <b>(JAM1/NL23)</b>	0.5	Nm	Nm	Nm	7,83E+06	3,84E+05	20/1
	1.0	Nm	Nm	Nm	1,76E+05	3,61E+04	5/1
	2.0	Nm	Nm	Nm	1,59E+05	2,61E+04	6/1
	2.75	Nm	Nm	Nm	8,10E+05	2,20E+04	37/1
	IO	Nm	Nm	Nm	4,65E+08	3,82E+06	122/1
	IO+suppl.	8,14E+07	1,18E+07	7/1	1,26E+07	7,43E+04	169/1

Tableau 5.3 Quantification des souches JAM1 et NL23 par qPCR. Nm : non mesuré

La quantification des souches dans le biofilm à la fin de l'opération du réacteur a montré un ratio 7:1 en faveur de la souche JAM1, avec des concentrations de  $8,14 \times 10^7$  copies *narG1*/mL pour la souche JAM1 et  $1,18 \times 10^7$  copies *napA*/mL pour la souche NL23. Cette différence notable entre la fraction suspension (169:1) et biofilm (7:1) laisse supposer que la souche NL23 a été capable de s'adapter dans le biofilm à proximité avec la souche JAM1.

Nous pouvons conclure que la réduction rapide et complète du nitrite lors de l'évaluation des trois premières concentrations de NaCl (0,5, 1 et 2%) est due à ce que la souche NL23 se trouvait en bonne proportion dans le réacteur. Les résultats obtenus sur le bioréacteur 1 ont montré des résultats comparables à ceux trouvés au niveau des fioles, dans lesquelles la souche JAM1 s'est retrouvée toujours en plus grand nombre par rapport à la souche NL23 dans toutes les concentrations de NaCl évaluées en cette étude.

### **5.7.2. Bio-réacteur 2**

Ce bioréacteur a été conçu dans le but de reproduire la co-culture en biofilm du bioréacteur 1, tout en corrigeant les problèmes rencontrés lors de l'établissement du biofilm dans le premier bioréacteur. Le bioréacteur a été réalisé avec le même concept que le premier, en augmentant progressivement la concentration de NaCl à mesure que les souches effectuaient de manière dynamique le processus de dénitrification.

Bio- réacteur	Concentration NaCl % (w / v)	Concentration NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg-N / L	Méthanol % (v / v)	C / N	Adaptation du Biofilm (jours)	Production Gaz (ml/24h)
<b>B2</b> <b>JAM1/NL23</b>	0.5 air	100	0,1	7,4	3	Nm
	0.5	100	0,1	7,4	47	55
	0.5	200	0,2	7,4	19	57
	0.5	300	0.3	7,4	6	67
	1.0	300	0.3	7,4	4	108
	2.0	300	0.3	7,4	11	92
	2.75	300	0.3	7,4	10	110
	IO +suppl	300	0,3	7,4	7	106
	Enlèvement des suppl.	300	0.3	7,4	14	103

Tableau 5.4 Conditions d'opération du bio-réacteur 2. Nm : Non mesuré

Initialement les souches ont été mises pour 3 jours sous conditions oxiques en milieu 1403 modifié à une concentration de 0,5% NaCl et 100 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L de nitrate pour permettre leur augmentation en nombre (Tableau 5.4). Après cela les souches ont été mises sous conditions anoxiques pendant 47 jours avec plusieurs changements de milieu pour atteindre une production moyenne de 55 mL de gaz. Après d'avoir observé que la réduction du nitrate était réalisée sur une période de 24 heures et de manière constante, une augmentation de la concentration du nitrate a été réalisée à 200 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L. Cela a pris environ 19 jours pour la réduction du nitrate et nitrite se fasse dans les 24 heures, avec une production de gaz similaire à celle observée dans la réduction de 100 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L de nitrate.

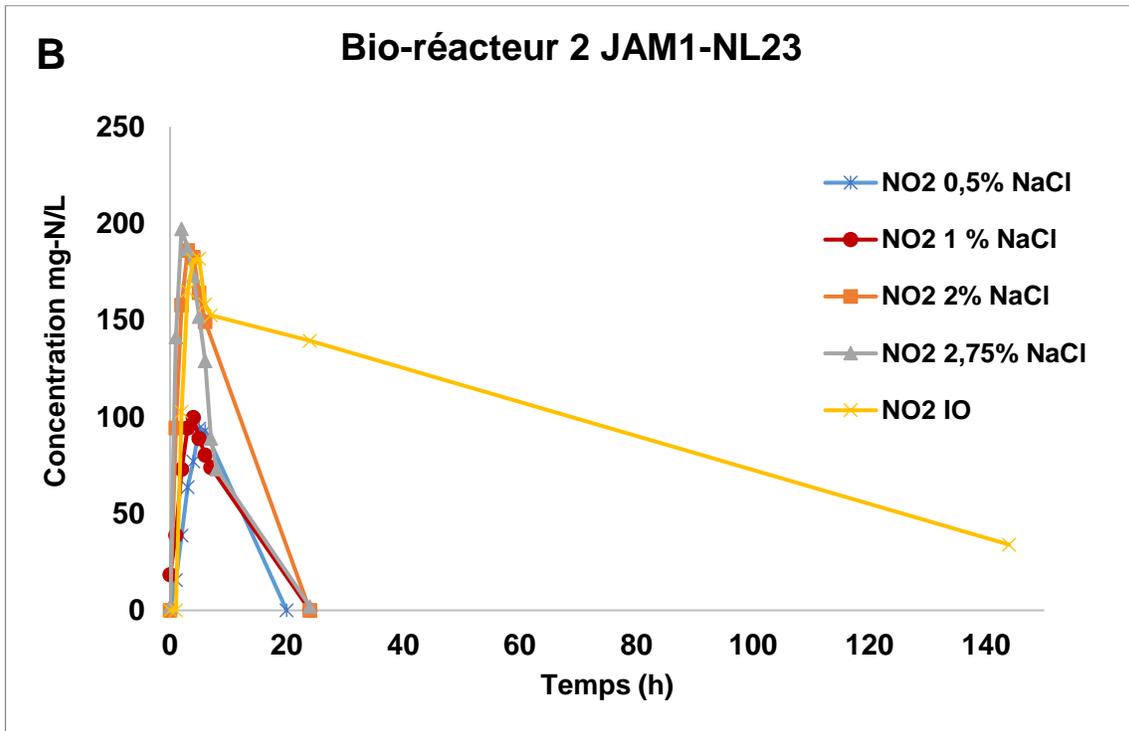
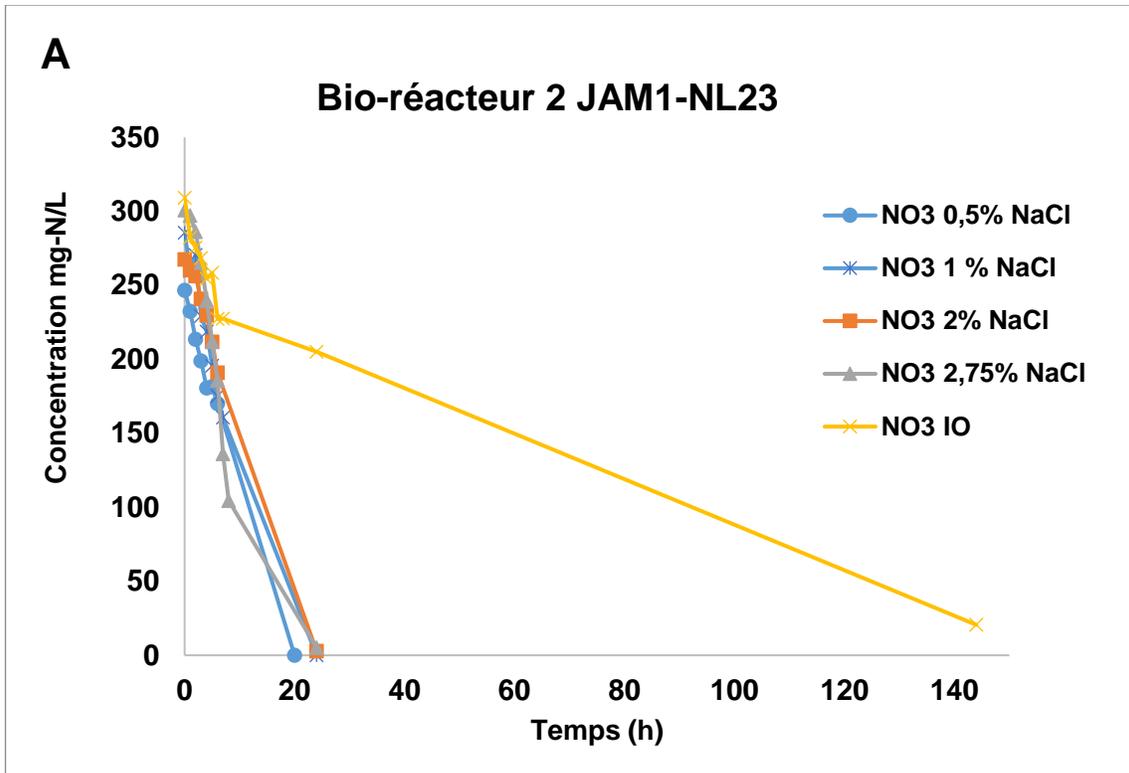
L'augmentation de la concentration de nitrate à 300 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L a permis d'observer une réduction importante du nombre de jours qu'il l'a fallu à la co-culture pour s'adapter aux nouvelles conditions, soit 6 jours, avec une production de gaz de 67 ml. Après ce temps, et en observant que la dynamique est restée stable, la concentration en NaCl a été augmenté à 1%. À cette concentration, le réacteur n'a pris que 4 jours pour réaliser la réduction du nitrate et nitrite dans les 24 heures avec une production moyenne de gaz de 108 ml, ce qui témoignait une dynamique de dénitrification effective. Ensuite une augmentation de la concentration de NaCl a été réalisée à 2%. Les activités dénitrifiantes étaient stables après 11 jours, avec une production de gaz de 92 ml.

En ce qui concerne à la concentration de NaCl 2,75%, il a été observé que cette concentration a pris à peu près le même temps d'adaptation que la concentration 2% (10 jours) pour se stabiliser et avec une production de 110 ml de gaz. Le passage au milieu IO a été critique lors de l'opération du bioréacteur 1. Cette fois-ci, nous avons conservé les suppléments du milieu Methylophaga 1403 dans le milieu IO. Dans ce cas, la réduction du nitrate a été effectuée sur une période de 7 jours, avec une autre production de gaz de 106 ml. L'enlèvement un à un de chacun des suppléments s'est fait graduellement sans que cela affecte l'activité dénitrifiante du bioréacteur. Nous avons observé une production de gaz de 103 ml et une dynamique de dénitrification qui a été complétée en 24 heures.

#### **5.7.2.1. Détermination du nitrate et du nitrite**

Le suivi de la dynamique de dénitrification au deuxième bioréacteur est illustré à la figure 5.25. Cette figure montre que le nitrate a été réduit dans les 24 heures pour toutes les conditions sauf pour le réacteur opéré avec le milieu IO, où le nitrate a pris 144 h pour

être réduit. Dans tous les cas, une accumulation transitoire du nitrite est apparue entre 2 et 8 h. Ceci contraste avec le bioréacteur 1 où une accumulation transitoire du nitrite n'est apparue que dans les conditions d'opération avec 2.75% de NaCl. Le milieu de culture IO supplémenté a montré une dynamique de réduction du nitrate plus lente par rapport aux autres concentrations. La réduction complète du nitrate et partiel du nitrite a pris 144 heures.



**Figure 5.25 Activités dénitrifiantes du bioréacteur 2.** Réduction de nitrate (A), et nitrite (B). La réduction du nitrate et du nitrite pour la concentration IO a été effectuée complètement jusqu'à l'heure 144.

Bio- réacteur	Concentration NaCl % (w / v)	Concentration NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg-N / L	Taux de dénitrification (mg-N L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Quantité en mg de protéines par		Taux de dénitrification spécifique (mg-N/ L h <sup>-1</sup> mg-protéines <sup>-1</sup> )
				260 supports	500 ml	
				Biofilm	Suspension	
<b>B2 JAM1/NL23</b>	0.5 air	100	Nm	Nm	Nm	Nm
	0.5	100	Nm	Nm	Nm	Nm
	0.5	200	Nm	Nm	Nm	Nm
	0.5	300	13,28	6,75	168,35	0,07
	1.0	300	14,01	31,06	162,33	0,07
	2.0	300	15,69	42,24	107,63	0,10
	2.75	300	18,52	48,46	241,4	0,06
	IO + suppl.	300	Nm	Nm	Nm	Nm
	IO	300	1,85	47,23	220,174	0,006

**Tableau 5.5 Dynamique de dénitrification du bioréacteur 2.** Les taux spécifiques ont été calculés à partir des données obtenues de la vitesse de réduction du nitrate plus nitrite (NO<sub>x</sub>) et de la concentration de protéines dans le réacteur. Nm : non mesuré

Le taux de dénitrification, la concentration de protéines et le taux de dénitrification spécifique ont été calculées à partir du moment où la concentration de nitrate a été établie à 300 mg  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  / L. Nous avons observé que le taux de dénitrification est resté relativement stable durant les phases d'opération du réacteur avec des concentrations en NaCl de 0.5% à 2.75% avec un taux moyen de 15 mg-N.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Tableau 5.5). Il a été observé également qu'à ces concentrations, les taux spécifiques de dénitrification sont restés stables autour de 0.07 mg-N.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.mg-protéines<sup>-1</sup>. Dans le cas du réacteur opéré avec le milieu IO, nous avons observé une baisse d'environ 10 fois du taux de dénitrification et du taux spécifique de dénitrification.

#### **5.7.2.2. Quantification des souches dans la co-culture dans le bioréacteur 2**

La quantification des souches a été mesurée à chaque phase d'opération du réacteur. Les résultats ont montré un profil dans lequel la souche JAM1 est restée supérieure en nombre que la souche NL23 dans la biomasse en suspension, avec un ratio JAM1:NL23 variant entre 16:1 et 76:1 (Tableau 5.6).

Les concentrations des souches JAM1 et NL23 ont été également mesurées dans le biofilm du bioréacteur. Nous avons pu observer que la proportion de la souche NL23 était plus élevée dans le biofilm des trois conditions mesurées (ratio JAM1:NL23 variant de 8:1 à 20:1) que dans la biomasse en suspension (ratio JAM1:NL23 variant de 14:1 à 76:1). Nous avons également noté que les deux souches diminuaient d'un ordre de grandeur en concentrations dans la biomasse en suspension avec l'augmentation du NaCl dans le milieu et avec le milieu IO, mais que ces concentrations sont restées relativement constantes dans le biofilm pour ces différentes conditions d'opération.

Les résultats obtenus ont confirmé qu'il existe une adaptation progressive de la souche NL23 à l'augmentation des concentrations de NaCl. La relation entre la performance du bioréacteur est cohérente avec ce qui a été observé lors de la quantification des souches. Au moment où la concentration de NaCl était supérieure à 2%, une diminution du nombre de cellules de la souche NL23 a été observée dans la biomasse en suspension et dans le biofilm, suggérant une difficulté à croître en milieu salin.

Bio-réacteur	NaCl % (w/v)	Concentration totale du gène/support Biofilm			Concentration totale du gène/ml Suspension		
		JAM1 <i>narG1</i>	NL23 <i>napA</i>	Ratio JAM1/NL23	JAM1 <i>narG1</i>	NL23 <i>napA</i>	Ratio JAM1/NL23
<b>B2</b> <b>(JAM1/NL23)</b>	0.5	9,28E+07	1,14E+07	8/1	8,71E+08	3,24E+07	27/1
	1.0	Nm	Nm	Nm	4,62E+08	2,92E+07	16/1
	2.0	Nm	Nm	Nm	2,33E+08	4,02E+06	58/1
	2.75	2,62E+08	1,28E+07	20/1	1,44E+08	1,88E+06	76/1
	IO+suppl.	1,82E+08	8,13E+06	15/1	6,92E+07	1,36E+06	51/1

Tableau 5.6 Quantification des souches JAM1 et NL23 par qPCR. Nm : Non mesuré

### 5.7.3. Bio-réacteur 3

Le troisième bioréacteur a été conçu dans un but comparatif. Ce réacteur a été lancé avec la souche NL23 uniquement. Cette expérience a été réalisée pour observer la dynamique de croissance et de dénitrification de la bactérie lorsqu'elle était exposée aux différentes concentrations de NaCl. Les conditions de croissance et de développement du biofilm ont été les mêmes que celles utilisées précédemment. La bactérie a été précédemment stimulée, dans sa pré-culture, avec 300 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L de nitrate dans des conditions anoxiques.

Bio- réacteur	Concentration NaCl % (w / v)	Concentration NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg-N / L	Méthanol % (v / v)	C / N	Adaptation du Biofilm (jours)	Production Gaz (ml/24h)
<b>B3 NL23</b>	0 air	300	0,1	2,5	3	Nm
	0	300	0,1	2,5	24	150
	0.5	300	0,1	2,5	11	138
	1.0	300	0.3	7,4	5	142
	2.0	300	0.3	7,4	9	92
	2.75	300	0.3	7,4	13	26
	IO + suppl	300	0.3	7,4	0	0

Tableau 5.7 Conditions d'opération du bio-réacteur 3. Nm : Non mesuré

Initialement, le bioréacteur a été opéré avec du milieu Methylophaga 1403 à 0% NaCl dans des conditions oxygènes pendant trois jours pour stimuler sa croissance (Tableau 5.7). Après cette période, les conditions anoxiques ont été établies par l'addition de nitrate. Sous ces conditions avec plusieurs changements de milieu, le réacteur a pu produire une moyenne de 150 ml de gaz après 24 jours, ce qui permettait d'observer une dynamique de dénitrification efficace.

Après avoir observé une dynamique de dénitrification constante, nous avons débuté l'adaptation de la souche NL23 aux différentes concentrations de NaCl. À une concentration de 0,5% et 1% de NaCl, le réacteur a mis moins de temps pour se stabiliser et produire une quantité similaire de gaz qu'à 0% de NaCl. Nous avons constaté une diminution de 50% de la production de gaz à 2% de NaCl. Cette production a été affectée lorsque le réacteur a été opéré avec 2,75% de NaCl, la production de gaz était d'environ 17% comparée aux conditions d'opération à 0% NaCl. Dans le milieu IO aucune production de gaz n'a été observée.

#### **5.7.3.1. Détermination du nitrate et du nitrite**

Le nitrate était complètement réduit en moins de 30 h sans accumulation transitoire de nitrite dans le réacteur opéré avec des concentrations de 0 à 1% de NaCl (Fig. 5.26). À 2% de NaCl, le réacteur a vu sa vitesse de réduction du nitrate diminuer, prenant plus de 36 h à réduire 300 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L de nitrate, avec une forte accumulation du nitrite qui a pris également 36 h à être réduit. Finalement, en exposant la souche NL23 à la concentration 2,75% NaCl, il est constaté qu'elle n'a pu réduire que 32% du nitrate présent dans le milieu de culture dans une période de 46 heures. De même, une concentration élevée de nitrites est apparue après 25 h qui n'a pas été totalement réduite.

