

Université du Québec

INRS – Institut Armand-Frappier

CARACTÉRISATION DE LA FLORE MICROBIENNE DE BIORÉACTEURS EFFECTUANT  
DE LA DÉPHOSPHATATION BIOLOGIQUE À PARTIR D’AFFLUENTS PISCICOLES  
SYNTHÉTIQUES OU NATURELS

Par

Sébastien Bigras

*Thèse présentée pour l’obtention du grade de Philosophica Doctor en Biologie de l’INRS-Institut  
Armand-Frappier*

Jury d’évaluation

Examineur interne et président du jury

Claude Guertin  
INRS-IAF

Examineur externe

Marc St-Arnaud  
IRBV

Examineur externe

Simon Barnabé  
UQTR

Directeur de recherche

Richard Villemur  
INRS-IAF

Codirecteur de recherche

Serge Parent  
Biodôme de Montréal



INRS - INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**À Marie-Christine et Victor, mes amours :  
Merci d'avoir crût en moi!**

## Résumé

Bien que la déphosphatation biologique soit observée depuis les années 1960, on comprend encore mal la nature des processus qui entrent en jeu. La principale raison de cette méconnaissance réside dans le fait que la ou les espèces bactériennes responsables de ce procédé n'ont pu être isolées et cultivées en cultures pures. Il demeure donc hypothétique d'attribuer à une seule espèce la capacité d'effectuer la déphosphatation biologique. Par contre, des enrichissements récents ont renforcé l'hypothèse que « *Candidatus Accumulibacter phosphatis* » (CAP) serait le principal organisme accumulateur de phosphate (OAP). Bien que des enrichissements d'OAP aient eu lieu dans des systèmes fonctionnant en boues activées, peu d'exemples d'enrichissement ont été réalisés en utilisant la formation de biofilm sur des lits mobiles.

Pour cette étude, un nouveau procédé a été développé pour effectuer la déphosphatation biologique dénitrifiante d'eaux usées contenant de hauts niveaux de nitrate et de phosphate et une faible quantité de matière organique. Ce procédé met en jeu un affluent riche en phosphates et en nitrates, un réacteur séquentiel à lit mobile et un bassin d'accumulation contenant une source de carbone. Le phosphore de l'affluent est accumulé par le biofilm fixé sur les biobilles du réacteur pendant la phase aérobie. L'eau de l'affluent est ensuite remplacée dans le réacteur par une eau anaérobie provenant du bassin d'accumulation (nommé concentrat) qui contient de l'acétate comme source de carbone. Pendant la phase anaérobie, le phosphore est relargué par le biofilm dans l'eau du concentrat. Un autre cycle était alors entamé en remplaçant l'eau du concentrat par l'eau de l'affluent à traiter. L'eau du bac de concentrat est conservée pendant plusieurs cycles. Ce procédé pourrait s'avérer utile dans les systèmes fonctionnant en circuit fermé ou semi-ouvert comme

les aquariums et les aquacultures afin de prévenir l'accumulation des nitrates et des phosphates et de réduire la pollution engendrée par ces types d'opération. En effet, l'industrie piscicole rejette dans l'environnement des quantités importantes de phosphate et de nitrate principalement contenu dans la nourriture n'ayant pas été consommée par les poissons, ainsi que dans leurs fèces. Le problème est littéralement dilué dans l'énorme quantité d'eau que les systèmes ouverts (les plus répandus) utilisent. Actuellement, l'industrie subit des pressions des instances gouvernementales afin qu'elle assainisse ses rejets et qu'elle réduise la quantité d'eau utilisée. Le système que nous proposons répond à ces deux demandes.

Pour sa part, le Biodôme de Montréal, fonctionnant déjà en circuit fermé, a vu ses niveaux de nitrates et de phosphates augmenter de manière constante depuis la création du Saint-Laurent marin. Un système de dénitrification a été mis en fonction en il y a plusieurs années, mais le problème d'excès de phosphate restait entier.

Quatre expériences ont été réalisées, les trois premières en eau douce et la quatrième en eau salée. L'Expérience I a été effectuée avec l'effluent d'un aquarium d'eau salée fonctionnant en circuit fermé. Expérience II a consisté à développer le mode d'opération du procédé avec un affluent entièrement synthétique. L'Expérience III a consisté à optimiser le mode d'opération du procédé avec aussi un affluent synthétique. Finalement, l'Expérience IV a consisté à utiliser un des réacteurs pour traiter l'effluent d'une pisciculture.

La déphosphatation biologique a été observée et mesurée dans les Expériences II, III et IV, mais non dans l'Expérience I. Par contre, les performances d'enlèvement du phosphate de l'expérience I étaient en deçà des attentes. Elle a donc été abandonnée. Pour les expériences II, III et IV, les paramètres biochimiques (polyhydroxyalkanoates (PHA),

glycogène, polyphosphates) ont varié au cours des cycles de façon souvent similaire à ce qui a été observé dans d'autres systèmes de déphosphatation biologique.

En utilisant la technique de PCR avec des amorces spécifiques au gène codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S de CAP, nous avons démontré la présence de cette bactérie dans le biofilm des trois dernières expériences. Aussi, par hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH), nous avons estimé que CAP constituait 30% du biofilm de l'Expérience III. L'apparition d'autofluorescence dans certains échantillons de l'Expérience IV nous a amenés à nous questionner sur les causes possibles de ces résultats. Nous avons ensuite examiné la diversité microbienne du biofilm en clonant et séquençant les gènes codant pour l'ARNr 16S. La plupart des séquences d'ARNr 16S obtenues étaient affiliées avec des séquences provenant de procédés de déphosphatation biologique. Autour de 20% d'entre elles étaient apparentées à des organismes accumulateurs de phosphate (OAP), alors qu'environ 30% étaient proches des organismes accumulateurs de glycogène (OAG), des compétiteurs des OAP.

Bien que l'expérience avec l'eau salée (I) n'ait pas donné les résultats escomptés, les autres expériences ont permis l'enlèvement de phosphate. Cependant, la complexité et les coûts associés à la mise en place et à l'opération d'un tel système font en sorte qu'il nous paraît improbable qu'il puisse être adapté pour les entreprises piscicoles. Au mieux, les aquariums publics pourraient utiliser ce système en eau douce et obtenir des résultats intéressants écologiquement avec des enlèvements significatifs, moyennant des coûts d'exploitation rehaussés.

---

Étudiant

---

Directeur de recherche

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions.

2. It then goes on to describe the various methods used to collect and analyze data.

3. The next section details the results of the study, including the identification of key trends.

4. This is followed by a discussion of the implications of the findings for future research.

5. The final part of the document provides a conclusion and offers suggestions for further study.

6. In addition, the document includes a list of references and a bibliography.

7. The overall goal of this document is to provide a comprehensive overview of the current state of research in this field.

8. It is hoped that this work will contribute to a better understanding of the complex issues at hand.

9. The author would like to thank the following individuals for their assistance and support:

10. Finally, it is worth noting that this document is intended for informational purposes only.

11. It should not be used as a substitute for professional advice or legal counsel.

12. If you have any questions or need further information, please contact the author at the address below.

13. The author's contact information is provided at the end of this document.

14. It is also possible to reach the author via email at the address listed in the references.

15. The author would be happy to provide any additional information that may be helpful.

16. Thank you for your interest in this work and for taking the time to read this document.

17. The author's name and affiliation are provided at the bottom of the page.

18. The date of publication is also included for your reference.

19. The document is available for free download and use under a Creative Commons license.

20. For more information on the license, please visit the Creative Commons website.

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Richard Villemur, pour son approche directe qui a l'avantage de toujours donner l'heure juste sur les objectifs. Je tiens aussi à souligner sa patience envers moi, mais également envers le projet qui a pris des tournures et des délais parfois inattendus. Ses précieux conseils m'ont permis de ne pas trop m'égarer dans les méandres de mes années doctorales.

J'aimerais également remercier mon codirecteur, Serge Parent, dont les encouragements m'ont été nécessaires dans plusieurs situations. Son approche écologique m'a également permis de mettre en perspective certains aspects du projet.

Un merci aux autres membres du comité de déphosphatation biologique. Yves Comeau, Pierre Juteau, Grant Vanderberg, Marc-André Labelle

Merci à tous les étudiants de la Polytechnique de Montréal que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ce projet. Un merci tout spécial à Bertrand Vallet, Juan Restrepo et Charles-Vincent Lussier qui ont tenu les bioréacteurs à bout de bras parfois pour permettre le bon fonctionnement de la déphosphatation.

Je m'en voudrais d'oublier tous les étudiants passés et présents que j'ai eu l'occasion de côtoyer au GRME et qui ont rendu les longues heures passées dans les laboratoires particulièrement agréables. Les discussions sérieuses et moins sérieuses étaient toujours les bienvenues.

Un merci tout spécial aux membres de ma famille qui m'ont énormément supporté moralement, financièrement et qui ont su me pousser lorsque ça s'avérait nécessaire. Merci papa, maman, Caro, J-F et Jean-Mi.

Finalement, je me peux passer à côté des personnes les plus importantes dans ma vie : Marie-Christine et Victor. Marie a toujours été là et a pris un énorme fardeau en attendant la fin de mon Ph.D. Victor qui, malgré son jeune âge, a appris la patience pendant que papa travaille. Ils m'ont donné également la meilleure raison de persévérer quand tout semblait sombre. Je vous suis tous éternellement redevable !

## Table des matières

<b>RESUME.....</b>	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>XII</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Liste des abreviations.....</b>	<b>XV</b>
<b>CHAPITRE I.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Problématique.....	1
1.2 Présentation du document.....	4
<b>CHAPITRE II.....</b>	<b>5</b>
<b>2. REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>5</b>
2.1 Problématique du phosphore.....	5
2.2 La déphosphatation chimique.....	2
2.3 La déphosphatation biologique microbienne.....	3
2.4 Le bioprocédé Enhanced biological phosphorus removal (EBPR).....	8
2.5 Espèces bactériennes constituant les OAP.....	11
2.6 Organismes accumulateurs de glycogène.....	13
2.7 Influence de la source de carbone et du pH sur la déphosphatation biologique.....	15
2.8 Dénitrification.....	16
2.8.1.1 Processus biochimiques.....	17
2.9 Déphosphatation biologique en conditions dénitrifiantes.....	18
2.10 Biofilm.....	19

2.10.1.1	Phases de développement d'un biofilm .....	19
2.10.2.1	Rôle du biofilm .....	23
2.10.3.1	Système de déphosphatation biologique en biofilm .....	24
<b>2.11</b>	<b>Études phylogénétiques des populations bactériennes .....</b>	<b>26</b>
2.11.1	Analyses de la diversité microbienne .....	26
2.11.1.1	Génothèque 16S ribosomal et diversité microbienne .....	27
<b>2.12</b>	<b>Hybridation <i>in situ</i> avec sondes fluorescentes .....</b>	<b>28</b>
<b>2.13</b>	<b>Microscopie.....</b>	<b>29</b>
2.13.1.1	Microscopie en épifluorescence.....	29
2.13.2.1	Microscope confocal à balayage laser (CLSM).....	30
2.13.1.1	Fluorochromes.....	31
<b>2.14</b>	<b>Résultats des études précédents ce projet.....</b>	<b>33</b>
<b>2.15</b>	<b>Principe général du procédé .....</b>	<b>34</b>
<b>2.16</b>	<b>Description des réacteurs .....</b>	<b>34</b>
<b>2.17</b>	<b>Expérience I: Traitement d'un effluent d'eau de mer .....</b>	<b>35</b>
2.17.1.1	Mode opérationnel .....	35
<b>2.18</b>	<b>Expériences II et III : Eau douce avec affluent synthétique (Biodôme de Montréal) .....</b>	<b>38</b>
2.18.1.1	Affluent artificiel d'eau douce .....	38
2.18.2.1	Établissement de la biomasse déphosphatante dans les réacteurs .....	43
2.18.3.1	Cycle typique d'opération.....	43
<b>2.19</b>	<b>Expérience IV: Eau douce d'un affluent piscicole (LARSA).....</b>	<b>44</b>
2.19.1.1	Cycle typique d'opération.....	44
<b>2.20</b>	<b>Description des Expériences.....</b>	<b>47</b>
<b>2.21</b>	<b>Hypothèses de travail.....</b>	<b>56</b>
<b>2.22</b>	<b>Buts de l'étude.....</b>	<b>59</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>Échantillonnage de la biomasse .....</b>	<b>61</b>
3.1.1	Traitement des échantillons .....	62
<b>3.2</b>	<b>Dosage du phosphore.....</b>	<b>62</b>
<b>3.3</b>	<b>Dosage des PHB (modifié de Oehmen <i>et al.</i>, 2005a).....</b>	<b>64</b>

<b>3.4</b>	<b>Dosage des hydrates de carbone totaux (glycogène).....</b>	<b>65</b>
<b>3.6</b>	<b>Extraction des acides nucléiques .....</b>	<b>67</b>
<b>3.7</b>	<b>Amplification des gènes 16S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ..</b>	<b>68</b>
<b>3.8</b>	<b>Amorces .....</b>	<b>70</b>
<b>3.9</b>	<b>Principe du DGGE.....</b>	<b>72</b>
<b>3.10</b>	<b>Génothèques des gènes de l'ARNr 16S.....</b>	<b>74</b>
3.10.1	Purification des produits PCR.....	74
3.10.2	Ligation et transformation.....	75
<b>3.11</b>	<b>Arbres phylogénétiques .....</b>	<b>76</b>
<b>3.12</b>	<b>FISH .....</b>	<b>77</b>
3.12.1	Sondes ADN .....	77
3.12.2	Protocole d'hybridation in situ .....	79
<b>3.13</b>	<b>Coupes minces .....</b>	<b>80</b>
<b>3.14</b>	<b>Colorations.....</b>	<b>82</b>
3.14.1	Coloration de Neisser .....	82
3.14.2	Coloration DAPI .....	83
3.14.3	Coloration des polyhydroxyalkanoates (PHA) .....	83
<b>CHAPITRE IV .....</b>		<b>85</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>Expérience I: Eau salée .....</b>	<b>85</b>
4.	Expérience II.....	88
4.1.1	Caractérisation biochimique de la biomasse déphosphatante.....	88
4.1.2	Caractérisation de la flore microbienne .....	89
<b>4.2</b>	<b>Expérience III.....</b>	<b>91</b>
<b>4.3</b>	<b>Expérience IV: Eau douce d'un affluent piscicole (LARSA).....</b>	<b>96</b>
<b>4.5</b>	<b>Hybridations <i>in situ</i> avec sondes fluorescentes (FISH) .....</b>	<b>101</b>
<b>4.6</b>	<b>Composition de la flore bactérienne de la biomasse déphosphatante .....</b>	<b>106</b>
<b>4.7</b>	<b>Analyses phylogénétiques.....</b>	<b>114</b>