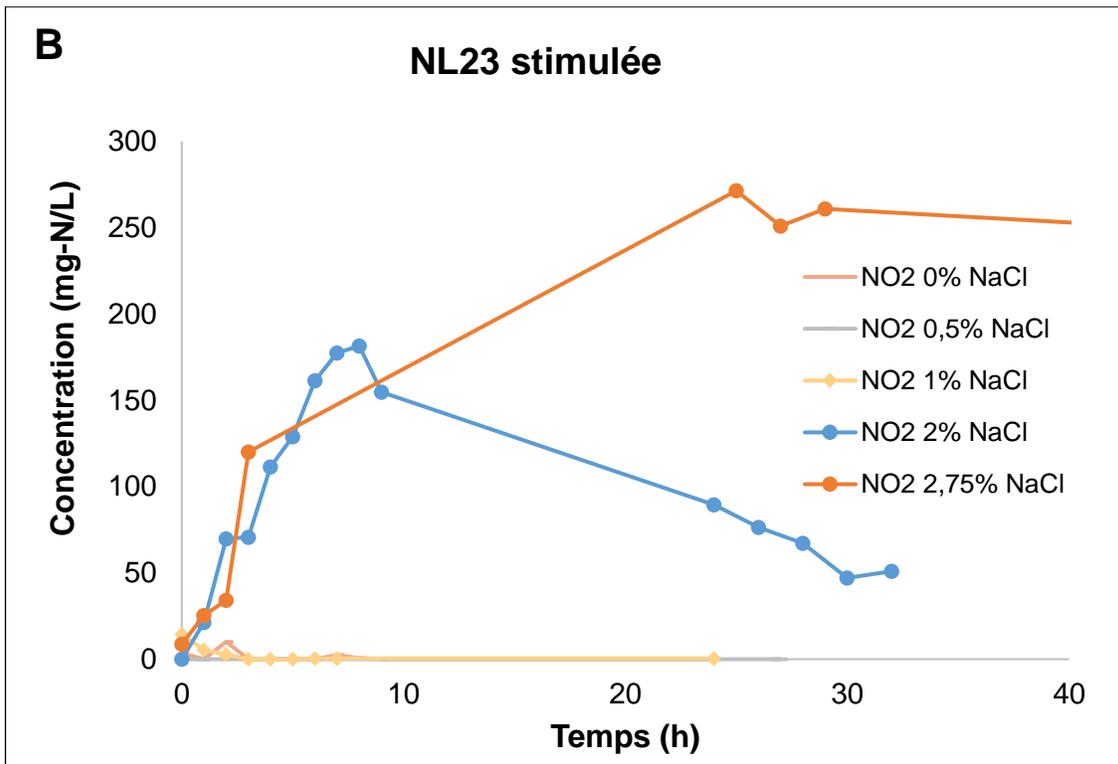
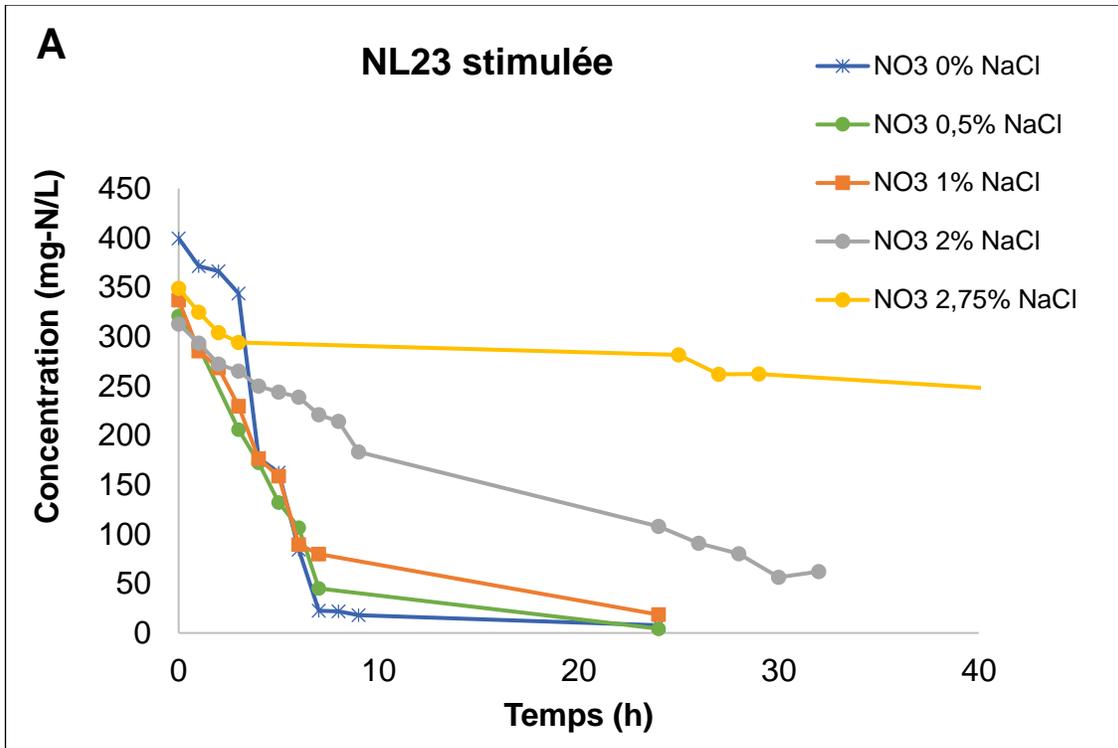


Figure 5.26 Activité dénitrifiante du bioréacteur 3. Réduction de nitrates (A), et nitrites (B).

Bio- réacteur	Concentration NaCl % (w / v)	Concentration NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg-N / L	Taux de dénitrification (mg-N L-1 h-1)	Quantité en mg	Quantité en mg	Taux de dénitrification spécifique (mg-N/ L h-1 mg-protéines-1)
				de protéines par 260 supports	de protéines par 500 ml	
				Biofilm	Suspension	
	0 air	300	Nm	Nm	Nm	Nm
	0	300	17,77	Nm	73,22	0,24
	0.5	300	9,59	3,63	49,22	0,19
<b>B3 NL23</b>	1.0	300	9,97	16,34	67,29	0,12
	2.0	300	8,35	18,59	78,25	0,08
	2.75	300	4,16	6	27,64	0,12
	IO + suppl.	300	Nm	Nm	23,9	Nm

**Tableau 5.8 Bioréacteur 3. Taux de dénitrification et taux spécifiques de dénitrification du bioréacteur 3.** Les taux ont été calculés à partir des données obtenues de la vitesse de réduction du nitrate plus nitrite (NO<sub>x</sub>) et de la concentration de protéines sur les supports et dans la biomasse en suspension. Nm : non mesuré

Le taux de dénitrification calculé pour la concentration 0% NaCl a été de 17,77 mg N.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> le plus élevé parmi toutes les concentrations évaluées (Tableau 5.8). À des concentrations de 0,5% et 1 % NaCl, le taux de dénitrification ont été autour de 9,7 mg N.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> avec un taux de dénitrification spécifique de 0,19 et 0,12 mg N.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> .mg-protéines<sup>-1</sup> respectivement. Une diminution dans le taux de dénitrification et le taux de dénitrification spécifique avec l'augmentation de la concentration de NaCl au-dessus de 1% NaCl ont été observées. La souche NL23 a commencé à avoir des difficultés à s'adapter et à réaliser une dénitrification efficace à une concentration de 2% NaCl. Une diminution à la moitié dans le taux de dénitrification a été observée a une concentration de 2,75% NaCl, tandis que le taux de dénitrification spécifique a montré resté le même avec la concentration 1% NaCl à 0,12 mg N.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> .mg-protéines<sup>-1</sup>. Ces mesures n'ont été calculées avec le milieu IO car la souche NL23 n'était pas capable de réduire efficacement le nitrate présent dans le milieu.

5.7.3.2. Quantification de la souche NL23 dans le bioréacteur 3

Bio-réacteur	NaCl % (w / v)	Concentration totale	Concentration totale
		du gène/support Biofilm <i>napA</i>	du gène/ml Suspension <i>napA</i>
B3 (NL23)	0	Nm	6,74E+07
	0.5	2,33E+07	2,73E+07
	1.0	1,54E+07	1,99E+07
	2.0	8,16E+06	1,03E+07
	2.75	6,87E+06	Nm

Tableau 5.9 Quantification de la souche NL23 par qPCR. Nm : Non mesuré.

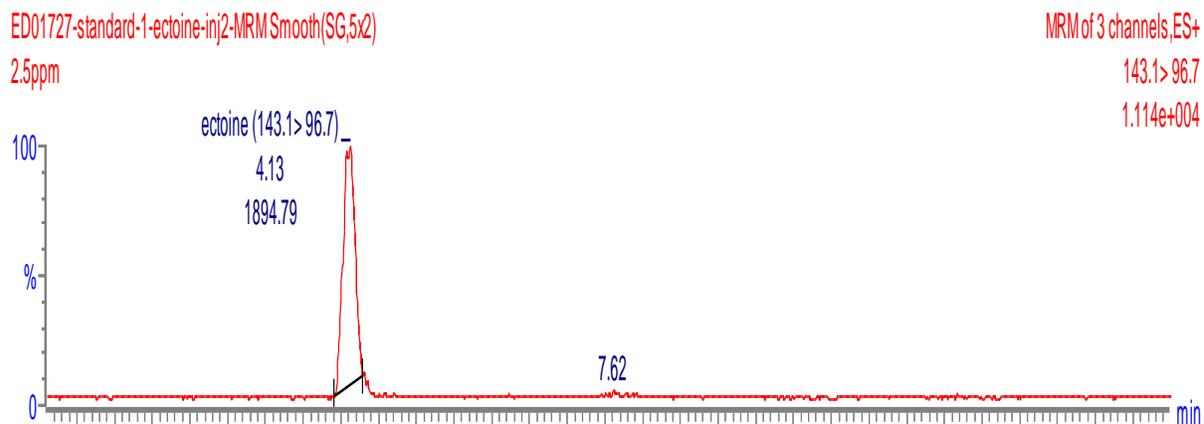
Nous avons constaté que la souche NL23 diminuait en concentration soit dans le biofilm ou en suspension à mesure que la concentration en NaCl augmentait (Tableau 5.9). Cette diminution était de 3 fois dans le biofilm de 0.5% NaCl à 2.75% NaCl. Cette diminution était de 6.7 fois dans la biomasse en suspension.

## **Objectif 5 : Détecter la production de l'osmoprotectant ectoïne le biofilm en co-culture**

### **5.8. Analyse de l'ectoïne dans le bioréacteur**

Dans un premier temps, une analyse préliminaire a été effectuée pour déterminer si l'ectoïne produite par la souche JAM1 était une ectoïne qui était libérée dans le milieu de façon extracellulaire ou était produite intracellulairement. Les résultats obtenus par des cultures en fioles pour cette analyse ont montré que la quantité l'ectoïne extracellulaire était insignifiante par rapport à la quantité d'ectoïne trouvée dans les extraits de biomasse de la souche JAM1. Il a donc été déterminé que les extractions seraient faites à partir de la biomasse récupérée du bioréacteur, soit de la biomasse en suspension et du Biofilm.

La quantification de l'ectoïne dans les divers extraits a été réalisée par spectrométrie de masse. Cette méthode couplée à la chromatographie liquide est une technique d'analyse de pointe très appréciée en raison de sa grande sensibilité et sélectivité. Le spectromètre utilisé est un Quattro Premier XE mass spectrometer (Waters) équipé d'une interface Z-spray permettant l'ionisation par électronébulisation. Nous avons choisi le mode MRM (multiple reaction monitoring) pour le mode de détection car ce mode offre une plus grande sélectivité. Il permet en effet de suivre la transition ion parent > ion fils d'une molécule donnée. Dans le cas de l'ectoïne dont la masse en mode positif est  $m/z$  143.1, nous avons suivi la transition  $143.1 > 96.7$ . Nous avons utilisé comme standard interne le HHQ-D<sub>4</sub>, une hydroxy-alkylquinoline deutérée introduite dans tous les échantillons à concentration fixe. C'est une molécule très stable en LC-MS et qu'il est peu probable de retrouver dans les extraits, d'où son choix. Pour la quantification de l'ectoïne, nous avons réalisé au préalable une droite d'étalonnage en injectant des solutions à différentes concentrations d'ectoïne pure commerciale. Nous avons ensuite injecté les extraits dans les mêmes conditions d'analyses que celles utilisées pour les solutions standards d'ectoïne (Fig. 5.27).



**Figure 5.27** Chromatogramme du pic obtenu de l'ectoïne commerciale. L'ectoïne sort avec un temps de rétention de 4 min et un ( $m/z$ ) de 143,1.

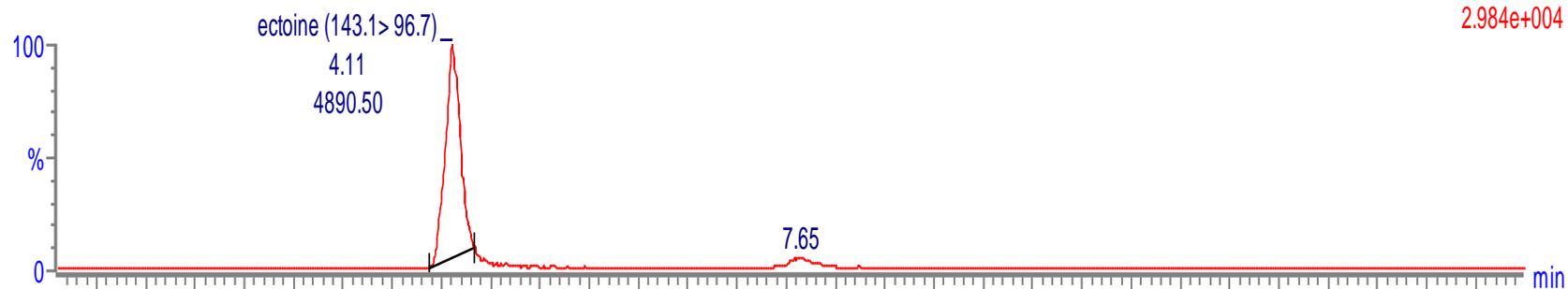
Nous avons observé que la concentration de l'ectoïne dans la biomasse en suspension était négligeable dans les réacteurs 1 et 2 lorsqu'opéré à des concentrations variantes entre 0.5 et 2% de NaCl. Une faible concentration d'ectoïne a été détectée dans la biomasse lorsque les réacteurs étaient opérés à 2.75% et avec le milieu IO (Fig. 5.28). Pour ce qui est du biofilm, nous avons pu détecter de l'ectoïne dans toutes les conditions d'opération. La concentration était la plus élevée dans les réacteurs 1 et 2 opérés avec le milieu IO (Tableau 5.10).

ED01727-prod-ectoine-B2-IOsupp-ROSE-MRM Smooth(SG,5x2)

MRM of 3 channels, ES+

143.1 > 96.7

2.984e+004



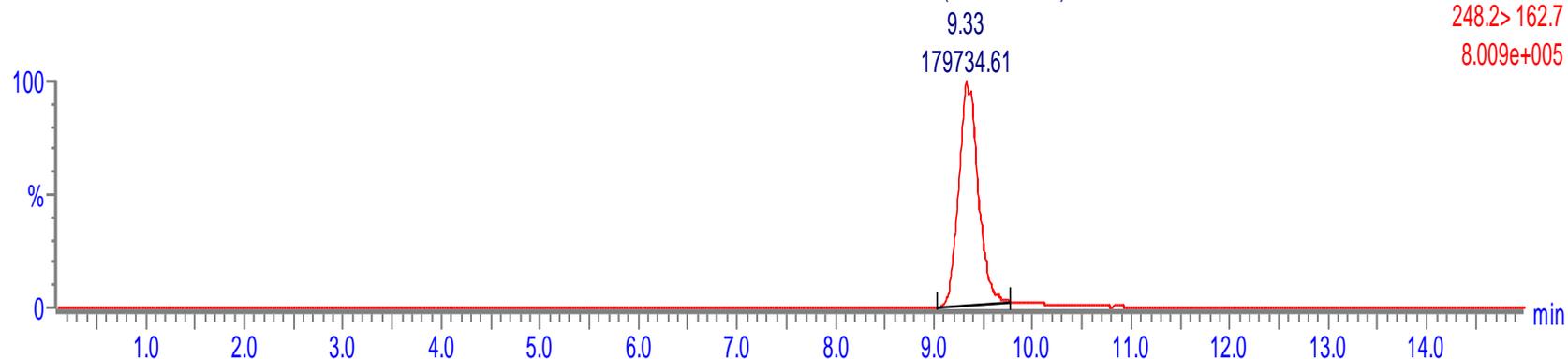
ED01727-prod-ectoine-B2-IOsupp-ROSE-MRM Smooth(SG,5x2)

HHQ-D4 (248.2 > 162.7)

MRM of 3 channels, ES+

248.2 > 162.7

8.009e+005



**Figure 5.28 Chromatogramme LC-MS en mode MRM des pics correspondant à la production d'ectoine (m/z 143) dans le bioréacteur. Le HHQD-4 a été utilisé comme standard interne pour la quantification de l'ectoine. Chromatogramme de l'extrait provenant du milieu IO dans le biofilm. Chaque chromatogramme est accompagné d'un contrôle interne effectué au cours de la détermination.**

Concentration de NaCl et état cellulaire	Concentration ectoïne (ppm)
B1-0.5% suspension	0,0
B1-1% suspension	0,0
B1-10 Biofilm	<b>4,9</b>
B2-0.5% suspension	0,0
B2-0,5% Biofilm	<b>0,3</b>
B2-1% suspension	0,0
B2-1% Biofilm	<b>0,2</b>
B2-2% suspension	0,0
B2-2% Biofilm	<b>0,7</b>
B2-2.75% suspension	<b>0,7</b>
B2-2,75% Biofilm	<b>0,9</b>
B2-10 suspension	<b>0,1</b>
B2-10 Biofilm	<b>8,7</b>

**Tableau 5.10** Concentration de l'ectoïne dans les bioréacteurs 1 et 2.

**Objectif 6. Mesurer le changement du niveau d'expression des gènes de dénitrification dans les co-cultures**

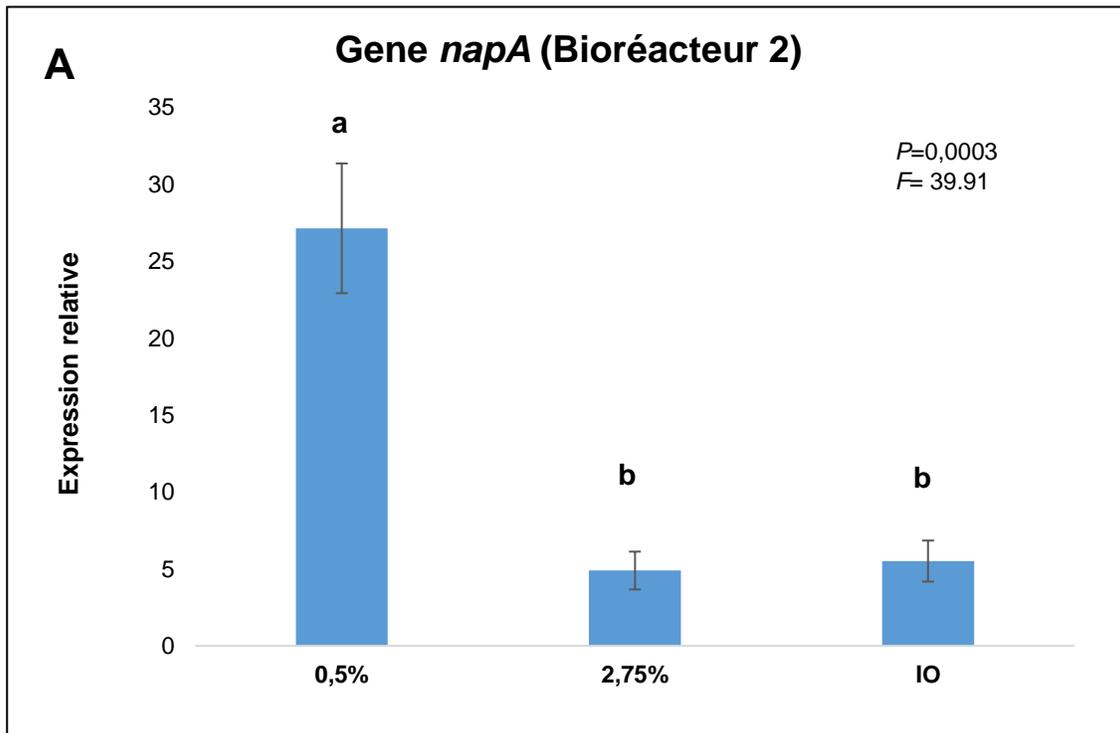
**5.9. Changement du niveau d'expression des gènes de dénitrification des souches JAM1 et NL23 dans le bioréacteur**