<b>CHAPITRE V</b> .....	<b>127</b>
<b>5 DISCUSSION</b> .....	<b>127</b>
<b>5.1 Importance des résultats pour l'avancer des connaissances sur la déphosphatation</b> .....	<b>127</b>
<b>5.2 Présentations des résultats</b> .....	<b>128</b>
<b>5.4 Expérience I</b> .....	<b>130</b>
<b>Expérience II</b> .....	<b>131</b>
<b>5.4 Expérience III</b> .....	<b>134</b>
<b>5.5 Expérience IV</b> .....	<b>135</b>
<b>5.4 Hybridations in situ avec sondes fluorescentes</b> .....	<b>137</b>
<b>5.5 Organismes autofluorescents</b> .....	<b>137</b>
5.5.1 Bactéries.....	138
5.4.3 Cyanobactéries .....	139
5.5.2 Archaeobactéries.....	139
<b>5.6 Composition de la flore bactérienne</b> .....	<b>140</b>
5.6.1 Analyses phylogénétiques.....	141
<b>5.7 La déphosphatation biologique en eau salée</b> .....	<b>145</b>
<b>5.8 La dénitrification en eau douce en milieu piscicole</b> .....	<b>146</b>
<b>5.9 La déphosphatation biologique en milieu piscicole</b> .....	<b>147</b>
<b>CHAPITRE VI</b> .....	<b>149</b>
<b>6 CONCLUSION</b> .....	<b>149</b>
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>153</b>

## Liste des figures

Figure 2.1 : Schéma modèle d'un OAP durant la phase anaérobie (a) et aérobie/anoxie (b)...	6
Figure 2.2 : Modèle de développement d'un biofilm.....	21
Figure 2.3 : Schéma du réacteur à chacune des étapes de la déphosphatation biologique dans le système avec bac de concentrat (a) et suivi théorique des principales molécules d'intérêt au cours de ces étapes (b) (Modifié de Vallet, 2007).....	36
Figure 2.4 : Montage expérimental du banc d'essai au Biodôme de Montréal.....	39
Figure 2.5 : Medium de plastique Cascades-1A® avec de la biomasse. Le diamètre du médium est de 5 cm.....	40
Figure 2.6 : Bioréacteur de 110 L et bac de concentrat de 220L retrouvés au Biodôme de Montréal.....	42
Figure 2.7 : Photographie du réacteur au LARSA. Le réacteur (a) a été approvisionné par un affluent venant de la cuve c. Le concentrat était dans le bac de concentrat (b) (J. Restrepo <i>et al.</i> , 2009).....	46
Figure 2.8 : Devenir des solides volatiles totaux fluctuant par rapport au temps suivant le démarrage avec un affluent salé.....	48
Figure 2.9 : Quantité de phosphore relargué par cycle selon le nombre de jours après le départ en eau salée.....	49
Figure 2.10 : Suivi de la quantité de matières totales(MT) et de matières volatiles totales (MVT) dans les réacteurs 1 et 2 du Biodôme de Montréal en conditions de déphosphatation avec un affluent artificiel.....	51
Figure 2.11 : Quantification du phosphore relargué dans les bacs de concentrat pour les réacteurs 1 et 2 lors de l'Expérience II.....	54
Figure 2.12: Récupération des o-PO <sub>4</sub> de l'affluent dans le concentrat du réacteur 1 au cours de l'Expérience III.....	55
Figure 2.13 : Ratios d'enlèvement du phosphate et de la demande chimique en oxygène/PO <sub>4</sub> -P dans l'affluent pendant les 5 périodes de l'expérimentation au LARSA.....	57
Figure 3.1 : Le plasmide pGEM-T Easy (Invitrogen) a été mis au point afin de réaliser le clonage des produits PCR.....	78
Figure 4.1 : Colorations de biofilm dispersé des réacteurs effectuant de la déphosphatation biologique en eau salée.....	86
Figure 4.2 : Gel de polyacrylamide à gradient dénaturant (DGGE) d'échantillons de biomasse provenant des deux réacteurs (R1 et R2) du Biodôme de Montréal au cours de l'Expérience I (en eau salée).....	87
Figure 4.3 : Quantités intracellulaires de PHB, glucose et phosphore total pour l'expérience I du réacteur 1 (affluent synthétique au Biodôme de Montréal).....	90
Figure 4.4 : Colorations de biofilm dispersé des réacteurs effectuant de la déphosphatation biologique en eau douce à Granby et dans les réacteurs du Biodôme.....	92
Figure 4.5 : Gel de polyacrylamide à gradient dénaturant de trois échantillons provenant d'un réacteur déphosphatant un affluent synthétique.....	93
Figure 4.6 : Produits PCR spécifique ciblant les OAP pour l'échantillon du jour 148.....	94
Figure 4.7 : Gel de polyacrylamide à gradient dénaturant de trois échantillons provenant d'un réacteur déphosphatant un affluent synthétique.....	95

Figure 4.8 : Colorations d'un biofilm dispersé des réacteurs effectuant de la déphosphatation biologique en eau douce en fin d'anaérobie.....	97
Figure 4.9 : Suivi d'un cycle à la 207 <sup>e</sup> journée de l'Expérience III pour les quantités intracellulaires de PHB, glucose et phosphate total.....	98
Figure 4.10 : Produit PCR spécifique ciblant les OAP pour les échantillons des jours 0, 140 et 207 de l'Expérience III.....	98
Figure 4.11 : Quantités intracellulaires de PHB, de glucose et de phosphore total pour l'Expérience IV du réacteur 1 (affluent piscicole au LARSA) pour le jour 140. n = 3 (trois par paramètres mesurées par condition expérimentale).....	100
Figure 4.12 : Profil bactérien dérivé de PCR-DGGE sur trois échantillons provenant du réacteur déphosphatant un affluent piscicole.....	102
Figure 4.13 : Colorations de biofilm dispersé des réacteurs effectuant de la déphosphatation biologique en eau douce avec un affluent piscicole.....	103
Figure 4.14 : Produit PCR spécifique ciblant les OAP pour l'échantillon des jours 0, 21, 84 et 140 de l'Expérience IV.....	104
Figure 4.15 : Images d'un même champ microscopique du biofilm provenant d'un système de déphosphatation avec un affluent artificiel (Expérience II) en hybridation <i>in situ</i> avec sondes fluorescentes.....	107
Figure 4.16 : Images d'un même champ microscopique du biofilm provenant d'un système de déphosphatation avec un affluent artificiel (Expérience III) en hybridation <i>in situ</i> avec sondes fluorescentes.....	108
Figure 4.17 : Image d'un champ microscopique du biofilm provenant d'un système de déphosphatation avec un affluent d'un bassin d'aquaculture (Expérience IV) en hybridation <i>in situ</i> avec sondes fluorescentes.....	109
Figure 4.18 : Images d'un même champ microscopique du biofilm provenant d'un système de déphosphatation avec au cours de l'Expérience IV.....	110
Figure 4.19 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Alphaprotéobactéries.....	118-119
Figure 4.20 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Betaprotéobactéries..	120-123
Figure 4.21 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Deltaprotéobactéries.....	124
Figure 4.22 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Chloroflexi.....	124
Figure 4.23 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Gammaprotéobactéries...	125
Figure 4.24 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Acidobactéria.....	126
Figure 4.25 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Candidates OP11.....	126

## Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Types de lasers utilisées en microscopie confocale.....	31
Tableau 2.2 : Fluorochromes utilisés comme colorations fluorescentes. ....	32
Tableau 2.3 : Durée des phases d'opération du réacteur du SLM avec bac de concentrat.....	37
Tableau 2.4 : Caractéristiques de l'affluent synthétique d'eau douce (n=14) utilisé par Vallet (2007).....	41
Tableau 2.5 : Durée des phases d'un cycle dans l'Expérience II. ....	41
Tableau 2.6 : Durée des phases d'un cycle avec l'affluent provenant d'un bassin d'une pisciculture.....	45
Tableau 3.1 : Étapes de la PCR avec les amorces 8f et 1534r ainsi qu'avec les amorces 341F-CG et 534r.....	70
Tableau 3.2 : Séquences des amorces utilisées.....	71-72
Tableau 3.3 : Séquences des sondes oligonucléotidiques et leur site cible .....	80
Tableau 4.1 : Nombres de clones associés à chaque groupe bactérien et nombre de séquences différentes pour chacun de ces groupes. ....	111
Tableau 4.2: Nombre de clones associés aux divisions bactériennes et avec l'origine de séquences affiliées les plus rapprochées dans les banques de données. ....	113

## Liste des abréviations

La liste des abréviations a été ajoutée afin de faciliter la lecture de certaines sections.

ADN	acide désoxyribonucléique
AGV	acide gras volatil
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAP	<i>Candidatus</i> Accumulibacter phosphatis
COD	demande chimique en oxygène
DCO/L	demande chimique en oxygène par volume d'eau traitée
DGGE	électrophorèse sur gel à gradient dénaturant
DNOAP	organisme(s) accumulateur(s) de phosphate dénitrifiant(s)
EBPR	déphosphatation biologique ( <i>enhanced biological phosphorus removal</i> )
EPS	substances extracellulaires polymériques
FISH	hybridation <i>in situ</i> à l'aide de sondes fluorescentes
FITC	fluorescéine isothiocyanate
GC	chromatographie en phase gazeuse
HPLC	chromatographie liquide haute performance
MS	spectromètre de masse
NCBI	National Center of Biotechnology Information
OAG	organisme(s) accumulateur(s) de glycogène
OAP	organisme(s) accumulateur(s) de phosphate
Pi	phosphore inorganique

<b>PCR</b>	<b>réaction de polymérisation en chaîne</b>
<b>PHA</b>	<b>polyhydroxyalkanoates</b>
<b>polyP</b>	<b>polyphosphates</b>

# CHAPITRE I

## 1. Introduction

### 1.1 Problématique

Avec l'industrialisation de l'agriculture, les stress environnementaux subis par les milieux agricoles sont devenus de plus en plus forts et présents. Tant l'enrichissement des terres que l'épandage des déjections animales en passant par le déversement des eaux usées représentent des menaces pour l'équilibre précaire des écosystèmes des régions rurales. Des groupes visant le resserrement des normes en matière d'environnement ont commencé à faire des pressions pour rendre les pratiques agricoles intensives moins risquées. Depuis, la recherche visant des solutions durables aux problèmes rencontrés s'est grandement accentuée.

Le principal problème des industries piscicoles est relié aux rejets directs ou indirects de matières organiques et inorganiques (principalement l'azote et le phosphore) dans les eaux de surface. Généralement, le phosphore est considéré comme l'élément le plus limitant dans l'environnement. En effet, il n'existe pas de réservoirs atmosphériques de phosphore comme c'est le cas pour l'azote, l'oxygène et le carbone, et sa présence dans le sol dépend entièrement de l'effritement des roches. Considérant l'importance du phosphore dans les différentes réactions biochimiques, notamment dans la formation des acides nucléiques, le phosphore biodisponible est habituellement rapidement intégré dans la chaîne trophique par le biais des végétaux. Ces rejets de phosphore biodisponible ont été dans le passé la cause de phénomènes d'eutrophisation en aval de leur source, c'est-à-dire qu'une croissance excessive d'espèces aquatiques, principalement des végétaux, présents dans l'eau a été observée, ce qui amène une augmentation de la turbidité de l'eau. Cette turbidité entraîne une diminution de l'apport de lumière dans la colonne d'eau affectant la croissance des végétaux habituellement présents, ce qui entraîne de

graves perturbations dans l'équilibre de l'écosystème aquatique. Les organismes aquatiques tels que les poissons et divers invertébrés aquatiques se sont alors retrouvés dans des situations précaires à cause de la réduction de l'oxygène dissous, phénomène pouvant mener à la disparition de certaines espèces faisant partie de la chaîne trophique ou ayant un potentiel récréotouristique.

L'industrie piscicole n'échappe pas à ces problématiques. En réalité, l'énorme volume d'eau utilisée par ces entreprises reçoit peu de traitement avant son rejet dans les eaux de surface. En effet, le séjour de deux heures dans un bassin de sédimentation exigé par le ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec réussit à peine à réduire les concentrations des différents déchets organiques rejetés par les poissons. Le volume considérable d'eau utilisée par ces industries est attribuable à leur mode de fonctionnement en circuit ouvert. Ce mode a pour avantage de maintenir les concentrations des différents rejets métaboliques, dont l'azote ammoniacal ( $N-NH_3$ ), en deçà des concentrations nuisibles pour les espèces aquicoles. Cependant, deux grands défauts sont associés à cette pratique : premièrement, les rejets, bien que dilués, demeurent suffisamment concentrés pour avoir des répercussions sur l'environnement et deuxièmement, la quantité d'eau utilisée par les piscicultures (environ  $300 \text{ m}^3 * \text{jour}^{-1}$  pour une ferme produisant 100 tonnes de truites par an) est immense et la réglementation à cet effet empêche la croissance économique des entreprises œuvrant en aquaculture.

Une solution possible à ces deux problèmes est l'instauration d'un système opérant en circuit fermé ou, du moins, partiellement fermé. Les conséquences sur la quantité d'eau utilisée seraient drastiques. Cependant, ce genre de système implique l'élaboration de moyens efficaces pour l'enlèvement d'une partie importante des déchets inorganiques des effluents, principalement les nitrates et les phosphates. Or, bien qu'il soit possible de retirer ces deux éléments par des procédés chimiques, ces moyens s'avèrent coûteux et habituellement complexes à utiliser d'un point de vue environnemental. Favoriser l'établissement d'un consortium bactérien ayant une

action déphosphatante dans des bioréacteurs situés à la sortie de l'entreprise (ou de l'industrie) pourrait s'avérer une solution moins coûteuse et plus en accord avec le principe de développement durable.

Déjà plusieurs études ont mis en évidence des espèces bactériennes ayant la capacité de dégrader le nitrate en azote gazeux, procédé de plus en plus utilisé dans le traitement des eaux usées. Aussi, depuis plusieurs années, la réduction des niveaux de phosphate dans les eaux usées a fait l'objet d'études importantes. Or, bien que le procédé utilisé par la flore bactérienne récupérant le phosphate soit utilisé à pleine échelle dans de nombreuses usines d'épuration à travers le monde, une importante controverse demeure quant à l'identité des espèces responsables de ce phénomène.