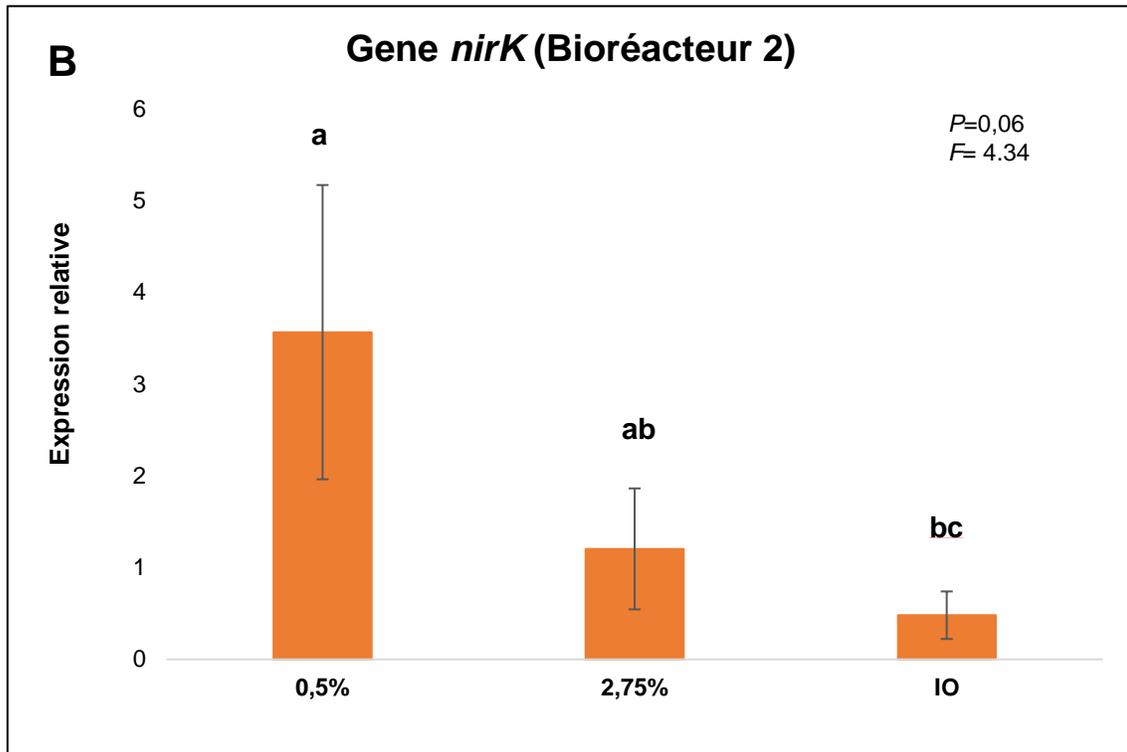
La mesure du taux de transcrits des nitrate et nitrite réductases (*napA* et *nirK*) de la souche NL23 pendant la co-culture à l'intérieur du deuxième bioréacteur a été comparée avec l'expression de ceux-ci dans le troisième bioréacteur, dans lequel la souche NL23 s'y trouvait seule (Tableau 5.11). Cette comparaison a été effectuée afin de déterminer s'il y avait une différence dans l'expression des gènes lorsque les souches se trouvaient ensemble effectuant le processus de dénitrification. Au niveau du bioréacteur 2, il a été possible d'établir que les deux gènes autant de la souche JAM1 que la souche NL23 ont subi une forte diminution de leur expression, passant d'une concentration de 0,5% à 2,75% NaCl. La nitrate réductase *narG2*, ainsi que la nitrite réductase *nirK* ont été moins exprimées et fortement affectées par les changements de concentration à l'intérieur du bioréacteur.

Concentration NaCl	Souche NL23				Souche JAM1	
	Expression relative				Expression relative	
	<i>napA</i>		<i>nirK</i>		<i>narG1</i>	<i>narG2</i>
	B2	B3	B2	B3	B2	
0.5%	27,14	6,06	3,57	0,76	21,22	6,79
2%	Nm	3,81	Nm	1,22	Nm	Nm
2.75%	4,9	Nm	1,2	Nm	1,13	4,61
I.O	5,51	Nm	0,48	Nm	4,99	1,3

**Tableau 5.11 Résultats de l'expression relative des deux nitrate réductases *narG1* et *narG2* de la souche JAM1 (Bioréacteur 2), la nitrate réductase *napA* et la nitrite réductase *nirK* de la souche NL23 (Bioréacteur 2 et 3), pour les différentes concentrations de NaCl évaluées. Les valeurs sont exprimées en nombre de copies du gène / nombre de copies des gènes de référence *rpoB* et *dnaG*. Nm: non mesuré**

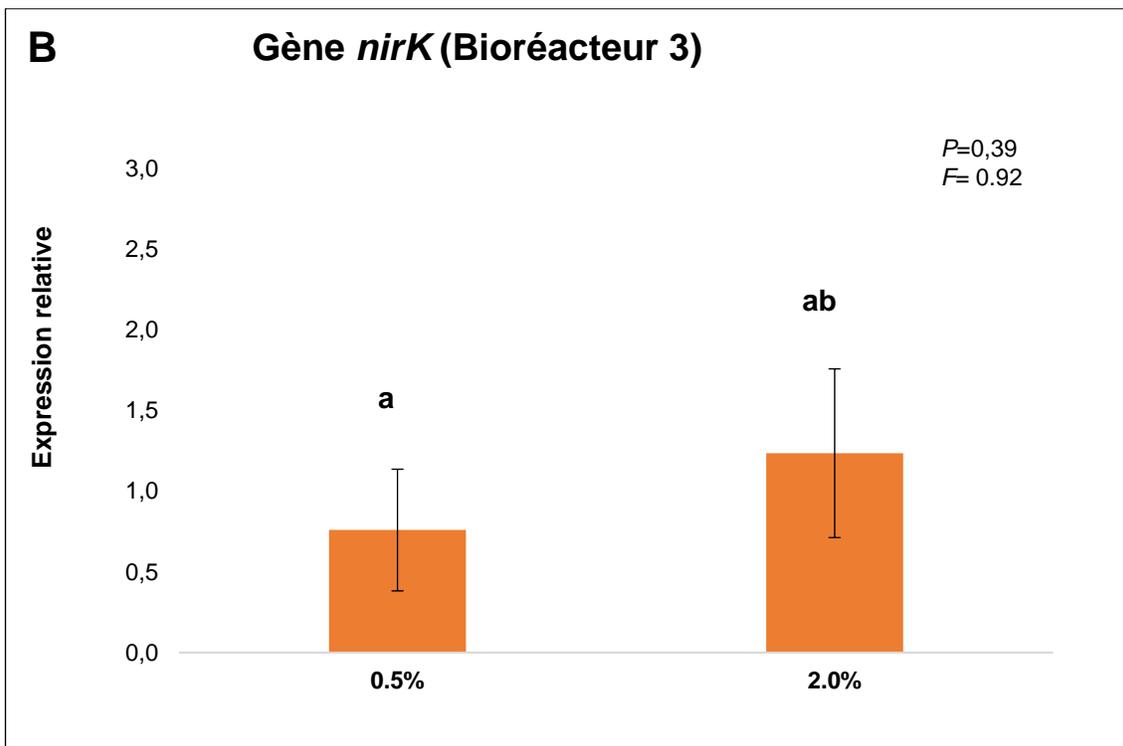
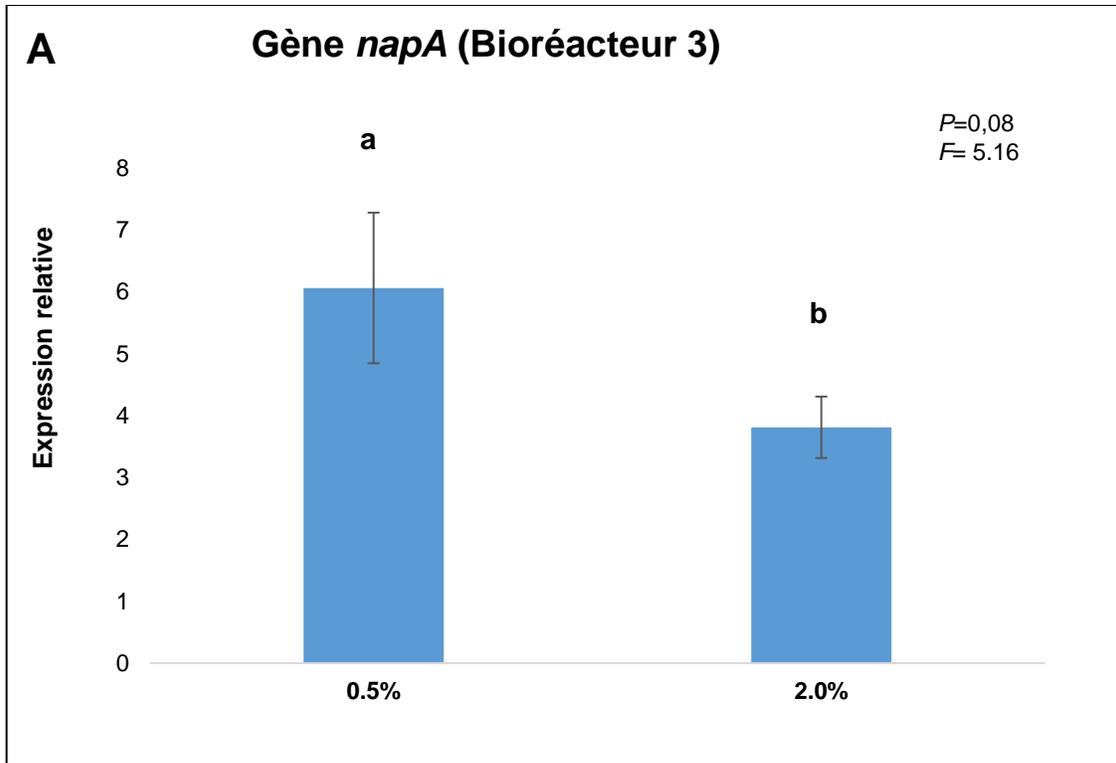
Dans le cas de la souche NL23 dans le bioréacteur 2 (Tableau 5.11; Fig. 5.30), le niveau de l'expression du gène *napA* était plus élevé dans la concentration de 0,5% NaCl (environ 5 fois;  $P < 0.05$ ), par rapport à la concentration de 2,75% et IO, lesquelles ont montré un niveau d'expression similaire. Un résultat semblable a été obtenu avec les niveaux de transcription du gène *nirK* (3 à 7 fois plus exprimé;  $P < 0.05$ ). Ces résultats mettent en évidence la difficulté de la souche NL23 à réduire les concentrations de nitrate et de nitrite à mesure que la concentration de NaCl augmentait.





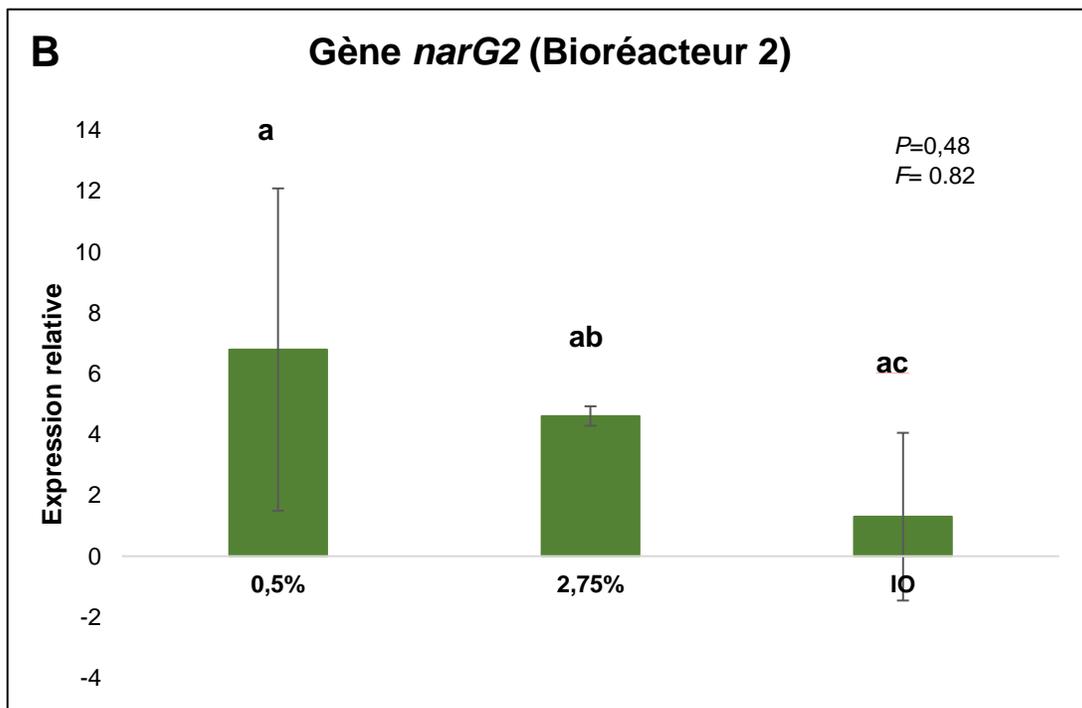
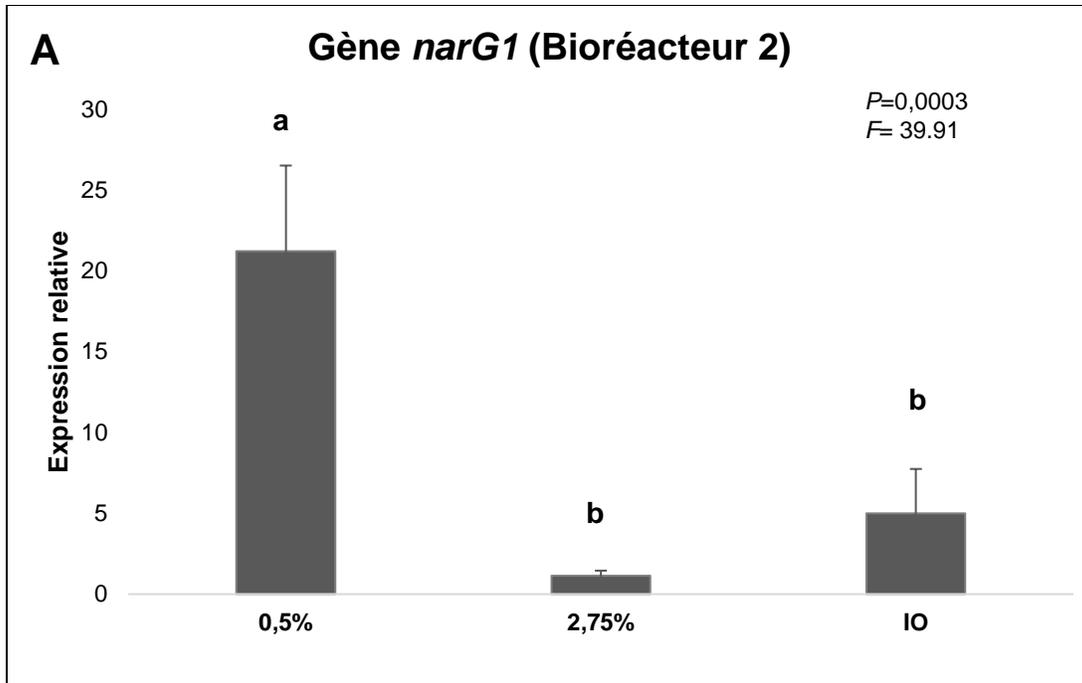
**Figure 5.30 Expression relative de la nitrate réductase *napA* et de la nitrite réductase *nirK* de la souche NL23.** L'analyse de la réponse des gènes de la souche NL23 en co-culture aux changements de concentration de NaCl, pendant le développement du biofilm dans le bioréacteur (B2). Les barres d'erreur représentent de l'écart type des valeurs en triplicata venant de différentes réactions (One-way analysis of Variance,  $p < 0,05$ . Tukey's Multiple Comparison test).

Dans le réacteur 3, l'expression de *napA* était environ 4 fois moins élevée que dans le biofilm du réacteur 2 opéré dans les deux cas avec 0,5% NaCl (Tableau 5.11). Par contre, son expression était similaire entre le réacteur 3 opéré à 2% NaCl et le réacteur 2 opéré à 2.75% NaCl et le milieu IO. En ce qui concerne l'expression de *nirK*, une diminution de 5 fois des niveaux de transcription a été mesurée dans le réacteur 3 opéré à 0.5% par rapport au réacteur 2 opéré dans les mêmes conditions. Les niveaux de *nirK* étaient similaires dans le réacteur 3 opéré à 2% NaCl et le réacteur 2 opéré à 2.75% NaCl. Une diminution de 3 fois a été toutefois observée dans le réacteur 2 opéré avec le milieu IO.



**Figure 5.31 Expression relative de *napA* et *nirK* dans le bioréacteur 3.** Les niveaux d'expression ont été mesurés à une concentration de 0,5 et 2,0 % NaCl. Les barres d'erreur représentent l'écart type des valeurs en triplicata (One-way analysis of Variance,  $p<0,05$ . t test).

Le niveau d'expression du gène *narG1* de la souche JAM1 était 25 fois plus élevé dans le réacteur opéré à 0,5% NaCl par rapport aux conditions à 2,75% NaCl, et 5 fois supérieur à ce qui a été observé dans le réacteur 2 opéré avec le milieu IO (Tableau 5.11; Fig. 5.32A). Les niveaux d'expression de *narG2* n'ont pas présenté de différences significatives entre les concentrations évaluées (Tableau 5.12; Fig. 5.32B).



**Figure 5.32 Expression relative des deux nitrate réductases *narG1* et *narG2* dans la souche JAM1.** Analyse de la réponse de la souche JAM1 en co-culture aux changements des concentrations de NaCl de 0,5 %, 2,75 % et IO, dans le bioréacteur 2. Les barres d'erreur représentent l'écart type des valeurs en triplicata (One-way analysis of Variance,  $p < 0,05$ . Tukey's Multiple Comparison test).

## 6. DISCUSSION

Un modèle de co-cultures avec deux bactéries méthylophages *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 a été développé afin de fournir des connaissances sur les facteurs qui peuvent induire une interaction étroite parmi ce type de bactéries. L'influence de fortes concentrations de NaCl, les traits physiologiques de chaque souche, l'échange de métabolites produits et l'interaction physique ont été des paramètres qui ont été évalués dans le cadre de cette étude.

Les études des communautés synthétiques sont des modèles efficaces pour fournir un aperçu des capacités des microorganismes dans un environnement donné, de leurs interactions métaboliques. Ceci permet d'obtenir des données cohérentes afin d'élucider efficacement les interactions inter-espèces des bactéries impliquées, simplifiant la complexité des écosystèmes et permettant son application au niveau biotechnologique (De Roy et al., 2014) Nous avons combiné des expériences de monocultures et de co-cultures avec des résultats qui peuvent aider à optimiser les performances des systèmes de dénitrification utilisés pour traiter les eaux usées des aquariums, des eaux usées industrielles salines ou les aquacultures. Ces résultats serviront d'outil pour comprendre les communautés multi-espèces marines, impliquées dans les activités dénitrifiantes et pour concevoir des applications industrielles potentielles.

### 6.1. Traits physiologiques entre les deux souches

Dans une communauté bactérienne, les caractères physiologiques spécifiques de chaque espèce jouent un rôle important dans l'interaction entre les micro-organismes impliqués. Les interactions entre microorganismes peuvent affecter positivement ou négativement le comportement de la communauté. Dans cette étude, Il était nécessaire d'établir si un certain type de relation était établi entre *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. Il était fondamental de comprendre si les deux espèces communiquaient entre elles, si une telle interaction se produit par libération de molécules dans l'environnement ou par contact direct entre elles. Deuxièmement, il était nécessaire de déterminer si la concentration de substrat (nitrate) a une incidence sur la vitesse de croissance des souches lorsqu'elles se retrouvent en co-cultures pouvant influencer leur comportement et leur relation.