Dans cette étude, un protocole visant la caractérisation de la flore microbienne dénitrifiant et déphosphatant simultanément l'eau d'affluents artificiels et naturels a été mis en œuvre dans le but de connaître les espèces impliquées ainsi que les phénomènes biologiques s'y rattachant. L'expérience a également été transposée à un bassin d'eau salée contenant des poissons du Biodôme de Montréal. Au total, quatre expériences ont été réalisées afin d'optimiser la procédure dans plusieurs conditions. Les flores bactériennes de biofilms développés dans des réacteurs reliés aux bassins d'eau douce et d'un bassin d'eau salée ont été étudiées. Les retombées d'une telle étude pouvaient s'avérer importantes pour les aquariums publics et les piscicultures tant sur le plan économique que sur le plan écologique en raison de la diminution des impacts des déversements d'eaux usées.

## **1.2 Présentation du document**

Cette thèse est présentée de façon classique et est divisée en six chapitres. Le premier chapitre présente une mise en contexte de la recherche, une présentation de l'étude, et les objectifs des travaux effectués. Le second chapitre présente une revue de la littérature sur les sujets touchés au cours de cette thèse, à savoir la déphosphatation biologique, les biofilms, les études phylogénétiques et les différentes techniques d'analyse. Le troisième chapitre présente la méthodologie utilisée pour l'atteinte des différents objectifs. Aussi, les expériences FISH et la confection d'arbres phylogénétiques sont abordées au cours de ce chapitre. Le quatrième chapitre présente les résultats obtenus lors de cette étude. D'abord séparés selon les quatre modes d'opération appelés Expérience I, II, III et IV auxquels ils se rapportent en ce qui a trait aux dosages, aux performances et aux DGGE, les résultats sont ensuite réunis pour les expériences FISH et les analyses phylogénétiques où toutes les séquences analysées ont été regroupées. Le cinquième chapitre discute des résultats obtenus dans chaque expérience, mais également dans leur ensemble. Finalement, le sixième et dernier chapitre présente les conclusions qui ont été tirées des résultats et de la discussion.

## CHAPITRE II

### 2. REVUE DE LITTÉRATURE

#### 2.1 Problématique du phosphore

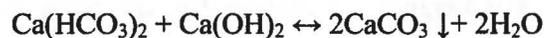
Bien que le phosphore ne soit pas l'élément le plus représenté dans les êtres vivants, il n'en demeure pas moins qu'il y joue un rôle de primordial. En effet, la stœchiométrie appliquée à l'étude du vivant a établi le ratio CHONP à  $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P_1$ , ce qui fait du phosphore l'élément le moins abondant parmi les cinq principaux constituants du vivant. Par contre, le phosphore joue un rôle d'une grande importance dans la plupart des réactions biochimiques de tous les êtres vivants. En effet, le phosphore est le principal accumulateur d'énergie sous forme d'ADP et d'ATP (adénosine di- et triphosphate) de même que dans la synthèse et la composition des acides nucléiques. Or, le phosphore libre est très rare en milieu naturel. Il arrive donc que ce soit l'élément limitant la croissance du vivant. Pour cette raison, les problèmes de déversement de phosphate dans les eaux de surface et les eaux souterraines mènent habituellement à un phénomène d'eutrophisation (croissance excessive d'algues unicellulaires) en eau douce, ce qui a pour conséquence d'engendrer des pertes pour la faune aquatique, pour l'attrait des loisirs ainsi que pour les procédés agricoles et industriels (Comeau, 1990). L'eutrophisation est le principal problème pour les eaux de surface lors de déversements d'éléments limitants, tels que le phosphore et l'azote, par des sources ponctuelles ou diffuses. Elle consiste en une croissance excessive des algues unicellulaires qui vont ainsi perturber grandement le fragile écosystème des eaux de surface en abaissant le taux d'oxygène dans l'eau à des niveaux souvent mortels pour les autres organismes aquatiques et en privant les autres autotrophes de la lumière nécessaire à la photosynthèse. Bien que les surplus de production d'algues puissent avoir plusieurs causes, en eau douce c'est principalement le phosphore, élément limitant pour la croissance, qui en est la

cause. En effet, Schindler (1974) a démontré l'importance du phosphore dans l'eutrophisation en suralimentant un lac séparé en son milieu d'une membrane imperméable. Une moitié du lac était alimentée avec des nitrates tandis que l'autre avec l'était avec du phosphate. Celle alimentée avec du phosphate a été la seule à avoir connu une croissance exponentielle d'algues d'où l'importance d'éviter les déversements de phosphore dans l'environnement.

## 2.2 La déphosphatation chimique

Il existe diverses façons de précipiter le phosphate inorganique, dont l'utilisation d'agents chimiques. Les principaux agents utilisés sont des solutions concentrées en calcium, en aluminium et/ou en fer. Tous ces minéraux ont la capacité de s'allier aux ions de phosphates et d'en entraîner la précipitation.

Le calcium est habituellement ajouté sous sa forme basique  $\text{Ca(OH)}_2$  et agit sur l'alcalinité de l'eau usée pour en augmenter le pH jusqu'à 10.

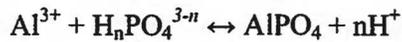


Une fois que le pH a atteint une valeur supérieure à 10, les ions de calcium excédentaires vont réagir avec le phosphate pour précipiter sous la forme d'hydroxyapatite.



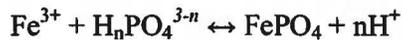
La quantité requise de  $\text{Ca(OH)}_2$  pour induire cette réaction va habituellement être indépendante de la quantité de phosphate, mais va être reliée à la quantité de base nécessaire pour monter le pH au-dessus de 10. Ce processus requiert habituellement que le pH de l'eau soit abaissé en ajoutant du  $\text{CO}_2$ .

L'alun ou le sulfate d'aluminium est grandement utilisé pour la précipitation des phosphates en phosphate d'aluminium selon la réaction suivante :



Cette réaction quoique simple d'apparence est fonction de plusieurs conditions en regard de l'alcalinité, du pH et des éléments traces dans l'eau à traiter. Puisque cette réaction est fonction de la quantité de phosphate retirée (précipitée), l'efficacité de la précipitation va diminuer à mesure que le phosphate va diminuer (Eddy, 2003).

Pour ce qui est de la précipitation avec le fer, les substances utilisées sont habituellement le chlorure ou le sulfate ferrique, ou le sulfate ferreux. Bien que la réaction demeure partiellement comprise, le principe est le suivant :



L'ion ferrique se combine au phosphate pour former du phosphate ferrique. Il a été observé que la précipitation est facilitée par une augmentation du pH (Eddy, 2003).

La déphosphatation chimique s'avère efficace dans certaines conditions, mais les coûts monétaires et environnementaux qui en découlent sont considérables. Une des hypothèses avancées pour pallier ces coûts est l'utilisation des scories d'aciéries, qui sont générées lors de la production de l'acier. En effet, les aciéries génèrent des scories comme déchets de production de l'acier. Or, ces scories d'aciéries sont gorgées d'ions métalliques de toutes sortes tels que le calcium, l'aluminium et le fer, qui favoriseraient l'enlèvement chimique du phosphate à coûts moindres (Jreige, 2005).

### **2.3 La déphosphatation biologique microbienne**

Il est connu depuis les années 60 que certains microorganismes ont la capacité d'accumuler le phosphore en excès, c'est-à-dire au-delà de leurs besoins métaboliques (Levin et Shapiro, 1965). Le nom d'organismes accumulateurs de phosphate (OAP) leur a été attribué. Des

expériences remontant au milieu des années 70 avaient pour objectif de percer à jour la déphosphatation (Fuhs et Chen, 1975) qui n'avaient jusqu'alors que peu susciter d'attention, malgré l'observation de l'assimilation du phosphore au-delà des besoins métaboliques des organismes. La déphosphatation biologique se fait en deux étapes successives, soient les phases aérobie et anaérobie (Fig. 2.1). Globalement, l'acétate ajouté au milieu comme source de carbone est assimilé par les OAP au début de la phase anaérobie grâce à un ion d'hydrogène évacué par transport actif. À cette étape, le milieu devrait être en condition anaérobie, c'est-à-dire complètement dénitrifié et désoxygéné. En effet, il est important d'inhiber la croissance des microorganismes en évitant de fournir un accepteur d'électrons (comme des nitrates ou des sulfates) combinés à une source de carbone (acétate). L'énergie nécessaire au transport de la source de carbone vient de l'hydrolyse des polyphosphates (polyP) déjà emmagasinés à l'intérieur des cellules qui seront ainsi dégradés. Les orthophosphates issus de cette dégradation seront ensuite relargués dans le milieu (Mino *et al.*, 1998). L'acétate est transformé successivement en acide acétique puis en acétyl-CoA qui se trouve à la base du cycle de Krebs. L'acétyl-CoA sert également de précurseur à la formation de  $\beta$ -hydroxybutyrate, de la famille des poly hydroxyalkanoates (PHA) dont le rôle principal est de constituer une réserve de carbone servant à la production d'énergie pour la synthèse de métabolites cellulaires.

Durant la phase aérobie, la dégradation de la réserve de PHA permettra la fabrication de réserves de poly phosphate (polyP) et de glycogène. L'énergie de cette dégradation servira à fournir l'énergie nécessaire à la croissance des OAP. En effet, ces derniers étant les seuls à avoir la source de carbone des réserves intracellulaires de PHA, ils seront les seuls à croître en utilisant l'oxygène du milieu pour effectuer la respiration cellulaire. Les OAP ont un avantage écologique de posséder la source de carbone et l'accepteur d'électron dans un système d'alternance des

phases anaérobie et aérobie.

Deux hypothèses opposées ont été proposées, afin d'expliquer la provenance de la source d'énergie nécessaire à la formation de PHA à partir d'acétyl CoA (Mino, 2000). D'une part, l'énergie de cette transformation pourrait provenir de la dégradation de molécules de NADH en NAD<sup>+</sup>, donc du cycle de Krebs. D'autre part, la dégradation des polyphosphates (polyP) en phosphates inorganiques (Pi) et la formation d'ATP pourraient également constituer la source d'énergie qui permet la conversion de l'acétyl-CoA en PHA. Suite à la dégradation des polyP en anaérobie, les Pi résultants sont sécrétés à l'extérieur de la cellule grâce à un enzyme de transport  $\Delta$ pH-dépendant qui cotransporte les cations métalliques (potassium, magnésium et calcium) (Comeau *et al.*, 1987).

Pendant la phase aérobie, les OAP utilisent les PHA oxydés par les conditions du milieu, contribuant ainsi à l'activation du métabolisme des OAP. Durant cette étape, les OAP croissent (division cellulaire) et accumulent les orthophosphates afin de recouvrir le niveau de polyP en utilisant les PHA emmagasinés comme source de carbone et d'énergie (Mino *et al.*, 1998) (Fig. 2.1). Parce qu'il n'y a pas d'ajout de matière organique ni de source de carbone externe, les PHA produits à partir de l'acétate pendant la phase anaérobie sont essentiellement la seule source de carbone en condition aérobie. Ainsi, seules les bactéries ayant assimilé des PHA en grandes quantités sont en mesure de croître de façon importante durant cette phase. Puisque les OAP ont l'avantage écologique d'assimiler la matière organique en anaérobie et d'emmagasiner le carbone sous forme de PHA de façon importante, ces bactéries sont donc mieux adaptées que les autres bactéries hétérotrophes non déphosphatantes (Mino *et al.*, 1998). Une fois oxydés, la matière organique et les PHA sont dégradés en acétyl CoA pour ensuite alimenter le cycle de Krebs afin d'augmenter la production d'ATP et de NADH ainsi que de CO<sub>2</sub>. Le NADH produit sert à

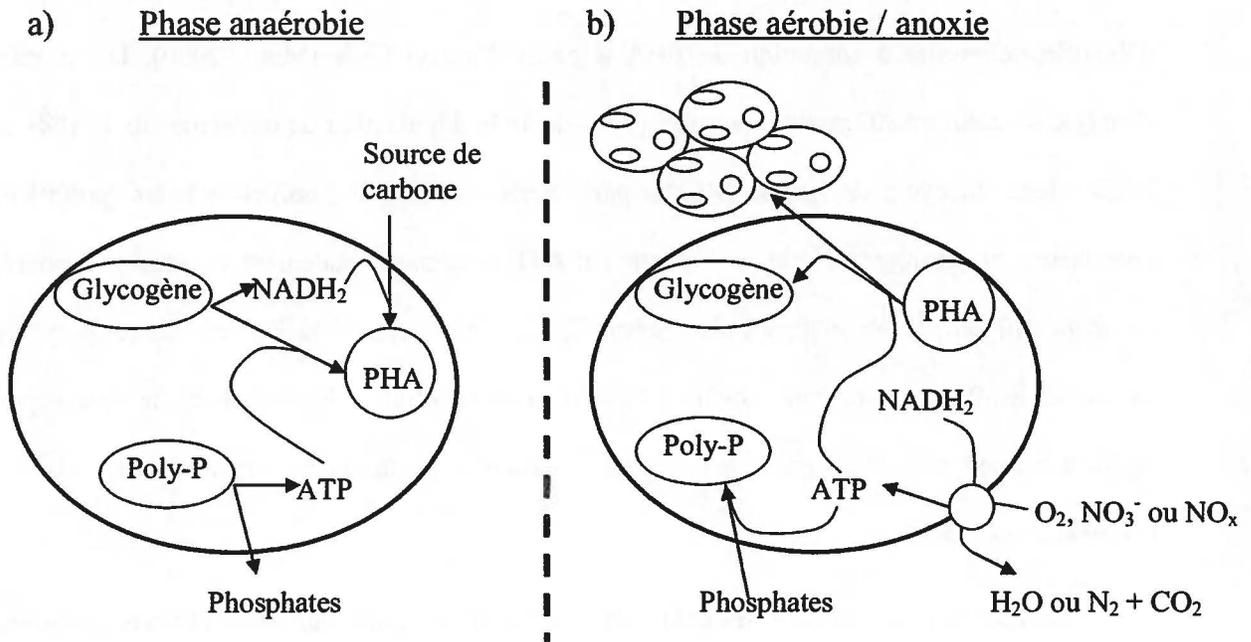


Figure 2.1 : Schéma modèle d'un OAP durant la phase anaérobie (a) et aérobie/anoxie (b).