### 6.1.1. Affinité du nitrate par les souches JAM1 et NL23

La dynamique de l'absorption du substrat a été évaluée pour les souches dans une gamme de concentration comprise entre 28 et 560 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L, sous des conditions anoxiques. Ceci a permis d'établir les paramètres cinétiques nécessaires pour identifier s'il existe un avantage métabolique de l'une des souches par rapport à l'autre. Les figures 5.1 et 5.2 montrent que les deux souches présentent une tendance de croissance similaire par rapport à l'augmentation des concentrations du nitrate dans le milieu de culture. Cependant, une différence dans la dynamique d'assimilation du nitrate était remarquable entre elles. La souche JAM1 a commencé sa croissance presque immédiatement sans phase de retard, tandis que la souche NL23 a présenté une phase de latence égale ou supérieure à 72 heures, avant de consommer le nitrate présent dans le milieu de culture et de commencer à croître. De sorte qu'il donne d'emblée un plus grand avantage de croissance à la souche JAM1.

La dynamique de dénitrification des souches JAM1 et NL23 a été similaire à celui trouvé pendant le suivi de la croissance des souches (figures 5.3 et 5.4). La figure 5.3 A montre que la souche JAM1 a réduit toutes les concentrations du nitrate évaluées. Dans des concentrations inférieures à 280 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L la souche a pris un laps de temps de 6 heures et à des concentrations supérieures à celle-ci, elle a pris entre 24 à 36 heures avec une production équivalente de nitrite. Une accumulation de nitrite considérable dans le milieu de culture a été observée à des concentrations plus élevées de 350 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L (fig. 5.3 B). Le nitrite est un intermédiaire de la dénitrification biologique et peut s'accumuler en quantités importantes pendant la dénitrification du nitrate en fonction de certaines conditions, notamment la température, le pH, la concentration en nitrate et la salinité (Denton L, 1995, Thomsen et al., 1994; Glass et al., 1997a).

Plusieurs études ont montré que différentes activités de réduction sont en compétition pour les mêmes donneurs d'électrons. Lorsqu'une étape de réduction dépasse la suivante, l'intermédiaire s'accumule. Dans la dénitrification l'inhibition de la croissance bactérienne par accumulation de nitrite est donnée par un découplage du métabolisme primaire (Almeida et al., 1995). La dénitrification peut s'effectuer sur une large gamme de concentrations en nitrate. Cependant, Balderston et collaborateurs (1976) ont signalé une inhibition des cultures pures de *Methanobacterium thermoautotrophicum* et *Methanobacterium formicicum*. Dans l'étude Balderston ont vu

que la croissance de ces souches a été partiellement inhibée à des concentrations de 130 mg-N/L de nitrate et sévèrement à complètement inhibée en présence de 13 mg-N/L de nitrite. Plusieurs études ont montré que des concentrations élevées de nitrate ont un effet d'inhibition faible à modérée sur la croissance des microorganismes alors que l'inhibition induite par le nitrite est très sévère, même si les bactéries possèdent la machinerie enzymatique pour l'utiliser (Kluber et al 1998 ; Clarens et al., 1998; Glass et Silverstein, 1997b).

Dans le cas de la souche NL23, elle a effectivement réduit toutes les concentrations de nitrate testées (28 à 560 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L) et de nitrite produit dans le milieu de culture, mais cela a pris plus de 72 heures pour initier une réduction efficace du nitrate (figures 5.4 A et B respectivement). Les résultats obtenus de la réduction du nitrate et nitrite ont montré que la voie de dénitrification est étroitement régulée dans la souche NL23 dans des conditions anoxiques, ce qui n'est pas le cas dans la souche JAM1.

Les données obtenues à partir des profils de croissance et de réduction du nitrate et du nitrite ont été utilisées pour interpréter certains paramètres cinétiques de chaque souche. Il est bien connu que la relation entre la vitesse de réaction et la concentration de substrat dépend de l'affinité de l'enzyme pour son substrat (Eisenthal et al., 2007). Dans notre cas, l'évaluation de la vitesse de croissance de chaque souche en fonction de la concentration de substrat nous a permis d'estimer le  $K_m$  et  $\mu_{max}$  (fig 5.5). À partir de ces données il a été possible prédire si l'une des souches pouvait être affectée par la disponibilité du substrat dans le milieu lors des co-cultivés. À fin d'assurer que le facteur limitant était l'activité de l'enzyme elle-même, et non la quantité de substrat disponible, nous avons utilisé des concentrations de substrat suffisamment élevée (28 à 560 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L), pour garantir que l'enzyme agit à  $\mu_{max}$ .

Nos observations sur la dynamique d'assimilation du nitrate, soutiennent l'hypothèse que la souche JAM1 est capable de prendre le substrat d'une manière plus efficace que la souche NL23. La souche JAM1 a un  $\mu_{max}$  de croissance ( $0,01638 \text{ h}^{-1}$ ), par rapport à la souche NL23 ( $0,01527 \text{ h}^{-1}$ ) avec un  $K_m$  de 9,145 mM (128,1 mg N / L) et 58,22 mM (816,1 mg N / L) respectivement. Les données obtenues de l'analyse de l'efficacité catalytique (ratio  $\mu_{max}/K_m$ ) entre les souches JAM1 et NL23 ont montré que la souche JAM1 a une affinité pour le substrat 6,3 fois plus élevé par rapport à la souche NL23, ce qui lui donne un énorme avantage pour réduire le nitrate et croître plus rapidement dans le milieu de culture. Ce comportement peut être attribué au fait que les

deux souches ont des types de nitrate réductases différents. La souche JAM1 possède deux types Nar associé à la membrane cytoplasmique (Nar1 et Nar2), qui contribuent à la fois à la croissance de la souche JAM1 dans des conditions anoxiques (Mauffrey et al., 2015). Le système Nar génère une force motrice protonique (PMF) qui donne de l'énergie aux cellules pour pousser (Moreno-Vivian et al., 1999). La souche NL23 a une nitrate réductase de type Nap (Martineau et al., 2015), qui ne génère pas de PMF lors de la réduction du nitrate. Les espèces avec une croissance plus rapide peuvent dépasser celles qui se divisent très lentement, entraînant ainsi un déséquilibre des communications de cellule à cellule ou des composés inhibiteurs que peuvent être produits et qui entraînent à l'inactivation des cellules à proximité immédiate (Joint et al., 2010).

### **6.1.2. Antagonisme entre les souches JAM1 et NL23**

Les interactions inter-espèces peuvent montrer des effets antagonistes sur d'autres souches pouvant affecter l'équilibre des populations présentes dans un environnement donné. La production d'un métabolite pourrait donner à un organisme un avantage compétitif lorsqu'il interagit avec d'autres microbes, à la fois pour s'implanter dans un nouvel environnement et aussi pour empêcher la colonisation d'un concurrent potentiel (Russel et al., 2017; Ramirez et al., 2014; Pérez y Terron et al., 2014). Les interactions spécifiques à la croissance et la production de métabolites doivent être prises en compte pour décrire adéquatement la colonisation bactérienne des deux souches sur les supports pour la formation du biofilm.

L'épuisement des nutriments génère des réponses de stress chez les microbes, telles que la motilité, la sécrétion d'enzymes extracellulaires, la compétence pour la transformation génétique, production d'antibiotiques ou d'autres composés bioactifs (Granada et al., 2014 ; Hibbing M et al., 2010). La concurrence des ressources entraîne l'évolution de la concurrence des interférences, c'est-à-dire l'antagonisme (Case et Galpin, 1974). Des conditions limitantes des sels et du glucose dans un milieu minimal stimulent la production de molécules impliquées dans l'antagonisme (Ruyters et al., 2013). Les expériences d'interaction interspécifique ou d'antagonisme ont été réalisées en milieux solides pour distinguer les interactions dues à des composés diffusibles. Elles ont été réalisées en utilisant trois méthodologies différentes, la première par l'inhibition simultanée (fig. 5.7), la deuxième par diffusion sur gélose (fig. 5.8) et la troisième par détection en sensi-disques (fig. 5.9). Les résultats des trois tests d'antagonisme réalisés sur milieu solide, ils ont montré que la présence de la souche bactérienne réside sur la

gélose, soit la souche JAM1 ou la souche NL23, n'a pas augmenté ou diminué le taux de colonisation de l'autre souche. L'absence des halos d'inhibition a dévoilé qu'il n'y a pas une activité inhibitrice dérivée de la production de métabolites diffusibles secrétées par les souches qui puisse affecter négativement la croissance de l'autre ou même la stimuler.

Madsen et al. (2016) ont étudié des co-cultures de souches bactériennes et ont trouvé que l'effet antagoniste est plus fort dans la coexistence entre des souches étroitement apparentées. Tandis que Vetsigian et al., (2011) ont examiné la concurrence des congénères chez des espèces de *Streptomyces*. Vetsigian et collaborateurs ont trouvé que les souches phylogénétiquement apparentées étaient moins concurrentes que les souches plus éloignées (Russel et al., 2017). Dans notre cas, les souches, bien qu'elles coexistent dans le biofilm, ne présentent aucun type d'interaction négative. Au contraire, elles semblent travailler en étroite collaboration pour un bien commun, qui est celui de réduire les concentrations de nitrate présent dans le milieu de culture.

Les bactéries marines qui habitent dans des agrégats sont physiquement plus stables et présentent moins de restriction des ressources en comparaison des cellules libres (Long et al., 2001). Pour cette raison, il est avantageux que certains groupes microbiens établis dans des agrégats se défendent contre des micro-organismes envahissants, produisant et libérant des substances dans l'environnement afin de réduire le risque de concurrence par les ressources présentes. En fait, Long et Azam (2001) ont montré dans les tests de laboratoire que de nombreuses bactéries marines présentent un comportement antagoniste et ce trait était plus courant avec des bactéries attachées aux particules ou aux supports qu'avec des bactéries en suspension. Également, ils ont observé que ce comportement a été mis en évidence principalement par les membres de des alpha-proteobacteria. Ils ont également constaté que les gamma-protéobactéries (membres des ordres Alteromonadales et Vibrionales) sont les producteurs les plus prolifiques de matériaux inhibiteurs et aussi les plus résistants, tandis que les membres des Bacteroidetes étaient les organismes les moins productifs et les plus sensibles aux interactions antagonistes.

La plupart des études sur les interactions entre microorganismes au sein des biofilms se sont concentrées sur les aspects bénéfiques de ces relations. Cependant, c'est important de connaître que toutes les interactions ne sont pas bénéfiques et que les interactions antagonistes peuvent également jouer un rôle important dans le développement des communautés microbiennes au sein du biofilm. La production de

composés antimicrobiens, dont des toxines, des enzymes bactériolytiques, des bactériophages, des antibiotiques et des bactériocines, semble être un phénomène générique pour la plupart des bactéries (Riley, 1998).

### 6.1.3. Communication cellulaire : Quorum sensing

La communication de cellule à cellule joue un rôle dans l'organisation et différenciation des cellules dans les biofilms selon les conditions environnementales. La production de phéromones diffusibles a été évaluée en co-cultures sous l'hypothèse d'une synergie présente entre les deux souches. La relation entre la formation du biofilm et la communication entre les souches JAM1 et NL23 a été évaluée en déterminant la production de molécules de signalisation du QS telles que l'acyl-homoserine lactone (HSL). Il a été démontré que le QS est impliqué dans un nombre élevé de processus microbiens dans diverses bactéries Gram-négatives et Gram-positives trouvées dans les sols et les environnements marins et d'eau douce (Doverba, 2016). Les activités sous contrôle du QS comprennent la production de métabolites secondaires, la motilité, la symbiose, la nodulation, le transfert de plasmide conjugal, la maturation du biofilm et la virulence (Joint et al, 2010).

Nous avons évalué la production de l'acyl-HSL à partir des tests réalisés aux surnageants issus de cultures pures des souches. Nous avons utilisé deux souches de *Chromobacterium violaceum* déficientes dans la production de violacéine (pigment violet), pour évaluer la production d'acyl-HSL à chaîne courte et à chaîne longue. Les extraits obtenus à partir de la culture des souches JAM1 et NL23 ont été cultivés sur gélose avec la souche *C. violaceum* pour observer si le rétablissement de la violacéine se produisait. Dans notre étude, aucun signal (production du pigment violet) n'a pas été généré à partir du gène rapporteur intégré dans *C. violaceum* par les souches JAM1 et NL23, suggérant que les deux souches ne produisent pas de l'acyl-HSL. Ces résultats suggèrent donc qu'il n'y a pas de relation de concurrence entre les deux souches dérivées de la production de molécules de communication, du moins en ce qui a trait aux acyl-HSL à chaîne longue ou à chaîne courte. Il n'y a aucune preuve que les *Methylophaga* sp. possèdent les gènes liés à la synthèse d'acyl homosérine lactone. Dans le cas des *Hyphomicrobium* sp., Feng et collaborateurs 2020 ont pu établir que cette espèce possède les gènes liés à l'expression de *rpaI* et *hdtS*, et pouvaient synthétiser des AHL par deux voies de synthèse. Ces observations ont été faites à partir du démarrage d'un système d'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox) dans lequel les performances de l'élimination de l'azote et des

interactions microbiennes entre les bactéries anammox, les hétérotrophes et d'autres microorganismes ont été étudiées.

Cependant, il convient de noter que les souches JAM1 et NL23 sont capables de s'adhérer à des surfaces différentes, formant un biofilm individuellement et en co-cultures dans le milieu de culture marin (fig 5.21 et fig 5.23). Les relations importantes entre la communication de cellule à cellule et la formation de biofilm sont profondément influencées par les conditions expérimentales telles que le milieu de culture. Il existe de nombreuses bactéries qui sont capables de former des biofilms structuraux sans communication de cellule à cellule (Toyofuku et al., 2016).

Armbruster et collaborateurs en 2019 ont montré que l'hétérogénéité des niveaux cellulaires de certaines molécules de signalisation telles que monophosphate cyclique de diguanylate (c-di-GMP) générés en réponse à la détection de surface chez *P. aeruginosa*, conduit à deux sous-populations physiologiquement distinctes qui contribuent chacune à la colonisation de la surface. Ainsi comme Ranava et collaborateurs (2020) ont montré que l'échange de métabolites produits par *C. acetobutylicum* a permis à *D. vulgaris* de dupliquer son ADN et de pousser sans ses substrats, induisant une interaction étroite entre elles, grâce à la production de la molécule de détection de quorum AI-2 qui peut induire la formation d'une structure intercellulaire qui permet directement ou indirectement un échange métabolique et un couplage énergétique entre les deux bactéries.

## **6.2. Cultures planctoniques et co-cultures des souches JAM1 et NL23**

### **6.2.1. Sélection du milieu de culture**

Le développement d'un milieu de culture qui a permis la croissance des deux souches ensemble a été la base fondamentale pour démarrer les co-cultures. Afin d'étudier les interactions entre les souches JAM1 et NL23, il a été nécessaire d'établir les conditions de croissance optimales pour co-cultiver ces deux microorganismes, y compris la composition du milieu, les concentrations de sel, le pH. La composition du milieu de culture est déterminante dans l'établissement de la population dans la co-culture. Certains auteurs comme Weerasekera (2016) et Daniels (2013) ont souligné que le choix du milieu de culture peut avoir un impact profond sur, la capacité d'adhésion des microorganismes à une surface, la capacité de former un biofilm, l'architecture du biofilm et peut affecter la croissance des microorganismes.

Les milieux de culture comme Artificial Seawater (ASW) et l'Instant Ocean (IO) ont été utilisés dans d'autres études pour le suivi et le développement du biofilm original au sein du laboratoire du professeur Villemur (Payette 2014; Auclair et al., 2012; Labbé et al., 2003). L'évaluation des performances individuelles des souches JAM1 et NL23 dans le milieu de culture IO (fig 5.10 et 5.11) ont montré que même lorsque ce milieu de culture supportait la croissance des souches dans le biofilm original, il ne permet pas une croissance adéquate des souches en cultures pures.

Pendant des études menées par Martineau en 2013 et Villeneuve 2013, il a été déterminé les concentrations de NaCl pour la croissance de chaque souche, étaient de 0 à 1% pour la souche NL23 et de 0.5 à 8% pour la souche JAM1. Étant donné la faible croissance de la souche NL23 à des >1% de NaCl, nous n'avons pu faire nos co-cultures dans le milieu IO. Nous avons décidé d'évaluer la croissance des deux souches à des concentrations de 0.5 et 1 % NaCl en utilisant les milieux conçus pour la croissance en cultures pures, dans ce cas, on a utilisé en le milieu 337a pour la croissance de la souche NL23 et Methylophaga 1403 pour la souche JAM1.

La concentration de 0,5 % de NaCl a eu un moindre impact sur la croissance des deux souches. En utilisant le milieu de culture Methylophaga 1403 modifié, une augmentation moyenne du double du nombre de colonies des souches JAM1 et NL23 a été observée par rapport au milieu 337a. La supplémentation utilisée pour compléter le milieu Methylophaga 1403 modifié a entraîné l'augmentation de la croissance de la souche NL23 en comparaison à la réponse obtenue dans le milieu 337a, suggérant ainsi que l'amélioration de la croissance des souches résulte principalement de la teneur globale en sel et la disponibilité d'un mélange d'éléments traces. Bien que la croissance microbienne soit principalement sensible aux concentrations du NaCl, d'autres paramètres tels que la concentration en oxygène, les métaux traces, la pression hydrostatique et les réponses au stress affectent les populations microbiennes marines et doivent être pris en compte (Yetinson et al., 1979). Les taux de réduction pour les différents intermédiaires dans un processus comme la dénitrification et les rapports entre eux dépendent en grande partie des bactéries dénitrifiantes et du milieu de culture utilisé.

## **6.2.2. Co-cultures planctoniques des souches JAM1 et NL23 dans le milieu 1403 0.5% NaCl**

Étant donné que la souche NL23 ne pousse pas dans le milieu marin (NaCl 2.75%) en état planctonique, le milieu Methylophaga 1403 avec une concentration faible en NaCl 0.5% au lieu de 2.75% a été choisi pour la croissance des deux souches en co-cultures. Dans un premier temps, un avantage en proportion a été accordé à la souche NL23, lors de la préparation de l'inoculum pour les tests de co-cultures. Des ratios de 1:5 et 1:10 des souches JAM1:NL23 ont été évalués afin d'améliorer la dynamique d'assimilation du nitrate par la souche *Hyphomicrobium*, étant donné la plus forte affinité de la souche JAM1 au nitrate. Malgré cet avantage en nombre, la souche NL23 n'a pas pu rivaliser efficacement pour le nitrate devant la souche JAM1. Le dénombrement des souches respectives (Fig. 5.17) à la fin des co-cultures (réduction complète du nitrate) nous a permis de confirmer ce qui avait déjà été observé précédemment. La souche JAM1 a été capable de s'établir dans une proportion plus élevée que la souche NL23, bien qu'elle ait été inoculée dans un ratio cinq et dix fois inférieur. Dans les conditions de cultures testées, la souche JAM1 a eu un avantage en termes de compétitivité par rapport à la souche NL23 en raison de sa plus forte affinité pour le nitrate qui lui a permis de métaboliser celui-ci presque immédiatement et en plus de croître à une vitesse plus élevée. Cependant, cela génère un déséquilibre dans la dynamique de dénitrification au sein de la co-culture, car en augmentant la concentration du nitrite dans le milieu, une inhibition de la croissance des deux souches peut se produire en conséquence de son accumulation. Les concentrations élevées en nitrite tendent à inhiber la croissance des souches comme il a été déjà observé pendant les expériences d'affinité (section 5.1). Une accumulation toxique de l'intermédiaire nitrite peut arrêter avec le processus de dénitrification même si les bactéries possèdent la machinerie enzymatique pour l'utiliser (Glass et Silverstein, 1997b). Dans la littérature, il y a des études suggérant que le nitrite inhibe la croissance et l'activité des bactéries par plusieurs moyens différents: (1) le nitrite interfère avec la conservation de l'énergie en inhibant l'absorption d'oxygène, la phosphorylation oxydative et le transport actif (Rowe et al., 1979); (2) le nitrite agit comme un découpleur, provoquant un effondrement du gradient de protons et du métabolisme primaire (Meijer et al; 1979) ; et (3), le nitrite inhibe certaines enzymes métaboliques (O'Leary et al., 1976). Ainsi, le nitrite est un inhibiteur efficace d'un large éventail de types physiologiques de bactéries,

à cause de l'inhibition de la croissance et d'un ralentissement du métabolisme (Yarborough et al., 1980).