l'évacuation des ions hydrogène ce qui permet de maintenir un gradient de potentiel élevé entre l'intérieur de la cellule et le milieu dans lequel elle évolue. Ce processus se produit grâce à la chaîne de transport d'électrons. Le gradient obtenu a deux fonctions principales soit la facilitation de l'entrée d'ions phosphates par cotransport avec des ions tels que le potassium, le magnésium et le calcium, et la production d'ATP par l'entremise de l'ATPase. Cette ATP est utilisée pour fournir l'énergie nécessaire à l'accumulation du phosphate sous forme de polyP lors de la phase aérobie. Le transport des phosphates vers leur lieu de stockage serait également permis grâce à l'oxydation de molécules de NADH sur la chaîne de transport d'électrons produisant les ATP requises pour le transport et le stockage des polyP. Le phosphore inorganique (Pi) accumulé dans le cytoplasme est alors transformé en polyP. Les polyP s'accumulent sous forme de chaînes de Pi pouvant être de longueurs variées. Tant qu'une carence en accepteurs d'électrons n'est pas observée, il y aura accumulation de polyP dans les OAP et une augmentation de la biomasse. Les éléments souvent limitants de la croissance bactérienne utilisés pendant la synthèse d'acides nucléiques tels que le soufre et l'azote, ne sont pas limitants pour ce système puisque ce sont les accepteurs d'électrons tels que l'oxygène et les nitrates qui devraient être carencés les premiers. La carence en phosphore est compensée par une suraccumulation des phosphates sous forme de polyP pendant les périodes d'abondance suivant des périodes de carence, ce qui confère ainsi un avantage écologique aux OAP (Mino *et al.*, 1998).

Parce que les PHA, formés lors de la phase anaérobie, sont des polymères réduits, leur synthèse requiert un pouvoir réducteur. Une controverse quant à la source de ce pouvoir réducteur a entraîné l'élaboration de deux modèles biochimiquement très différents : le modèle Mino et le modèle Comeau-Wentzel (Wentzel *et al.*, 1991). Dans le modèle Mino (révisé par

Mino *et al.*, 1998), le pouvoir réducteur proviendrait de la dégradation du glycogène intracellulaire tandis que dans le modèle Comeau-Wentzel (Comeau *et al.*, 1986; Wentzel *et al.*, 1986), l'oxydation partielle de l'acétyl-CoA à travers le cycle de Krebs serait responsable du pouvoir réducteur. Les études de Smolders *et al.*, (1994 a et b) semblent démontrer que du glycogène se forme durant la phase aérobie. De plus, comme le supposait le modèle de Mino, c'est l'énergie provenant de la glycolyse en anaérobiose qui contribuerait à la formation des PHA (Mino *et al.* 1998). Le glycogène intracellulaire aurait pour rôle de maintenir l'équilibre oxydoréduction lors de l'assimilation de l'acétate en phase anaérobie (Mino *et al.* 1998). En effet, il a été remarqué que lors de la phase en anaérobiose, un des principaux PHA formés était le 3-hydroxyvalérate (3HV) qui a comme précurseurs un acétyl-CoA et un propionyl-CoA, qui sont synthétisés à partir de l'acétate et du pyruvate, respectivement (Satoh *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994). Deux voies métaboliques sont connues pour la transformation du pyruvate en propionyl-CoA chez les bactéries anaérobies : la voie succinate-propionate et la voie de l'acide acrylique (Gottschalk, 1986).

#### **2.4 Le bioprocédé Enhanced biological phosphorus removal (EBPR)**

Il existe un procédé qui consiste à retirer le phosphate des eaux usées à l'aide d'une méthode biologique. Il s'agit du *Enhanced biological phosphorus removal* (EBPR) (Barnard, 1975). Cependant, à l'époque, les détails concernant l'EBPR demeuraient totalement inconnus des scientifiques. Par exemple, un relargage du phosphore dans certaines boues activées d'usines de traitement des eaux fut observé sans toutefois s'expliquer. Ce n'est qu'en 1975 que l'importance de la séquence des phases anaérobie et aérobie a été démontrée (Fuhs et Chen, 1975). Ces mêmes auteurs furent les premiers à émettre l'hypothèse que les bactéries

responsables de la déphosphatation étaient du genre *Acinetobacter* ainsi qu'à observer l'accumulation de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB).

En 1974, des études démontrèrent pour la première fois l'importance de l'exclusion des nitrates dans la zone d'anaérobie, car la déphosphatation semblait en souffrir (Barnard, 1974). En effet, un relargage du phosphate a été observé lorsque la zone d'anaérobie contenait des traces de nitrates, ce qui a été confirmé par plusieurs études par la suite (voir la revue de Comeau, 1990). La même observation a été faite concernant la présence de traces d'oxygène (Paepcke, 1983), ce qui entraîna l'élaboration d'un système minimisant la turbulence en créant un mouvement mécanique.

C'est seulement au début des années 80 que de sérieuses questions concernant les réactions biochimiques associées au procédé de déphosphatation ont été soulevées. En effet, à cette époque, une controverse s'appuyant sur deux hypothèses régnait au sein de la communauté scientifique. Tandis que certains prétendaient que la déphosphatation n'était que le résultat de réactions chimiques, les autres penchaient plus pour des aspects biologiques comme l'accumulation des polyphosphates (polyP) par la biomasse.

Les procédés EBPR les plus souvent utilisés dans les systèmes de traitement des eaux usées utilisent des bassins de boues activées. En effet, ce procédé utilise la prolifération microbienne à grande échelle afin de dégrader et de transformer les différentes substances retrouvées dans les eaux usées.

Les systèmes fonctionnant avec des boues activées peuvent être des systèmes à alimentation continue ou en cuvée utilisant des réacteurs biologiques séquentiels (RBS). Les systèmes en boues activées utilisent généralement un brassage mécanique ou l'injection d'un gaz inerte pour uniformiser les conditions des bassins. Ainsi, dans les systèmes de déphosphatation

biologique reliés au traitement des eaux usées, le brassage de la phase anaérobie est généralement fait par recirculation de l'eau à moyenne et grande échelle ce qui s'avère relativement peu dispendieux comme processus. Dans cette situation, l'oxygène contenu dans l'eau provenant de l'affluent est consommé au début de la phase anaérobie par les hétérotrophes. À l'échelle laboratoire (petite échelle), il n'est pas rare d'utiliser l'injection d'azote gazeux qui a l'avantage d'avoir une double fonction : désoxygéner et brasser la boue activée.

Bien que l'EBPR soit utilisé à grande échelle pour le traitement des eaux usées municipales, son perfectionnement à l'échelle du laboratoire offre les rendements les plus intéressants (van Loosdrecht *et al.*, 1997). Dans les processus en boue activée utilisant des RBS, la boue activée est assujettie à des périodes anaérobie et aérobie où la source de carbone est seulement présente lors des périodes anaérobies. La croissance d'organismes capables de métaboliser l'acétate en absence d'accepteurs d'électrons est ainsi favorisée. Aussi, la période aérobie aura pour effet de tuer la plupart des bactéries anaérobies strictes. De cette façon, les OAP sont presque les seuls organismes dont la croissance soit favorisée.