### **6.2.3. La stimulation de l'activité dénitrifiante de la souche NL23**

Pour permettre à la souche NL23 de compétitionner efficacement avec la souche JAM1, nous avons préparé des pré-cultures en conditions dénitrifiantes pour ainsi stimuler la voie de dénitrification pour que celle-ci soit bien active lors de l'inoculation de la souche dans les co-cultures. La souche NL23 stimulée a été inoculée aux co-cultures dans la même proportion que la souche JAM1 (ratio 1:1). Ainsi, le profil de croissance des co-cultures a montré un changement dans son comportement par rapport à l'assimilation du nitrate. Cette fois, les co-cultures ont eu un profil de croissance similaire aux cultures pures de la souche NL23, avec une densité optique maximale de 0,650 en 68 heures et de 0,613 en 72 heures, respectivement (fig. 5.18). Une diminution de la phase de latence ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules ont été observées pour ces co-cultures.

Les performances de réduction du nitrate et du nitrite (fig. 5.19 A et B) de la part des co-cultures planctoniques après la stimulation de la souche NL23 se sont améliorées par rapport aux cultures précédentes où la préculture de la souche NL23 n'était pas stimulée. Ainsi, l'accumulation du nitrite était transitoire, et les taux de dénitrification étaient deux fois supérieurs à ceux des cultures pures de la souche NL23. Le dénombrement des deux souches a permis de constater que la souche NL23, quoique toujours en concentrations inférieures à la souche JAM1, était proportionnellement plus élevée dans ces co-cultures, comparativement aux co-cultures avec la souche NL23 non-stimulée.

En démontrant que les deux souches ont des dynamiques différentes pour assimiler le nitrate présent dans le milieu de culture et que la souche JAM1 a une plus grande affinité pour celui-ci, cela permet d'expliquer l'observation récurrente que cette souche se retrouve toujours à des concentrations plus élevées que la souche NL23 dans les co-cultures. Cependant, les co-cultures planctoniques ne reflétaient pas la véritable cohabitation des deux souches dans le milieu marin qui prévalait dans le système de dénitrification d'origine, puisque les co-cultures planctoniques ont été effectuées à une faible concentration de NaCl pour permettre à la souche NL23 de se développer.

Les co-cultures présentent des avantages par rapport aux cultures pures, car il existe un potentiel de l'action synergique des voies métaboliques des souches impliquées. Les microorganismes communiquent entre eux par échange de métabolites et effectuent

une division des tâches pour dégrader les substances plus complexes (Balachandar et al., 2013). Les co-cultures peuvent remplir plusieurs fonctions; une communication définie, une répartition des tâches, la réalisation des tâches combinées de manière équilibrée et en effectuant plusieurs étapes, ce qui est autrement impossible pour un seul microorganisme. Par rapport aux mono-cultures, les co-cultures possèdent une résistance plus élevée aux fluctuations environnementales et offrent une meilleure stabilité tout au long du processus (Brenner et al., 2008).

L'avantage d'utiliser un système de co-cultures est qu'il non seulement améliore le rendement du produit, mais augmente aussi la formation de biofilm en tant que caractéristique potentielle dans un système de fermentation industriel (Zeidan et al., 2010). En plus, Il a été démontré dans de nombreuses études que les biofilms sont moins sensibles que les bactéries en suspension aux changements des conditions environnementales telles que la température et le pH et la présence de produits métaboliques et de substances toxiques (Nakamura et al., 1986; Wobus et al., 1995).

Van Loosdrecht et al., 1990 ont étudié l'influence des interfaces sur l'activité microbienne. Des nombreuses investigations ont démontré que l'adhésion des microorganismes à une surface modifie l'activité des cultures bactériennes. Cependant, les résultats expérimentaux et interprétatives sont souvent contradictoires. Certaines études ont comparé l'état physiologique, phénotypique, le modèle d'expression génique et même la morphologie du biofilm et des cellules planctoniques en déterminant leurs taux de croissance et sensibilité aux changements des conditions environnementales. Certains chercheurs (Bester et al., 2005; Ellwood et al., 1982; Secor et al., 2011; Costerton et al., 1995; Landini et al., 2010) signalant des taux de croissance du biofilm accrus par rapport aux taux de croissance planctoniques tandis que d'autres (Barton et al., 1996) ont signalé le contraire.

### **6.3. Développement du biofilm**

La capacité des microorganismes à former de biofilms matures sur divers substrats reflète leur plasticité pour s'adapter à des environnements physicochimiques distincts (Del pozo, 2018). Des études préliminaires menées dans le laboratoire du Dr. Villemur avaient montré une faible capacité des souches JAM1 et NL23 à former un biofilm sur des surfaces telles que le verre. Dans ce contexte, notre étude a évalué la capacité des souches à s'adhérer et former un biofilm sur différentes surfaces inertes. Les matériaux

comme le polystyrène, polypropylène et verre ont été testés pendant cette expérience (voir section 5.6). Nous avons pu constater la capacité des co-cultures et des cultures pures des deux souches à former un biofilm sur les différents supports, avec une bonne adhérence sur les parois des tubes (fig. 5.21).

Des facteurs tels que le substrat, les conditions de formation du biofilm, l'hydrodynamique du milieu aqueux, les caractéristiques du milieu de culture et les propriétés de la surface cellulaire doivent être pris en compte lors du développement d'un biofilm (Donlan, 2002).

L'attachement des microorganismes aux surfaces biotiques ou abiotiques est un processus complexe, qu'impliquent des mécanismes de liaison des adhésions et des glycoconjugués de surface aussi bien que des forces hydrophobes et des charges électrostatiques. (Dufrière, 2015), qui peut aboutir la formation du biofilm. Dans notre cas il semble que toutes les conditions et facteurs nécessaires à la formation du biofilm soient établis entre les souches, les supports et le milieu de culture, et nous a conforté dans la poursuite du prochain objectif, c'est-à-dire la formation de co-cultures en biofilm.

#### **6.4. Développement de co-cultures en biofilm**

Comme mentionné auparavant, les conditions planctoniques des co-cultures n'ont pas été réalisées en conditions marines étant donné la sensibilité de la souche NL23 à ces conditions. Nous avons émis l'hypothèse que cette dernière pouvait s'adapter à ces conditions dans un biofilm. Ainsi, des co-cultures des souches en biofilm pu être faites grâce à un réacteur opéré en recirculation, contenant des supports permettant l'établissement efficace de biofilm. Ce réacteur a permis de créer un biofilm dénitrifiante capable de maintenir une bonne dynamique de réduction du nitrate et nitrite en conditions anoxiques et à différentes concentrations en NaCl (Fig. 5.22). L'acclimatation de la souche NL23 aux nouvelles conditions de NaCl et la formation du biofilm ont été suivies pendant environ 5 mois avec des déterminations pendant des périodes de temps établies.

##### **6.4.1. Réacteur 1: Co-culture des souches JAM1 et NL23**

Le premier réacteur a permis d'ajuster les conditions de croissance et de développement du biofilm, qui seraient répétées plus tard dans des conditions contrôlées dans un deuxième et un troisième bioréacteur. Les souches ont étéensemencées en milieu 1403 modifié à une concentration initiale de 0,5% NaCl dans des conditions

dénitrifiantes. L'adaptation des souches aux nouvelles conditions de culture a pris 8 semaines où le réacteur a montré une faible activité dénitrifiante avec des périodes de temps pendant lesquels la réduction du nitrate et nitrite a pu être complétée entre 24 et 48 heures. Cela pourrait être dû à la faible concentration cellulaire dérivée aux nombreux changements du milieu de culture. Ces observations suggèrent que les nutriments, présents dans le milieu, ainsi que la capacité de chaque espèce à s'y adapter, influencent la formation, la composition et la structure des biofilms de la co-culture dans le bioréacteur. Karthikeyan et al. (2001) ont rapporté que l'épaisseur sur la surface d'un biofilm était corrélée aux caractéristiques physico-chimiques des polluants organiques dégradés par le biofilm. Plus une molécule est récalcitrante et hydrophobe, plus le rapport épaisseur/surface du biofilm sera élevé. La capacité de ces bactéries à former un biofilm a déjà été rapportée dans la littérature. Ils ont été utilisés avec succès en réacteur pour former un biofilm actif dans le traitement des eaux usées (Wu et al., 2020; Bassin et al., 2017; McIlory et al., 2015; Zhai et al., 2020; Osaka et al., 2008; Rissanen et al., 2016).

Au fur et à mesure que les bactéries ont commencé à s'adapter aux conditions de culture, le processus de dénitrification s'est stabilisé. De lors, le temps de changement du milieu de culture a été réduit à 24 heures ou moins. À travers des concentrations 0.5% à 2.75%, les souches JAM1 et NL23 ont maintenu une dynamique de dénitrification efficace avec un temps de réduction de moins de 24 heures; 2% de NaCl étant la concentration avec un taux de dénitrification le plus élevé ( $13,24 \text{ mg-N.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), et une dénitrification complète a été réalisée dans un temps moyen de 12 heures. Cependant, même lorsqu'une réduction complète du nitrate et du nitrite a été présentée à une concentration de 2.75 %, une accumulation transitoire assez élevée de nitrite a été observée, suggérant une baisse d'efficacité de la souche NL23 dans le biofilm.

La co-culture après avoir été amenée dans le milieu de culture IO (utilisé dans le système d'origine) a montré une diminution du processus de dénitrification. Dans la figure 5.24 A on peut voir une réduction du nitrate en 4 jours ainsi qu'une forte accumulation du nitrite ( $313 \text{ mg NO}_2^- \text{-N / L}$ ), avec une faible réduction après une semaine. La difficulté de la co-culture à poursuivre la réduction du nitrite reflète le stress auquel la souche NL23 a été soumise étant à forte concentration en sel, ainsi qu'en étant inhibée par les fortes concentrations de nitrite dans le milieu de culture. Par conséquent, un équilibre optimal tant dans la concentration respective des deux souches que de leurs activités dénitrifiantes doit être atteint. Une proportion trop grande de la souche JAM1 réduira trop

rapidement le nitrate amenant la concentration du nitrite à des niveaux inhibant pour la souche NL23. L'inhibition de la croissance des microorganismes dénitrifiantes comme *Paracoccus denitrificans* ou des processus métaboliques comme la méthanogène et la dénitrification, dérive de la toxicité du nitrite dans les cultures pures (Kluber et al., 1998; Glass et al., 1997a; Van Versefeld et al., 1977; Polcyn et al., 2003), ainsi que dans les cultures mixtes et d'enrichissement (Tugtas et al., 2007) ont été rapportés dans plusieurs études.

De plus, une troisième variable a affecté le comportement de la co-culture. Les composants et les concentrations du milieu de culture IO n'ont pas pu être contrôlés de la même manière qu'avec le milieu *Methylophaga* 1403, qui était en plus supplémenté avec des éléments traces. La supplémentation du milieu IO avec les solutions d'éléments traces ajoutés au milieu *Methylophaga* 1403 mentionné précédemment, a entraîné une amélioration de la performance du réacteur, sans jamais réatteindre sa performance dans le milieu 1403.

#### **6.4.1.1. Concentrations des souches JAM1 et NL23 dans le bioréacteur 1**

La concentration des souches dans le bioréacteur 1, a montré un comportement similaire à celui observé lors des expériences à l'état planctonique et à celui observé dans le réacteur d'origine. La souche JAM1 s'est établie dans des proportions plus élevées dans toutes les concentrations de NaCl (tableau 5.3). Cependant, la souche NL23 était dans des proportions équivalentes entre 0,5 et 2 % NaCl, ce qui expliquerait le bon comportement et le développement du biofilm à ces concentrations. À des concentrations de 2,75 % NaCl, IO et IO supplémenté, une augmentation significative de la proportion de la souche JAM1 a été observée (37:1,122:1,169:1 respectivement). Ceci semble être dérivé de la capacité de cette souche à se développer dans des conditions salées (concentration optimale de 3,0 % NaCl), pouvant coloniser de manière importante les supports. Cette colonisation a généré un déséquilibre dans la dynamique de dénitrification qui a conduit à une augmentation des concentrations du nitrite et une inhibition de la croissance de la souche NL23 dans le milieu de culture.

#### 6.4.2. Réacteur 2: Co-culture des souches JAM1 et NL23

La connaissance préalable des conditions physiologiques et environnementales de la culture lors du développement du biofilm dans le premier bioréacteur a permis d'effectuer des ajustements sur le deuxième bioréacteur.

En comparaison au premier bio-réacteur, il a été observé que la co-culture a pris plus de temps pour s'adapter aux concentrations 100 et 200 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L. Lorsque la concentration en nitrate établie comme optimale pour la croissance des souches était ajoutée (300 mg  $\text{NO}_3^-$ -N / L), le nombre de jours pour l'adaptation a été réduite et la production de gaz augmentée (indicateur d'un processus de dénitrification efficace). La dynamique de dénitrification de ce bioréacteur est restée stable avec une réduction complète du nitrate et du nitrite en 24 heures en moyenne, à travers les concentrations 0,5% à 2,75% NaCl. Une accumulation transitoire de nitrite a été observée dans toutes les conditions contrairement au premier bioréacteur. Avec le IO, le réacteur a pris un temps de 144 heures pour réduire les concentrations du nitrate et nitrite présentes dans le milieu de culture.

Dans ce bioréacteur, l'ajout de suppléments au milieu IO a été réalisé dès le début de l'échange vers ce milieu de culture. La diminution du temps d'adaptation des souches au milieu IO dans ce bioréacteur a confirmé l'importance des microéléments pour la croissance, le métabolisme et l'adaptation des souches JAM1 et NL23 dans les milieux à forte concentration en sel. Il a également été observé qu'après l'adaptation au milieu de culture IO, les souches ont conservé une bonne performance et une bonne dynamique de réduction du nitrate et du nitrite, démontrant que celles dernières n'ont pas été influencées par la diminution progressive des éléments trace.

Les taux de dénitrification a été maintenu autour de 15 mg-N/L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> à des concentrations en NaCl comprises entre 0,5% et 2,75% avec un taux de dénitrification spécifique de 0,07 mg-N/ L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.mg-protéine<sup>-1</sup>, étant 10 fois supérieur à celui observé pour la co-culture dans le milieu de culture IO. En comparant ces données avec celles établies pour le premier bioréacteur, nous pouvons constater une meilleure performance des souches dans le deuxième bioréacteur.

Le milieu de culture IO est un milieu commercial qui pourrait contenir des additifs inconnus. La différence entre les deux milieux utilisés est la présence de phosphate, d'ammonium et de Bis-Tris dans le milieu Methylophaga 1403, qui sont absents dans le

milieu IO. L'ammonium peut être une source de N facilement assimilable dans la voie de la glutamine pour la synthèse de biomolécules comme des acides aminés (Hirel et al., 2001; Peoples et al., 1903). L'ammonium interagit également avec les systèmes d'absorption du nitrate. A faible concentration, l'ammonium a un effet inducteur rapide (Bloom et al., 1990). Par contre, à concentration plus élevée, l'ammonium inhibe rapidement et réversiblement l'absorption du nitrate (Lee et al., 1989). En milieu IO, le nitrate doit être transformé en ammonium avant cette assimilation, ce qui nécessite de l'énergie des cellules.

#### **6.4.2.1. Concentrations des souches JAM1 et NL23 dans le bioréacteur 2**

Contrairement au bioréacteur 1, nous avons mesuré les proportions des souches dans le biofilm. La proportion de la souche NL23 était plus élevée dans le biofilm que dans la fraction en suspension quel que soit la concentration de NaCl, ce qui suggère que les conditions en biofilm ont favorisé son implantation.

La co-culture des souches JAM1 et NL23 dans le bioréacteur nous a permis de déduire qu'il est possible d'obtenir un biofilm dénitrifiant, avec une dynamique efficace de réduction du nitrate et nitrite. Les concentrations de NaCl au sein desquelles les souches présentent un rendement plus élevé, une meilleure adaptation et une proportion similaire entre elles se situaient entre 0.5% et 2%.

#### **6.4.3. Réacteur 3: Biofilm avec la souche NL23**

A titre comparatif, un troisième bioréacteur a été mis en marche uniquement avec la souche NL23. Les résultats montrent un temps d'adaptation de la souche NL23 inférieur aux autres bioréacteurs entre les concentrations 0,5% et 2,75% NaCl. La concentration 1% NaCl a présenté une dynamique de dénitrification stable avec une production de gaz similaire à la concentration 0% NaCl et un temps d'adaptation plus court par rapport aux autres concentrations. Une réduction complète du nitrate et nitrite a été observée à des concentrations comprises entre 0 % et 1 % de NaCl (fig 5.26 A). À partir de 2% NaCl, la dynamique de dénitrification a montré une augmentation du temps de réduction du nitrate, avec une forte accumulation de nitrites qui a atteint 271,3 mg  $\text{NO}_2^-$ -N / L et a été partiellement réduite à 240,83 mg  $\text{NO}_2^-$ -N / L au sein de la concentration 2,75% NaCl (fig 5.26 B). En présence du milieu IO, le réacteur n'a pas été montré d'activités dénitrifiantes. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par les cultures planctoniques (Martineau,

2015) où des baisses importantes de la croissance et de l'activité dénitrifiante ont été observées à partir de 2% NaCl. Tous ces résultats suggèrent que la souche NL23 n'a pas de mécanismes d'adaptation intrinsèque pour sa protection en conditions salines, mais que son adaptation dans ces conditions dépend de la présence de la souche JAM1.

La formation de biofilm par la souche NL23 a permis d'adapter la biomasse aux changements de conditions, par rapport aux fractions en suspension et l'effet protecteur des biofilms a réduit l'effet de la teneur en sel. Pour cette raison, la souche NL23 a pu dépasser la concentration de NaCl établie comme maximum dans des conditions planctoniques pour une croissance optimale, sans toutefois atteindre les conditions marines. Hiramatsu et al., 1998 ont pu établir qu'un des mécanismes qui peuvent augmenter la tolérance aux fortes concentrations de NaCl chez *Staphylococcus aureus* peut être associé à la multisous-unité antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Cette même multisous-unité antiporter a été retrouvée dans la souche NL23, ce qui pourrait également expliquer l'augmentation de sa résistance (Martineau et al., 2015). Kim et al., 2017 ont montré que les bactéries stressées par la salinité ont un potentiel élevé de provoquer un encrassement biologique à la surface de la membrane, car les bactéries maintiennent toujours l'activité cellulaire et surproduisent de l'EPS (substance polymérique extracellulaire). Zhao et al., 2016 ont montré que les teneurs en protéines et polysaccharides dans l'EPS augmentaient avec l'augmentation de la salinité, dans un système de nitrification et dénitrification simultanées avec une augmentation de la salinité de 1 à 3 %. Zhang et al. 2011 ont rapporté que la quantité d'EPS total du biofilm a augmenté en raison de la concentration de NaCl passée de 0 à 10 g/L, et une libération claire de protéines dans les EPS a été détectée lors de l'augmentation de la salinité.

En général, nous pouvons affirmer que les souches JAM1 et NL23 sont capables de s'adapter aux changements de concentration de NaCl, de former un biofilm et de rester avec une dynamique de dénitrification stable et efficace sous toutes les conditions de concentration de NaCl évaluées, tant que la souche NL23 soit préalablement stimulée. Notre hypothèse selon laquelle la souche JAM1 doit être présente pour que la souche NL23 puisse survivre en milieu marin s'est avérée vraie avec les tests de co-culture de biofilm dans les réacteurs. L'acclimatation progressive aux conditions marines a donné la possibilité à la souche NL23 d'avoir une meilleure performance en biofilm que si elle se trouvait sous forme planctonique dans le milieu de culture, avec une proportion plus

élevée dans le bioréacteur. Finalement, la présence de la souche JAM1 était essentielle pour que la souche NL23 opère à des concentrations de NaCl supérieures à 1,0% NaCl.

## **6.5. Mesurer le changement du niveau d'expression des gènes de dénitrification dans les co-cultures :**

### **6.5.1. Régulation de l'expression des gènes**

Les microorganismes doivent faire face aux vicissitudes d'un environnement qui subit des altérations environnementales fréquentes de la température, de la salinité, de l'osmolarité, du pH et de la disponibilité des nutriments, entre autres. En général, les bactéries ressentent le changement de leur environnement et réagissent en activant l'expression de gènes spécialisés qui aident les cellules à s'adapter aux circonstances défavorables (Dubnau et al 2006). Les cellules bactériennes répondent au stress osmotique à deux niveaux différents de régulation: au niveau de l'activité protéique comme une réponse immédiate et au niveau de la transcription des gènes, à une échelle de temps majeurs. Par exemple, la communication intercellulaire et inter-espèce est un facteur qui contrôle grandement la régulation de l'expression de nombreux gènes (Toyofuku *et al.*, 2016). Le biofilm est un milieu propice à une proximité élevée entre différentes espèces bactériennes et influence leur comportement. L'expression des gènes dans les biofilms est évidemment modulée par les facteurs physico-chimiques, dynamiques externes à la cellule et peut impliquer des voies de régulation complexes.

Chaque organisme a la capacité de synthétiser différentes protéines, dont beaucoup sont nécessaires à des moments et des quantités différentes, pour lesquels l'expression génétique doit être finement régulée. Les résultats de la détermination des changements d'expression des gènes des nitrate et nitrite réductases des souches JAM1 et NL23 ont montré des changements spécifiques au cours du développement du biofilm à travers les différentes concentrations de NaCl.

L'expression des gènes *narG1* et *narG2* de la souche JAM1 dans le bioréacteur 2 a montré une baisse de ceux-ci avec l'accroissement de la concentration de NaCl. Le même phénomène a été observé chez la souche NL23 avec les niveaux d'expression des gènes *napA* et *nirK* dans les réacteurs B2 et B3. De plus, ces deux gènes étaient moins exprimés dans le réacteur B3 que dans le réacteur B2 opérés tous les deux à 0.5% NaCl. Par contre,

avec l'augmentation de la salinité, les niveaux respectifs d'expression des deux gènes étaient semblables entre les deux réacteurs.

L'ensemble des résultats des réacteurs démontrent que dans le biofilm la souche NL23 est capable de mieux résister aux changements brusques de salinité, en raison de sa proximité avec la souche JAM1. Il existe de nombreuses études qu'ont évalué la tolérance au sel chez les microorganismes non-halophiles afin de comprendre leurs mécanismes de résistance. Il a été démontré que les cellules sessiles associées au biofilm peuvent résister à des concentrations élevées de salinité. Kim et al. 2017 ont évalué les effets de la salinité sur la formation de biofilm de *Vibrio* sp. B2 isolé de l'eau de mer, de la saumure et d'un coupon membranaire encrassé, et ont constaté que les bactéries stressées par les hautes concentrations de salinité maintiennent toujours une bonne activité cellulaire et surproduisent de l'EPS. Zhao et al. 2016 ont étudié la composition d'EPS à partir de biofilms microbiens à différentes salinités et ont constaté que la production de protéines et de polysaccharides contenus dans des EPS solubles étaient étroitement liés avec l'augmentation de la salinité dans le milieu.

Tous les résultats de ces expériences indiquent clairement que les cellules immobilisées de la souche NL23 dans les supports ont acquis la capacité à tolérer l'augmentation de NaCl et que la souche JAM1 est capable de produire une concentration d'ectoïne suffisamment élevée pour protéger à NL23 d'un choc osmotique dans la co-culture. Ces observations sont alors intéressantes pour étudier les sous-jacents changements ou causes qui ont permis à la culture de s'adapter de réduire du nitrate et du nitrite à une concentration de NaCl similaire à celle observée dans le biofilm original.

## **6.6. Production d'ectoïne**

Les bactéries s'adaptent fréquemment aux environnements à haute osmolarité grâce à l'accumulation de solutés compatibles et en les libérant dans des conditions hypo-osmotiques. De tels solutés compatibles incluent :  $K^+$ , glutamate, proline, peptides, glycine bêtaïne, carnitine, saccharose, tréhalose et ectoïnes (Poolman et al., 1998; Csonka 1989; Galinski et al., 1994). L'ectoïne est un membre important de ces types de protecteurs du stress favorisent l'hydratation du cytoplasme et l'ajustement de la turgescence à des valeurs propices à la croissance dans des conditions osmotiquement difficiles (Richter et al., 2019).

L'ectoïne est souvent considéré comme une composante mineure dans les protéobactéries de la subdivision  $\gamma$ . Quelques enzymes sont inhibées par le sel et activées en présence des solutés compatibles, qui confèrent une protection partielle contre le sel (Galinski et al., 1994). Chez *E. coli*, le taux de croissance et le rendement de croissance ont été déterminés dans des milieux à osmolarité croissante. Après un temps de latence, qui augmente avec l'osmolarité du milieu, l'ajoute d'ectoïne a restauré la croissance de la souche dans des milieux à haute osmolarité (jusqu'à 1 M NaCl) (Jebbar et al., 1992).

Pour pouvoir croître et s'établir dans des environnements très salins, la souche JAM1 synthétise de l'ectoïne ce qui la rend halotolerante. Il a été démontré que la souche JAM1 possède les gènes de synthèse de l'ectoïne (Mauffrey, 2016). Ces gènes ont été chez *Methylophaga alcalica* et *Methylophaga thalassica* ainsi que dans plusieurs génomes d'espèces non méthylophages (Doronina et al., 2010; Reshetnikov et al., 2011).

L'analyse de l'ectoïne intracellulaire et extracellulaire a montré que la souche JAM1 produisait des quantités plus élevées de cet osmoprotecteur de façon intracellulaire. Les concentrations d'ectoïne obtenues à partir du suivi des bioréacteurs 1 et 2 a montré lors du développement du biofilm dans le réacteur qu'à mesure que la concentration de NaCl augmentait, la production d'ectoïne augmentait en parallèle. Les potentiels osmotiques élevés forcent les microorganismes à accumuler des solutés compatibles dans des quantités directement proportionnelles à la salinité de l'environnement, lequel a été démontré dans cette étude ainsi comme des autres études.

Des études réalisées avec *M. thalassica* ont montré que la teneur en ectoïne dans la biomasse augmentait avec une augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu de culture (Doronina et al., 2010). La concentration d'ectoïne produite par la souche JAM1 le biofilm des co-cultures n'a pas dépassé 8,7 ppm, ce qui pourrait être dû au fait que parmi les bactéries halophiles qui utilisent la stratégie "*organic solutes-in*" est plus fréquente en aérobiose stricte car la synthèse de solutés compatibles est un processus énergétiquement et métaboliquement très coûteux (Ventosa et al., 1998).

Étant donné que la biosynthèse de l'ectoïne se produit aux dépens des intermédiaires du métabolisme central (asparagine), c'est à prévoir que ce processus pèse sur le métabolisme. Les solutés compatibles peuvent également servir de source de carbone, d'azote ou d'énergie, soit à partir de réserves intracellulaires, soit comme sources externes qui, après la mort cellulaire ou la libération de solutés, deviennent

disponibles pour d'autres organismes (Vargas et al., 2006). Cyplik et al 2012 ont observé des changements dans la concentration d'ectoïne au cours du processus de dénitrification dans les eaux usées, parce qu'une partie de l'ectoïne ajoutée dans le milieu de culture a été métabolisée et utilisée comme source de carbone pour le consortium microbien. Il convient de souligner que la capacité d'accumuler et de métaboliser des solutés compatibles s'applique à de nombreuses bactéries hétérotrophes comme par exemple *Brevibacterium epidermidis*, les cyanobactéries, les bactéries phototrophes, les bactéries méthanotropes, les champignons et levures (Onraedt et al., 2004; Welsh 2000).

Les osmolytes libérés dans l'environnement sont utilisés par des certaines bactéries halophiles/halotolérantes comme source accessible de solutés compatibles, à condition qu'elles possèdent les systèmes d'absorption et de régulation. Même les organismes incapables de synthétiser eux-mêmes des solutés compatibles peuvent prospérer dans un environnement salé si ces ou ses précurseurs sont fournis par des producteurs *de novo*. Cela a été démontré avec *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries, sensibles au sel qui utilisent des mécanismes de transport de la bétaine et de l'ectoïne pour se protéger, et acquièrent un certain degré de halotolérance (Jebbar et al., 1992). De nombreuses bactéries ont développé des systèmes de transport d'absorption pour accumuler des osmoprotectants dans leurs cellules. Par exemple, *Corynebacterium glutamicum* possède quatre transporteurs qui font partie de la superfamille des symporteurs sodium / soluté, pour des solutés compatibles parmi lesquels deux, ProP et EctP permettent au microorganisme d'accumuler l'ectoïne (Peter et al., 1998) Ces types de transporteurs ont été trouvés dans le génome de la souche NL23 (Martineau et al., 2013).

Des autres facteurs pouvant avoir une influence sur la production d'ectoïne par la souche JAM1 étaient les composants des milieux de culture utilisés au cours de l'étude, ainsi que les conditions de croissance. Doronina et al., 2010 ont observé chez *M. thalassica* que la source pour l'accroissement de la biomasse et la teneur d'ectoïne était plus efficace en présence  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , qu'en présence de  $\text{NaNO}_3$  ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Dans la bactérie halotolérante *Brevibacterium* sp., il a été démontré que la réserve d'ectoïne intracellulaire dépend non seulement de la concentration de sel externe mais aussi des conditions de la croissance de la souche comme le type de source de carbone et le niveau d'aération. L'accumulation d'ectoïne peut également dépendre du stade de croissance (Onraedt et al., 2003). Dans *Chromohalobacter israelensis*, l'ectoïne ne s'est accumulée que lorsque

les cellules ont été cultivées dans des concentrations supérieures à 0,6 M de NaCl, et seulement en croissance exponentielle cellules (Regev et al., 1990).

Le rôle de l'ectoïne constitue un mécanisme métabolique principal pour la biosynthèse dans toutes les concentrations de NaCl analysées. La production de l'osmoprotectant est corrélée avec une transcription relative plus élevée des gènes codant pour la synthèse de l'ectoïne dans le biofilm du bioréacteur 2 fonctionnant avec 2,75% de NaCl et IO par rapport à ce réacteur fonctionnant avec 0,5% de NaCl.

A des concentrations de 2,75% de NaCl et dans le milieu IO, on a observé une production plus importante d'ectoïne par rapport aux autres concentrations. La production d'ectoïne a été de 87 fois plus élevée dans les cellules qui se trouvaient à l'état biofilm que dans celles qui se trouvaient en suspension (Fig. 5.29). Le biofilm semble avoir une meilleure action de l'ectoïne ou au moins de la préservée, grâce à la proximité des cellules qui ont donné à la souche JAM1 la possibilité de synthétiser l'ectoïne de manière plus efficace et plus concentrée par rapport à la quantité qui a été obtenue pour les cellules en suspension, où la molécule hautement soluble a été diluée avec le milieu de culture. Cette proximité dans le biofilm aurait permis une protection des cellules de la souche NL23. En plus de la génération de solutés compatibles, l'accumulation de polysaccharides extracellulaires (EPS) dans le biofilm pourrait également être un facteur important à prendre en compte lors de l'adaptation de la biomasse à la salinité (Vyrides et al., 2010; Vyrides et al., 2017).

Yerkes et al. (1997) ont observé que l'ajout de petites concentrations de soluté compatible (bétaine) à des cultures pures de *Methanosarcin* et *Methanosaeta* dans un réacteur réduisait la toxicité du sodium. Vyrides et Stuckey (2009) ont montré que la biomasse anaérobie exposée à 35 g NaCl/L pendant 28 jours ont montré une bonne acclimatation à la salinité. En revanche, la biomasse anaérobie qui n'avait pas été exposé à la salinité auparavant, mais auquel de la glycine bétaine avait été ajoutée dans le milieu salin a montré un potentiel d'acclimatation supérieur. En plus, ces résultats permettent d'inférer que la production d'ectoïne générée par la souche JAM1 pourrait être un facteur limitant dans l'établissement d'une proportion plus élevée par la souche NLL23 dans le biofilm.

Apparemment le mécanisme par lequel ces deux bactéries effectuent le transfert des métabolites est indépendant du contact, le métabolite dans ce cas l'ectoïne est transféré par sa libération dans le milieu de culture par la souche JAM1, améliorant ainsi l'activité dénitrifiante et favorisant la résilience de la souche NL23, pour rester actives dans le biofilm lors des changements de concentration en NaCl. Notre étude illustre comment des expériences avec plusieurs espèces ou des modèles écologiques synthétiques peuvent fournir de nouvelles perspectives sur la sociabilité bactérienne entre bactéries méthylophiles. Il existe des exemples de syntrophie également trouvés dans des co-cultures établies entre souches de méthylophiles comme *Hyphomicrobium* sp. et méthanotrophes. Ces relations peuvent être basées sur l'élimination des composés toxiques produits par un partenaire, plutôt que sur des avantages énergétiques ou métaboliques. *Hyphomicrobium* sp. oxyde le méthanol, qui est excrété dans une certaine mesure lors de l'oxydation du méthane par les méthanotrophes, en empêchant l'inhibition de sa croissance (Wilkinson et al., 1974; Moore, 1981; Morris et al., 2013).

L'adaptation de la souche NL23 aux changements de concentration en sel dans les bioréacteurs 1 et 2 a été probablement due en grande partie à la protection apportée par la souche JAM1. Ces résultats montrent que le consortium établi entre les souches JAM1 et NL23 est efficace pour réduire le nitrate et le nitrite dans des conditions de salinité élevée et qu'il constitue un outil viable pour le traitement des eaux marines. La présence de NaCl à des concentrations supérieures à 2 g/L limite la possibilité d'introduire des microorganismes pour le traitement biologique dans des eaux usées salines. Cependant, Cyplik et al. 2012 ont utilisé un consortium de dénitrification pour étudier l'effet de l'ectoïne sur la dénitrification à 15 g / L de NaCl. Ils ont démontré que l'ajout d'ectoïne a accéléré le processus de dénitrification, et a provoqué l'élimination complète du nitrate et du nitrite dans un temps inférieur à celui observé sans aucun soluté compatible. Ils ont souligné que l'ectoïne affecte de manière significative l'activité enzymatique relative de la nitrate réductase en augmentant 35 % en présence de 1mM d'ectoïne, tout comme le taux de réduction spécifique du nitrate.

Malgré l'abondance de microorganismes marins, le potentiel de leur utilisation est fortement limité par le manque d'études d'interaction pour mieux comprendre leur rôle dans les écosystèmes marins. Les plus grands progrès ont eu lieu grâce aux techniques de biologie moléculaire dans l'écologie microbienne marine, mais il est clair que le potentiel de tout organisme peut être atteint au mieux en ayant cet organisme particulier

disponible pour l'expérimentation dans le laboratoire. Les cultures sont toujours essentielles. Ils fournissent presque le seul moyen de découvrir la physiologie des microbes pour établir quels substrats organiques sont utilisés, pour déterminer quels métabolites secondaires pourraient être libérés, ou quelles biotransformations pourraient être possibles (Joint et al., 2010).

## 7. CONCLUSION GÉNÉRAL DU PROJECT

L'objectif de cette thèse a porté sur la compréhension des interactions entre les souches JAM1 et NL23 en co-culture et leur impact sur le taux de dénitrification d'un biofilm formé par ces deux bactéries et utilisé pour la réduction des nitrates en milieu marin. Les principaux résultats et constatations comprenaient :

L'interaction et la communication entre les souches ont été évaluées et il a été observé qu'il n'y avait pas de production de métabolites diffusibles ou de caractères enzymatiques qui permettent d'affirmer qu'il existe une relation de concurrence entre les deux souches. Il a également été établi qu'aucune des souches n'est capable de produire d'acyl-HSL, ce qui suggère qu'il n'existe pas de communication entre elles pour ce type de molécules de quorum sensing.

La souche JAM1 a une plus grande affinité pour le nitrate par rapport à la souche NL23, ce qui lui permet de pousser plus vite et d'être toujours en plus grande quantité. Cependant, les performances de la souche NL23 en co-cultures et la dynamique de dénitrification se sont améliorées avec la stimulation préalable de ses enzymes lors de la préparation de l'inoculum. Les résultats obtenus à partir de la comparaison entre les co-cultures et les cultures pures de la souche NL23 nous ont permis d'observer que l'efficacité métabolique de cette bactérie est fortement dépendante de la salinité du milieu de culture, ainsi que la concentration en nitrite produite par la réduction du nitrate par la souche JAM1. L'expression relative des gènes des enzymes réductases a montré un avantage à la souche JAM1 pour la croissance par rapport à la souche NL23.

L'étude des co-cultures en suspension et en biofilm a fourni des informations sur la capacité de développer un biofilm individuellement et en co-cultures par les deux souches. Dans les co-cultures planctoniques, un meilleur taux de dénitrification a été observé à des concentrations de NaCl plus faibles. Les tendances de croissance et de dénitrification des co-cultures étaient similaires à celles observées pour la souche JAM1, sauf si une stimulation préalable de la souche NL23 a été réalisée, avec laquelle une dynamique de dénitrification commune a été observée. Le développement du biofilm en bioréacteur a montré des activités dénitrifiantes complètes. L'acclimatation progressive à différentes concentrations de NaCl a permis à la souche NL23 s'adapter dans un biofilm, contrairement aux cultures planctoniques avec des activités dénitrifiantes.

Les études qui se concentrent sur la biosynthèse de solutés compatibles lors de co-cultures de bactéries halophiles et halotolérantes sont rares. Dans notre étude, il a été démontré que même lorsqu'il n'y a pas de relation étroite et syntrophique entre les souches *M. nitratireducenticrescens* JAM1 et *H. nitrativorans* NL23, elles sont capables de cohabiter en co-cultures, de former un biofilm et de s'y établir de manière équilibrée, permettant à la dynamique de dénitrification d'être efficace et stable même à des concentrations élevées en sel.

Comme nous l'avons vu précédemment, les solutés compatibles libérés par la souche JAM1 et la réduction de nitrite par la souche NL23 peuvent soutenir efficacement la croissance bactérienne. Nous pensons que l'ectoïne produite par la souche JAM1 est un facteur important pour la survie et l'adaptation de la souche NL23 dans les environnements marins. Bien que la souche JAM1 n'ait pas contribué à de meilleures activités dénitrifiantes spécifiques dans les bioréacteurs, sa présence était essentielle pour l'adaptation de la souche NL23 aux concentrations supérieures à 1% NaCl. Des concentrations plus élevées d'ectoïne ont été trouvées à mesure que la concentration en sel augmentait.

Cette étude représente aussi un outil utile pour comprendre la physiologie des bactéries halophiles et halotolérantes. Les résultats obtenus en cette recherche sur les écosystèmes synthétiques dans des milieux marins peuvent avoir différentes applications, à niveau de la biorestauration. D'un point de vue biotechnologique, c'est un très bel exemple de la coexistence de deux microorganismes méthylotrophes qui peuvent être manipulés de manière à ce que les conditions fournies dans un bioréacteur établissent et renforcent les relations particulières comme par exemple le co-métabolisme entre eux.

## 8. PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans cette recherche peuvent être utilisés comme source d'information pour d'autres études sur les interactions microbiennes et son application au niveau biotechnologique et bioremédiation. Plusieurs approches pourront être considérées dans les études futures:

Le besoin de micro-organismes modèles halophiles et halotolérants est évident, dont le métabolisme dans la production d'ectoïnes sert de référence pour le développement de stratégies biotechnologiques. Comprendre les particularités de l'adaptation développée par les souches NL23 et JAM1 rend intéressant leur utilisation comme modèles d'étude.

La mise en place d'un biofilm avec les deux souches a montré un potentiel intéressant à être utilisé au traitement biologique d'eau de mer contaminée avec le nitrate. En optimisant les conditions des co-cultures avec les souches NL23 et JAM1, nous pourrions améliorer l'efficacité du processus de dénitrification et sa durabilité lorsque celle-ci est appliquée à une plus grande échelle.

## 9. BIBLIOGRAPHIE

- Almeida, J.S., Júlio, S.M., Reis, M.A.M. and Carrondo, M.J.T. (1995), Nitrite inhibition of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioeng.*, 46: 194-201. <https://doi.org/10.1002/bit.260460303>
- Anthony C. (1982). *The Biochemistry of Methylotrophs*. London: Academic.447 p.
- Armbruster, C. R., & Parsek, M. R. (2018). New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17), 4317-4319. doi:10.1073/pnas.1804084115
- Armbruster, C. R., Lee, C. K., Parker-Gilham, J., de Anda, J., Xia, A., Zhao, K., Murakami, K., Tseng, B. S., Hoffman, L. R., Jin, F., Harwood, C. S., Wong, G. C., & Parsek, M. R. (2019). Heterogeneity in surface sensing suggests a division of labor in *Pseudomonas aeruginosa* populations. *eLife*, 8, e45084. <https://doi.org/10.7554/eLife.45084>.
- Atlas, R.M. (2004). *Handbook of Microbiological Media*, Third Edition, Volume 1. Éditeur: Floride: CRC Press, p. 989.
- Auclair J, Lépine F, Parent S, Villemur R (2010) Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a *Methylophaga* strain containing two highly divergent narG sequences. *ISME J* 4:1302–1313
- Auclair J, Parent S, Villemur R (2011). Functional Diversity in the Denitrifying Biofilm of the Methanol-Fed Marine Denitrification System at the Montreal Biodome. *Microb Ecol* (2012) 63:726–735.
- Auclair J, Parent S & Villemur R (2012) Functional diversity in the denitrifying biofilm of the methanol-fed marine denitrification system at the Montreal Biodome. *Microbial Ecology* 63(4):726-735.
- Attwood M. M. and Harder W. (1972) A rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium* spp. *Ant. Leeuwenhoek* 38, 369-378.
- Bader, Johannes & Mast-Gerlach, Edeltraud & Popović, Milan & Bajpai, Rakesh & Stahl, Ulf. (2010). Relevance of microbial co-culture fermentations in biotechnology. *Journal of applied microbiology*. 109. 371-87. 10.1111/j.1365-2672.2009.04659.x.
- Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Richter, O.M.H. et van Spanning, R.J.M. (1998). Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: Metabolically versatile

- bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol 62, p. 1046-1078
- Balachandar G, Khanna N, Das D. (2013). Biohydrogen production from organic wastes by dark fermentation. In: Pandey A, Chang JS, Hallenbeck P, Larroche C, editors. *Biohydrogen*. Burlington, MA: Elsevier. p. 103–144. doi:10.1016/B978-0-444-59555-3.00006-4
- Balderston WL, Payne WJ (1976) Inhibition of methanogenesis in salt-marsh sediments and whole-cell suspensions of methanogenic bacteria by nitrogen-oxides. *Appl Environ Microbiol* 32(2):264–269
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A. y Engert, A. (2000): Compatible-solute-supported periplasmic expression of functiona recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol*, 66: 11572-11579.
- Barton, A.J., Sagers, R.D. and Pitt, W.G. (1996), Measurement of bacterial growth rates on polymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, 32: 271-278. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199610\)32:2<271::AID-JBM17>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199610)32:2<271::AID-JBM17>3.0.CO;2-M)
- Bassin, J. P., Rachid, C. T. C. C., Vilela, C., Cao, S. M. S., Peixoto, R. S., & Dezotti, M. (2017). Revealing the bacterial profile of an anoxic-aerobic moving-bed biofilm reactor system treating a chemical industry wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 152-160. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.036>
- Bester, E., G. Wolfaardt, L. Joubert, K. Garny, and S. Saftic. (2005). Planktonic-cell yield of a Pseudomonad biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.*71:7792-7798.
- Bitton, G., (2005). *Wastewater Microbiology*, 3rd ed. Wiley-Lizz Inc, New York, pp. 76-88.
- Bloom AJ, Sukrapanna SS (1990) Effects of exposure to ammonium and transplant shock upon the induction of nitrate absorption. *Plant Physiol* 94: 85-90
- Boden R (2012) Emended description of the genus *Methylophaga* Janvier et al. 1985. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(7):1644-1646.
- Bonnefoy, V., and Demoss, J. A. (1994). Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 66, 47–56
- Bower C., & T., H.-H. (1980). A simplified hydrazine-reduction method for determining high concentrations of nitrate in recirculated sea- water. *Aquaculture*, 21 281-286

- Braker, G. et Tiedje, J.M. (2003). Nitric Oxide Reductase (norB) genes from pure cultures and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3476-3483.
- Brenner K, You L, Arnold F.( 2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*. Volume 26, Issue 9. P 483-489.
- Bruce, K.D., Hiorns, W.D., Hobman, J.L., Osborn, A.M., Strike, P.et Ritchie, D.A. (1992). Amplification of DNA from Native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Env. Microbiol.* 58, 3413-3416.
- Burmolle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sorensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 72(6), 3916-3923. doi:10.1128/aem.03022-05
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58(9), 1255-1267. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044>
- Case T, Gilpin M. (1974) Compétition par interférence et théorie des niches. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 3073 – 3077.
- Chen W, Zhang S, Jiang P (2015) Design of an ectoine responsive *AraC* mutant and its application in metabolic engineering of ectoine biosynthesis *Metabolic Engineering* 30(2015)149–155.
- Cheng SY & Chen JC (2002) Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicology* 61(3-4):181-193.
- Chistoserdova L (2011) Modularity of methylotrophy, revisited. *Environmental Microbiology* 13(10):2603-2622.
- Chistoserdova L, Kalyuzhnaya MG & Lidstrom ME (2009) The expanding world of methylotrophic metabolism. *Annual Review of Microbiology* 63:477-499.
- Clarens M, Bernet N, Delgenes JP, Moletta R (1998) Effects of nitrogen oxides and denitrification by *Pseudomonas stutzeri* on acetotrophic methanogenesis by *Methanosarcina mazei*. *FEMS Microbiol Ecol* 25:271–276. doi:[10.1111/j.1574-6941.1998.tb00479.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00479.x)
- Costerton J.W , Lewandowski D.E ,Caldwell D.E, Korber D. R , Lappin-Scott H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Ann. Rev. Microbial.* 49 : 1 , 711-745.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.(1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*; 284: 1318-22.

- Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* 53: 121–147.
- Cyplik P, Piotrowska-Cyplik A, Marecik R. (2012). Biological denitrification of brine: the effect of compatible solutes on enzyme activities and fatty acid degradation. *Biodegradation*. 23:663–672.
- Da Costa, M. S., Santos, H., Galinski, E. A. y Antranikian, G. (1998): An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 61: 117–53.
- Daniels KJ, Park YN, Srikantha T, Soll DR (2013) Impact des conditions environnementales sur la forme et la fonction des biofilms de *Candida albicans* . *Cellule eucaryote* 12(10) : 1389–1402. <https://doi.org/10.1128/EC.00127-13>
- Dalmau, M., Maier, E., Mulet, N., Vinas, M. and Benz, R. (2002). Bacterial membrane injuries induced by lactacin F and nisin. *Int Microbiol* 5, 73–80.
- Del Pozo JL. 2018. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 16:51–65. <https://doi:10.1080/14787210.2018.1417036>
- Dennis P.P., Shimmin L.C. (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic Arquea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 90-104.
- Denton, L. (1995). Microbiological Diversity of Denitrifying Bacteria in High-Nitrate Brines of Varying Salinity. M.S. thesis, Univ. Colorado. Boulder.
- De Roy, K., Marzorati, M., van den Abbeele, P., Van de Wiele, T., and Boon, N. (2014). Synthetic microbial ecosystems: An exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environ. Microbiol*. 16, 1472–1481. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12343>
- De Zwart JM, Nelisse PN & Kuenen JG. (1996). Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov.: an obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiology Ecology* 20(4):261-270.
- Diamant S., Eliahu N. D. R. y Golubinoff, P. (2001). Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem*, 276: 39586-39591.
- Donlan, R. M., and J. W. Costerton. (2002a). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev*. 15:167–193.

- Donlan R. M. (2002b). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Doronina N, Trotsenko Y, Tourova T.(2000): *Methylarcula marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylarcula terricola* sp. nov.: novel aerobic, moderately halophilic, facultatively methylotrophic bacteria from coastal saline environments. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50:1849-1859.
- Doronina N, Darmaeva T, Trotsenko Y. (2003). *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alcalica sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:223–229.
- Doronina N, Lee T, Ivanova E, Trotsenko Y. (2005). *Methylophaga murata* sp. nov.: a haloalkaliphilic aerobic methylotroph from deteriorating marble. *Microbiology* 74:440–447.
- Doronina N, Ezhov V, Beschastnyĭ A, Trotsenko Iu. (2010). Biosynthesis of the bioprotectant ectoin by aerobic methylotrophic bacteria from methanol. *Applied Biochemistry and Microbiology* Vol. 46, No. 2, pp. 173–176.
- Dubnau, D., & Losick, R. (2006). Bistability in bacteria. *Molecular microbiology*, 61(3), 564–572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05249.x>
- Dufrêne YF. (2015). Sticky microbes: forces in microbial cell adhesion. *Trends Microbiol.* 23:376–382. doi:10.1016/j.tim.2015.01.011
- Dunne, W. M., Jr. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*, 15(2), 155-166. doi:10.1128/cmr.15.2.155-166.2002
- Dupla, M., Comeau, Y., Parent, S. Villemur, R. et Jolicoeur, M. (2006). Design optimization of a self-cleaning moving-bed bioreactor for seawater denitrification. *Water Res.*, 40, 249-258.
- Einsle O & Kroneck PM. (2004). Structural basis of denitrification. *Biological chemistry* 385(10):875-883.
- Eisenthal R., Danson M. and Hough D. (2007). Efficiency and kcat/KM: a useful comparator. *TRENDS in Biotechnology* Vol.25 No.6. 247-249.
- Ellwood, D. C., C. W. Keevil, P. D. Marsh, C. M. Brown, J. N. Wardell, and N. L. Roux.1982. Surface-associated growth. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*297:517-532.
- EPA (1986) Quality criteria for water. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards.

- Feng Z., Wu G. (2020). Start-up of anammox systems with different feeding patterns: System performance, microbial community and potential microbial interactions. *Journal of Water Process Engineering*. Volume 39. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101694>
- Fesefeldt, A., Kloos, K., Bothe, H., Lemmer, H. & Gliesche, C. G. (1998). Distribution of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium* spp. and other budding bacteria. *Can J Microbiol* 44, 181–186.
- Filloux A.; Vallet I. (2003). Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S : médecine sciences* 191: 77–83. DOI : 10.7202/000760ar.
- Galinski E.A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. R.K Poole (ed), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, London, pp. 273-329.
- Galinski E. and Trüper H. (1994), Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 95-108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00128.x>
- Ghosh S., Chowdhury R. & Bhattacharya P. (2016). Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* (2016) 100:4283–4295 DOI 10.1007/s00253-016-7448-1
- Glass, C. et Silverstein, J. (1997a). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Wat. Res.*, 32, 831-839.
- Glass C., Silverstein J. Oh J. (1997b). Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environment Research*. 69, 6: 1086 – 1093.
- Gliesche, C. G., Fesefeldt, A. & Hirsch, P. (2005). Genus *Hyphomicrobium* Stutzer and Hartleb 1898, 76AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 476–494. Edited by J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Goddard, AD, Moir, JWB, Richardson, DJ et Ferguson, SJ (2008). Interdépendance de deux domaines NarK dans un transporteur de nitrate / nitrite fusionné. *Microbiologie moléculaire*, 70 (3), 667–681. doi: 10.1111 / j.1365-2958.2008.06436.x
- Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(96). doi:10.1098/rsif.2014.0065

- Gonzalez PJ, Correa C, Moura I, Brondino CD & Moura JJ. (2006). Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100(5-6):1015-1023.
- Granada G., Rueda L., and Peláez C (2014). Antimicrobial activity of extracellular metabolites from antagonistic bacteria isolated from potato (*Solanum phureja*) crops. *Summa Phytophthol.* 40, 212-220. doi: 10.1590/0100-5405/1953
- Guidelines C. (2014). Guidelines for canadian drinking water quality: guideline technical document.
- Hanson RS & Hanson TE. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* 60: 439–471.
- Harborne, N. R., L. Griffiths, S. J. W. Busby, and J. A. Cole. (1992). Transcriptional control, translation and function of the products of the five open reading frames of the *Escherichia coli* nir operon. *Mol. Microbiol.* 6:2805–2813.
- Hendriks JH, Jasaitis A, Saraste M & Verkhovskiy MI (2002) Proton and electron pathways in the bacterial nitric oxide reductase. *Biochemistry* 41(7):2331-2340.
- Hibbing M., Fuqua C., Parsek M., Peterson S. (2010). Compétition bactérienne : Survivre et prospérer dans la jungle microbienne. *Nat Rev Microbiol* 8: 15 – 25.
- Hiramatsu T, Kodama K, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. 1998. A putative multisubunit Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 180:6642–6648.
- Hirel B, Lea PJ (2001) Ammonia assimilation. In *Plant Nitrogen*. Edited by Lea PJ, MorotGaudry JF: Springer, 79-99.
- IPCC (2007) Climate change and its impacts in the near and long term under different scenarios. In: *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*(ed Core Writing Team Pachauri, R.K and Reisinger, A.), pp. 104. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Jagmann N, Philipp B (2014) Design of synthetic microbial communities for biotechnological production processes. *J Biotechnol* 184:209– 218. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.05.019
- Janvier M, Frehel C, Grimont F & Gasser F (1985) *Methylophaga marina* gen-nov, sp-nov and *Methylophaga thalassica* sp-nov, marine methylotrophs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35(2):131-139.
- Jebbar M, Talibart R, Gloux K, Bernard T & Blanco C (1992) Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *Journal of*

- bacteriology 174 (15):5027-5035., 174 (15), 5027- 035.  
<https://doi.org/10.1128/jb.174.15.5027-5035.1992>
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett*, 236(2), 163-173. doi:10.1016/j.femsle.2004.06.005
- Joint, I., Mühling, M., & Querellou, J. (2010). Culturing marine bacteria - an essential prerequisite for biodiscovery. *Microbial biotechnology*. 3(5), 564–575. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00188.x>
- Jones, C. M., & Hallin, S. (2010). Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. *ISME J*, 4(5), 633-641. [doi:http://www.nature.com/ismej/journal/v4/n5/supinfo/ismej2009152s1.html](http://www.nature.com/ismej/journal/v4/n5/supinfo/ismej2009152s1.html)
- Karatan E, Watnick PI (2009) Signaux, réseaux réglementaires et matériaux qui construisent et détruisent les biofilms bactériens. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 310–347
- Karthikeyan, R. and Bhandari, A. (2001). Anaerobic Biotransformation of Aromatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Microcosms: A Review, *Journal of Hazardous Substance Research: Vol. 3*. <https://doi.org/10.4148/1090-7025.1021>
- Keller, L. and Surette, M.G. (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 4, 249–258.
- Kim HG, Doronina NV, Trotsenko YA & Kim SW (2007) *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(9):2096-2101.
- Kim, L., Chong, T. (2017). Physiological responses of salinity-stressed *Vibrio* sp. and the effect on the biofilm formation on a nanofiltration membrane. *Environ. Sci. Technol.*, 51, 1249–1258.
- Kluber HD, Conrad R (1998) Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO and N<sub>2</sub>O on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *Methanobacterium bryantii*. *FEMS Microbiol Ecol* 25:331–339
- Knowles R. (1982). Denitrification. *Microbiol Rev* 46:43–70. 12
- Köln, H. B., Ferguson, S. J., & Newton, W. E. (2007). Preface *Biology of the Nitrogen Cycle* (pp. xiii-xvii). Amsterdam: Elsevier.
- Kuhlmann, A.U., and Bremer, E. (2002) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 68: 772–783.

- Labbé N, Parent S, Villemur R (2003a) Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. *Water Res* 37:914–920
- Labbé N, Juteau P, Parent S, Villemur R (2003b) Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal Biodome, Canada. *Microb Ecol* 46:12–21
- Labbé N, Laurin V, Juteau P, Parent S, Villemur R (2007). Microbiological community structure of the biofilm of a methanol fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms. *Microb Ecol* 53:621–630
- Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J. G., & Nijland, R. (2010). Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(3), 813-823. doi:10.1007/s00253-010-2468-8
- Lapidot, A., Iakobashvili, R., Malin, G. (1999). Performing nucleic acid extension reaction in presence of osmoprotectant, e.g.proline, particularly for sequencing and amplification—increases stability of polymerase and reducesmelting temperature of template orprimer. Patent WO9941410-A.
- Lee, P. G., Lea, R. N., Dohmann, E., Prebilsky, W., Turk, P. E., Ying, H., & Whitson, J. L. (2000). Denitrification in aquaculture systems: an example of a fuzzy logic control problem. *Aquacultural Engineering*, 23(1–3), 37-59. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00046-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00046-7)
- Lee RB, Drew MC (1989) Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *J Exp Bot* 40: 741-752
- Lemmer H, Zaglauer A, Neef A, Meier H, Amann R (1997) Denitrificationin a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 2: Composition and ecology of the bacterial community in the biofilms. *Water Res* 31:1903–1908
- Lens, P., O'Flaherty, V., Moran, A.P., Stoodley, P., et Mahony, T. (2003). *Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology*. Londre : IWA Publishing, p. xi, 81-82.
- Lewis, K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 999–1007.
- Long, R. A., & Azam, F. (2001). Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 4975–4983. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.4975-4983.2001>

- Madsen JS , et al.( 2016 ) La coexistence facilite la formation de biofilm interspécifique dans les communautés microbiennes complexes . Environ Microbiol 18 : 2565 – 2574 .
- Malin, G. y Lapidot, A. (1996): Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces*. J Bacteriol,178:385–95.
- Martineau C, Villeneuve C, Mauffrey F, Villemur R. (2013). *Hyphomicrobium nitratorans* sp. nov., isolated from the biofilm of a methanol-fed denitrification system treating seawater at the Montreal Biodome (Canada).Int J Syst Evol Microbiol 63:3777–3781.
- Martineau C, Villeneuve C, Mauffrey F, Villemur R. (2014). Complete genome sequence of *Hyphomicrobium nitratorans* strain NL23, a denitrifying bacterium isolated from biofilm of a methanol-fed denitrification system treating seawater at the Montreal Biodome. Genome Announc 2(1):e01165-13
- Martineau C, Mauffrey F, Villemur R. (2015). Comparative Analysis of Denitrifying Activities of *Hyphomicrobium nitratorans*, *Hyphomicrobium denitrificans*, and *Hyphomicrobium zavarzinii*. Applied and Environmental Microbiology. 81: Number 15 5003-5114
- Mauffrey F, Martineau C & Villemur R (2015) Importance of the two dissimilatory (Nar) nitrate reductases in the growth and nitrate reduction of the methylotrophic marine bacterium *Methylophaga nitratreducenticrescens* JAM1. Frontiers in microbiology 6
- Mauffrey F. (2016). Étude de la voie de dénitrification de la souche bactérienne *Methylophaga nitratreducenticrescens* JAM1 provenant d'un système de dénitrification d'eau de meré Thèse présentée pour l'obtention du grade Philosophiae Doctor (Ph. D.) en biologie.
- McClellan K., Winson M., Fish L., Taylor A., Chhabra S., Camara M., Daykin M., Lamb J., Swift S., Bycroft B, Stewart G., Williams P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones Free. Microbiology. Vol 143., 12.
- McIlroy S, Saunders AM, Albertsen M et al (2015) MiDAS : le guide de terrain des microbes des boues activées. Base de données (Oxford). doi: 10.1093/base de données/bav062
- Meijer E., van der Zwaan J., Wever R., and Stouthamer A. (1979). Anaerobic respiration and energy conversion in *Paracoccus denitrificans*. Eur. J. Biochem. 96:69-76.

- Moe, M.A. Jr, 1993. *The Marine Aquarium Reference: Systems and Invertebrates*. Green Turtle Publications, Plantation, FL, p. 510.
- Moir, J.W.B., and Wood, N.J. (2001) Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell Mol Life Sci* 58: 215–224.
- Moir JWB (2011). *Nitrogen Cycling in Bacteria Molecular Analysis*. Caister Academic Press.1-247.
- Moller, S., Sternberg, C., Andersen, J.B., Christensen, B.B., Ramos, J.L., Givskov, M. and Molin, S. (1998). In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl Environ Microbiol* 64, 721–732.
- Momeni, B., Waite, A.J., and Shou, W. (2013). Spatial self-organization favors heterotypic cooperation over cheating. *Elife*. 2, e00960.
- Moore RL (1981) The biology of *Hyphomicrobium* and other prosthecate, budding bacteria. *Annu Rev Microbiol* 35: 567–594.
- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R & Castillo F (1999) Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of bacteriology* 181(21):6573-6584.
- Moreno-Vivián C & Flores E (2007). Chapter 17 - Nitrate Assimilation in Bacteria A2 - Bothe, Hermann. *Biology of the Nitrogen Cycle*, Ferguson SJ & Newton WE (Édit.) Elsevier, Amsterdam <http://dx.doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50018-7>. p 263-282.
- Morris, B. E. L., Henneberger, R., Huber, H., & Moissl-Eichinger, C. (2013). Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 384-406. doi:10.1111/1574-6976.12019.
- Nakamura, K., Noike, T. and Matsumoto J. (1986). Effect of operation conditions on biological Fe<sup>2+</sup> oxidation with rotating biological contactors. *Water Res.*20:73-77.
- Neef A, Zaglauer A, Meier H, Amann R, Lemmer H, Schleifer KH. (1996). Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol.* Dec;62(12):4329-39. doi: 10.1128/AEM.62.12.4329-4339.1996.
- Neu T. and Lawrence J. (1999). Lectin-Binding Analysis in Biofilm Systems. *Methods in enzymology*, Vol. 310: 145-152.

- O'Leary V., and Solberg M. (1976). Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol groups and on the activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:208-212.
- Onraedt A, De Muynck C, Walcarius B, Soetaert W, Vandamme E (2004) Accumulation d'ectoïne dans *Brevibacterium epidermis*. *Biotechnol Lett* 26: 1481–1485
- Osaka, T., Shirotani, K., Yoshie, S., & Tsuneda, S. (2008). Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process. *Water Research*, 42(14), 3709-3718. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.06.007>.
- Osaka, T., Ebie, Y., Tsuneda, S. and Inamori, Y. (2008). Identification of the bacterial community involved in methane-dependent denitrification in activated sludge using DNA stable-isotope probing. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 64,p.494-506.
- O'Toole GA, Kolter R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*; 30: 295-304.
- Paerl, HW, Pinckney, JL. (1996). Une mini-revue des consortiums microbiens: leurs rôles dans la production aquatique et le cycle biogéochimique. *Microb Ecol* 31, 225–247. <https://doi.org/10.1007/BF00171569>.
- Parent, S. et Morin, A. (2000). N budget as water quality management tool in closed aquatic mesocosms. *Water Res.*, 34, 1846-1856.
- Pastor J, Salvador M, Argandona M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka L, (2010). Ectoïnes in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv.* 28:782–801.
- Payette G. (2014). Étude de la dynamique de dénitrification et de la diversité bactérienne d'un biofilm dénitrifiant en conditions salines. Mémoire présentée pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie appliqué.
- Peoples MB, Gifford RM (1993) Long distance transport of carbon and nitrogen from sources to sinks in higher plants. In *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Edited by DT Dennis DT, Turpin DH. New York, 434-47
- Perez y Terron R., Gonzalez T., Munoz J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias* ISSN 2334-2501
- Peter H, Weil B, Burkovski A, Kramer R, Morbach S.(1998). *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification,

- sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol*;180(22):6005-6012.
- Philippot L (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1577(3):355-376.
- Phelan, V. V., Liu, W. T., Pogliano, K., & Dorrestein, P. C. (2011). Microbial metabolic exchange--the chemotype-to-phenotype link. *Nat Chem Biol*, 8(1), 26-35. doi:10.1038/nchembio.739
- Pitois S, Jackson MH & Wood BJB (2001) Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae: An overview. *Journal of Environmental Health* 64(5):25-32.
- Polcyn W, Lucin´ski R. (2003). Aerobic and anaerobic nitrate and nitrite reduction in free-living cells of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). *FEMS Microbiol Lett* 226:331–337. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00620-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00620-7).
- Poolman, B., & Glaesker, E. (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular microbiology*, 29(2), 397–407. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00875.x>
- Potter LC & Cole JA (1999) Essential roles for the products of the *napABCD* genes, but not *napFGH*, in periplasmic nitrate reduction by *Escherichia coli* K-12. *Biochemical Journal* 344:69-76.
- Qian, M., Tian, S., Li, X., Zhang, J., Pan, Y. and Yang, X. (2006) Ethanol production from dilute-acid softwood hydrolysate by co-culture. *Appl Biochem Biotechnol* 134, 273–284.
- Qiu, T., Liu, L., Gao, M., Zhang, L., Tursun, H., & Wang, X. (2016). Effects of solid-phase denitrification on the nitrate removal and bacterial community structure in recirculating aquaculture system. *Biodegradation*, 27(2), 165-178. doi:10.1007/s10532-016-9764-7.
- Ramirez S., Arias J., Bedoya J, Rueda E., Sánchez C., and Granada D. (2014). Metabolites produced by antagonistic microbes inhibit the principal avocado pathogens in vitro. *Agronomía Colombiana* 33(1), 58-63, 2015. doi: 10.15446/agron.colomb.v33n1.48241
- Ranava, D., Backes, C., Karthikeyan, G., Ouari, O., Soric, A., Guiral, M., Giudici-Ortoni, M. T. (2020). Metabolic exchange and energetic coupling between nutritionally stressed bacterial species, the possible role of QS molecules. *bioRxiv*, 2020.2004.2027.063917. doi:10.1101/2020.04.27.063917

- Regev, R., Peri, I., Gilboa, H. et Avi-Dor, Y. (1990). Etude RMN 13C de l'interrelation entre synthèse et captation de solutés compatibles chez deux eubactéries modérément halophiles : la bactérie Ba1 et *Vibrio costicola* . *Cambre. Biochimie. Biophys.* 278, 106-112. doi: 10.1016/0003-9861(90)90237-S
- Reshetnikov A, Khmelenina V, Mustakhimov I., Trotsenko Y. (2011). Chapter Two - Genes and Enzymes of Ectoine Biosynthesis in Halotolerant Methanotrophs. *Methods in Enzymology*, Academic Press. Volume 495. p 15-30.
- Richardson D, Berks B, Russell D, Spiro S & Taylor C (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58(2):165-178.
- Richardson D, van Spanning RJM & Ferguson SJ (2007) Chapter 2 - The Prokaryotic Nitrate Reductases. *Biology of the Nitrogen Cycle*, Elsevier, Amsterdam. p 21-35.
- Richter, A. A., Mais, C.-N., Czech, L., Geyer, K., Hoepfner, A., Smits, S. H. J., . . . Bremer, E. (2019). Biosynthesis of the Stress-Protectant and Chemical Chaperon Ectoine: Biochemistry of the Transaminase EctB. *Frontiers in Microbiology*, 10(2811). doi:10.3389/fmicb.2019.02811
- Riley, MA (1998 ) Mécanisme moléculaire de l'évolution de la bactériocine . *Revue annuelle de génétique* 32 , 255 - 278 .
- Rissanen A, Ojala A, Dernjatin M, Jaakkola J, Tiirola M (2016) *Methylophaga* and *Hyphomicrobium* can be used as target genera in monitoring saline water methanol-utilizing denitrification. *J Ind Microbiol Biot.* doi:10.1007/s10295-016-1839-2
- Rissanen, Antti & Ojala, Anne & Fred, Tommi & Toivonen, Jyrki & Tiirola, Marja. (2017). *Methylophilaceae* and *Hyphomicrobium* as target taxonomic groups in monitoring the function of methanol-fed denitrification biofilters in municipal wastewater treatment plants. *J Ind Microbiol Biot.* 44. 10.1007/s10295-016-1860-5.
- Roberts M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems*, 1, 5. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>
- Roessler M, Müller V. (2001). Osmoadaptation in Bacteria and Archaea: common principles and differences. *Environ Microbiol.*3:743–54.
- Roessler M, Pfluger K, Flach H. (2002). Identification of a salt-induced primary transporter for glycine betaine in the methanogen *Methanosarcina mazei* Go1. *Appl. Environ Microbiol.* 68:2133–2139.

- Rowe, J., Yarbrough J., Rake J., and Eagon R. 1979. Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Curr. Microbiol.* 2:51-54.
- Russel, J., Røder, H. L., Madsen, J. S., Burmølle, M., & Sørensen, S. J. (2017). Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10684. doi:10.1073/pnas.1706016114
- Ruyters S., Salaets P., Oorts K. and Smolders E. (2013). Copper toxicity in soils under established vineyards in Europe: a survey. *Sci. Total Environ.* 443, 470-477. doi: 10.1016/j. scitotenv.2012.11.001
- Sauvé I (2000) Caractérisation de la filière de dénitrification des eaux de mer du Biodôme de Montréal. Maitrise ès sciences appliquées (École Polytechnique de Montréal).
- Secor, P. R., James, G. A., Fleckman, P., Olerud, J. E., McInnerney, K., & Stewart, P. S. (2011). *Staphylococcus aureus* Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. *BMC microbiology*, 11, 143. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-143>
- Schink B (2002) Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 257–261.
- Severin, J., Wohlfarth, A. y Galinski, E. A. (1992): The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol*, 138: 1629-8.
- Smith RL, Ceazan ML & Brooks MH (1994) Autotrophic, hydrogen-oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination. *Applied and environmental microbiology* 60(6):1949-1955.
- Song, H., Ding, M. Z., Jia, X. Q., Ma, Q., & Yuan, Y. J. (2014). Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications. *Chem Soc Rev*, 43(20), 6954-6981. doi:10.1039/c4cs00114a
- Spalding RF & Exner ME (1993) Occurrence of Nitrate in Groundwater - a Review. *Journal of Environmental Quality* 22(3):392-402.
- Sparacino-Watkins, C., Stolz, J. F., & Basu, P. (2014). Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chemical Society reviews*, 43(2), 676–706. <https://doi.org/10.1039/c3cs60249d>
- Spotte S (1991). *Captive Seawater Fishes: Science and Technology*. Wiley, p.942.

- Strebel O, Duynisveld WHM & Bottcher J (1989) Nitrate pollution of groundwater in Western Europe. *Agriculture Ecosystems & Environment* 26(3-4):189-214
- Stres B, Bonete MJ, Martínez-Espinosa RM, Mahne I & Bothe H (2007) Chapter 24 - Organisms of the Nitrogen Cycle Under Extreme Conditions: Low Temperature, Salinity, pH Value and Water Stress. *Biology of the Nitrogen Cycle*, Elsevier, Amsterdam <http://dx.doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50025-4>. p 369-379.
- Suharti de Vries, S., & Pouvreau, L. A. M. (2007). Chapter 4 - Nitric Oxide Reductase: Structural Variations and Catalytic Mechanism A2 - Bothe, Hermann. In S. J. Ferguson & W. E. Newton (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle* (pp. 57-66). Amsterdam: Elsevier.
- Sutherland IW (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*;147:3–9.
- Tan, J., Zuniga, C., & Zengler, K. (2015). Unraveling interactions in microbial communities - from co-cultures to microbiomes. *Journal of Microbiology*, 53(5), 295-305. doi:10.1007/s12275-015-5060-1
- Thamdrup, B., 2012. New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43, 407–428.
- Thomsen, J.K.; Geest, T.; and Cox, R.P. (1994). Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in Denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2, 536.
- Timmermans P, Van Heute A (1983) Denitrification with methanol: Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp. *Water Res* 17:1249–1255.
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(1), 7–12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>
- Trotsenko YA & Murrell JC (2008) Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. *Advances in applied microbiology* 63:183-230.
- Tugtas AE, Pavlostathis SG (2007) Effect of sulfide on nitrate reduction in mixed methanogenic cultures. *Biotechnol Bioeng* 97:1448–1459. doi:10.1002/bit.21338

- Valentini M, Filloux A. (2016). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J Biol Chem.* Jun 10;291(24):12547-12555. doi: 10.1074/jbc.R115.711507. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27129226; PMCID: PMC4933438.
- van Egmond, Klaas & Bresser, Ton & Bouwman, Alexander. (2002). The European Nitrogen Case. *Ambio.* 31. 72-8. 10.1639/0044-7447(2002)031[0072:TENC]2.0.CO;2.
- van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological reviews*, 54(1), 75–87. <https://doi.org/10.1128/mr.54.1.75-87.1990>
- Van Spanning RJM, Delgado MJ & Richardson DJ (2005) The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N<sub>2</sub> fixation. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*, 4), Werner D & Newton WE (Édit.) Springer Netherlands. p 277-342.
- van Spanning, R. J. M., Richardson, D. J., & Ferguson, S. J. (2007). Chapter 1 - Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification Biology of the Nitrogen Cycle (pp. 3-20). Amsterdam: Elsevier.
- Van Verseveld, H; Meijer, E.; and Stouthamer, A. (1977). Energy conservation during Nitrate respiration in *Paracoccus denitrificans*. *Arch.Microbiol.* 112,17.
- Vargas, C., Jebbar, M., Carrasco, R., Blanco, C., Calderón, M.I., Iglesias-Guerra, F., and Nieto, J.J. (2006) Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Appl Microbiol* 100: 98–107.
- Ventosa, A., Nieto, J., Oren, A. (1998): The biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 504-544.
- Vetsigian K, Jajoo R, Kishony R (2011). Structure et évolution des réseaux d'interaction de *Streptomyces* dans le sol et in silico. *PLoS Biol* 9 : e1001184 .
- Villeneuve C, Martineau C, Mauffrey F & Villemur R (2012) Complete genome sequences of *Methylophaga* sp strain JAM1 and *Methylophaga* sp strain JAM7. *Journal of bacteriology* 194(15):4126-4127.
- Villeneuve C, Martineau C, Mauffrey F, Villemur R. (2013). Complete genome sequences of *Methylophaga* sp. strain JAM1 and *Methylophaga* sp. strain JAM7. *J Bacteriol* 194:4126–4127.

- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, et al. (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle : sources and consequences. *Ecological Applications*, 7, 737-750.
- Vyrides, I.; Stuckey, D.(2009). Adaptation of anaerobic biomass to saline conditions: role of compatible solutes and extracellular polysaccharides. *Enzyme Microbial Technol.* 44 (1), 46– 51.
- Vyrides, I., Santos, H., Mingote, A., Ray, M. J., & Stuckey, D. C. (2010). Are compatible solutes compatible with biological treatment of saline wastewater? Batch and continuous studies using submerged anaerobic membrane bioreactors (SAMBRs). *Environmental science & technology*, 44(19), 7437–7442. <https://doi.org/10.1021/es903981k>
- Vyrides, I.; Stuckey, D. (2017) Addition de soluté compatible aux systèmes biologiques traitant les déchets/eaux usées pour contrer les stress osmotiques et autres stress environnementaux : une revue, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37:7, 865-879, DOI : 10.1080/07388551.2016. 1266460
- Waters, CM et Bassler, BL (2005). QUORUM SENSING: Communication de cellule à cellule chez les bactéries. *Revue annuelle de la biologie cellulaire et développementale*, 21 (1), 319–346. doi: 10.1146 / annurev.cellbio.21.012704.131001
- Weerasekera MM, Wijesinghe GK, Jayarathna TA, Gunasekara CP, Fernando N, Kottegoda N, Samaranayake LP (2016) Les milieux de culture affectent profondément la croissance, l'adhésion et le développement du biofilm de *Candida albicans* et *Candida tropicalis* . *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111(11):697–702. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160294>
- Welsh, D. T. (2000): Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev*, 24: 263–90.
- Welsh DT (2000). Importance écologique de l'accumulation de solutés compatibles par les micro-organismes : des cellules individuelles au climat mondial. *FEMS Microbiol Rév* 24:263-290
- Wilkinson TG, Topiwala HH & Hamer G (1974) Interactions in a mixed bacterial population growing on methane in continuous culture. *Biotechnol Bioeng* 16: 41–59.
- Wobus, A., Ulrich, S. and Röske, I. (1995). Degradation of chlorophenols by biofilms on semi-permeable membranes in two types of fixed bed reactors. *Water Sci. Technol.*32:205-212.

- Wood J.(2014). Bacterial responses to osmotic challenges. *J. Gen. Physiol.* Vol. 145 No. 5 381–388. [www.jgp.org/cgi/doi/10.1085/jgp.201411296](http://www.jgp.org/cgi/doi/10.1085/jgp.201411296)
- Wu, L., Wei, W., Xu, J., Chen, X., Liu, Y., Peng, L., Ni, B. (2021). Denitrifying biofilm processes for wastewater treatment: developments and perspectives. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 7(1), 40-67. doi:10.1039/D0EW00576B
- Yara, R., Maccheroni, W. Jr, Horii, J. and Azevedo, J.L. (2006) A bacterium belonging to the *Burkholderia cepacia* complex associated with *Pleurotus ostreatus*. *J Microbiol* 44, 263– 268.
- Yarbrough JM, Rake JB, Eagon RG. (1980). Bacterial inhibitory effects of nitrite: inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 39(4):831–834.
- Yerkes, D. W.; Boonyakitsombut, S.; Speece, R. E. (1997). Antagonism of sodium toxicity by the compatible solute betaine in anaerobic methanogenic systems. *Water Sci. Technol.* 36 (6-7), 15– 24.
- Yetinson T, Shilo M. (1979). Seasonal and geographic distribution of luminous bacteria in the eastern Mediterranean Sea and the Gulf of Elat. *Appl Environ Microbiol.* 37:1230–1238.
- Zhai S., Ji M., Zhai Y., Su X. (2020). Shift of bacterial community and denitrification functional genes in biofilm electrode reactor in response to high salinity. *Environmental Research* 184. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.109007>
- Zhang ZJ, Chen SH, Wang SM, Luo HY (2011) Characterization of extracellular polymeric substances from biofilm in the process of starting-up a partial nitrification process under salt stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1563–1571
- Zhang L, Lang Y, Nagata S. (2009). Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extremophiles* 13:717–724
- Zhao, L., She, Z., Jin, C., Yang, S., Guo, L., Zhao, Y., & Gao, M. (2016). Characteristics of extracellular polymeric substances from sludge and biofilm in a simultaneous nitrification and denitrification system under high salinity stress. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(9), 1375-1389. doi:10.1007/s00449-016-1613-x
- Zeidan AA, Radstrom P, van Niel EW. (2010). Stable coexistence of two *Caldicellulosiruptor* species in a de novo constructed hydrogen-producing co-culture. *Microb Cell Fact.* 9:102. doi:10.1186/1475-2859-9-102

Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 533-616.

Zumft WG (2005) Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(1):194-215.