Outre les OAP, certaines bactéries sont capables de transformer la source de carbone en granules de glycogène dans des conditions similaires à celles requises par les OAP. En effet, les organismes accumulateurs de glycogène (GAO), à l'instar des OAP, métabolisent la source de carbone en granules de PHA en période anaérobie. Cependant en période aérobie, les OAG accumulent le glycogène plutôt que le phosphate.

#### 2.4.1.1 Mode d'opération en cuvée

Le mode d'opération en cuvée consiste à exposer l'eau à traiter à une condition fixe

durant un certain temps pour ensuite les changer. Il est souvent question de cuvées séquentielles qui sont connues sous le nom de *sequencing batch reactor*. Il s'oppose au mode continu qui implique de longs bassins et un apport constant d'eau à traiter. Dans ce dernier mode, les changements de conditions dans le traitement de l'eau ont lieu au fur et à mesure que l'eau avance dans le bassin.

## 2.5 Espèces bactériennes constituant les OAP

Peu d'espèces retrouvées au niveau des procédés EBPR ont été isolées à ce jour. Ce n'est que grâce aux techniques modernes de biologie moléculaire que plusieurs espèces constituant la flore des bioréacteurs ont pu être identifiées et classées parmi différents groupes de bactéries tels les protéobactéries, les Cytophages et les Actinobactéries. Plusieurs de ces bactéries ont la capacité d'accumuler les phosphates et les PHA. Bien que quelques genres bactériens comme *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* et *Lampropedia* provenant de réacteurs faisant de la déphosphatation aient été identifiés, peu de ceux-ci ont prouvé leur efficacité dans le procédé EBPR. En effet, la plupart avaient la capacité d'accumuler soit les polyphosphates, soit les PHA, mais peu pouvaient faire les deux (vanLoosdrecht *et al.*, 1997; Mino *et al.*, 1998; Mino, 2000; Blackall *et al.*, 2002). Par exemple, le genre *Actinobacter* ne représentait que 10% du total des bactéries présentes ce qui n'aurait pas été suffisant pour expliquer le retrait du phosphore observé (Wagner *et al.*, 1994; Bond *et al.*, 1995; Kampfer *et al.*, 1996). Ensuite, les bactéries Gram positif riches en G+C ont fait l'objet d'études à cause de leur facilité à assimiler l'acétate. Cependant, aucune des bactéries appartenant à ce groupe n'a pu assimiler l'acétate et le transformer en PHA à l'aide des polyP en anaérobie (Wagner *et al.*, 1994). Une étude approfondie sur l'espèce *Microtholunatus phosphovorius* appartenant aux bactéries Gram positif riches en G+C a montré que

celle-ci assimilait non pas l'acétate, mais exclusivement le glucose (Nakamura *et al.*, 1995), l'excluant ainsi du groupe très sélect des OAP. Aussi, certaines espèces du genre *Lampropedia* présentaient les traits recherchés pour être considérées comme des OAP à l'exception de leur arrangement unique en feuille, qui n'est habituellement pas retrouvé dans les systèmes d'EBPR (Stante *et al.*, 1997).

Un organisme appartenant au groupe des  $\beta$ -protéobactéries se rapprochant du genre *Rhodocyclus* présente des propriétés intéressantes faisant de lui un candidat prometteur au titre de OAP : *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (Levantesi *et al.*, 2002). Il s'agirait d'une  $\beta$ -protéobactérie de forme coccobacille de 1,0 à 1,5  $\mu\text{m}$  produisant des colonies filamenteuses et pouvant former des floccs, particules en suspension en agrégats floconneux, avec les microorganismes avoisinants (Crocetti *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Une étude métagénomique a permis d'obtenir des indications beaucoup plus importantes concernant les OAP (Garcia Martin *et al.*, 2006). Les auteurs de cette étude ont optimisé les conditions de culture afin de favoriser la croissance d'*Accumulibacter* ce qui leur a permis d'effectuer une étude métagénomique donnant ainsi accès à la séquence de tout le génome de *Candidatus Accumulibacter phosphatis*. En effet, l'étude portait sur deux sources de biomasse déphosphatante : la première venant de Madison, Wisconsin (US) et la seconde de Brisbane, Australie (OZ). Les deux biomasses avaient été enrichies en laboratoire afin de maximiser la quantité d'OAP qu'elles contenaient. Des proportions de 80 % et 60% en *Candidatus A. phosphatis* ont été atteintes pour les biomasses US et OZ, respectivement. Des données de séquençage par « shotgun » ont permis de couvrir 98 et 78 Mbp pour respectivement la boue activée des US et de l'OZ. Il a été estimé que le génome de la biomasse provenant des US avait  $5,6 \pm 0,2$  Mbp et un contenu en GC de 63%. Les deux sources de boues activées avaient une similitude de plus de 95% au niveau de la biomasse. Seuls

les gènes codants pour les types d'exopolysaccharides (EPS) divergeaient entre les deux sources de boues activées. Garcia Martin et collaborateurs (2006) ont suggéré que le regroupement de gènes codant pour les EPS sont des structures modulaires interchangeables par recombinaison non homologue ce qui permet une adaptation rapide à l'alternance des phases aérobie et anaérobie. Ainsi, les OAP auraient la particularité de produire des EPS ayant des caractéristiques physiques et chimiques les mieux adaptées pour faire face aux conditions ambiantes. Une des découvertes majeures de cette étude a été la confirmation de la présence de gènes montrant que *Candidatus A. phosphatis* aurait la capacité de survivre dans des environnements limités en nutriments. En effet, des gènes codant pour la fixation de l'azote et du CO<sub>2</sub> ainsi que pour des transporteurs transmembranaires à haute affinité pour le phosphate suggèrent que *Candidatus A. phosphatis* est en mesure de survivre dans un milieu pauvre (Garcia Martin et al., 2006).

Une autre étude a mis en évidence une nouvelle espèce bactérienne capable de déphosphatation biologique : *Malikia granosa* (Spring et al., 2005). Cette bactérie Gram négatif appartient à la famille des *Comamonadaceae*. Elle demeure l'un des rares OAP ayant fait l'objet de cultures pures. Spring et al. (2005) ont aussi mis en évidence qu'une espèce, antérieurement associée au genre *Pseudomonas*, était en réalité liée au genre *Malikia*. Il s'agit de *Malikia spinosa* (ATCC 14606). Ces deux souches sont capables d'accumuler le phosphate sous la forme de granules de polyphosphates en conditions limitantes en carbone et de former des granules de polyhydroxyalkanoates lorsque l'azote est limitant dans le milieu (Spring et al., 2005).

## 2.6 Organismes accumulateurs de glycogène

Peu d'organismes ont les capacités métaboliques pour subir une alternance rapide et répétée de phases anaérobie et aérobie. Parmi ceux-ci, les organismes accumulateurs de

glycogène (OAG) ont des propriétés très semblables aux OAP. En effet, les OAG, comme les OAP, assimilent et transforment la matière organique, habituellement des acides gras volatils comme l'acétate, en PHA pendant la phase anaérobie. Cependant, au lieu d'assimiler des polyP en aérobie comme les OAP, les OAG utilisent le glycogène à la fois comme source d'énergie pour leur croissance et comme agent réducteur lors de l'assimilation des acides gras volatils pendant l'anaérobie (Filipe *et al.*, 2001). Donc, suite à la période en anaérobie, le niveau de glycogène intracellulaire est bas alors que celui des PHA est élevé. Pendant la période d'aérobie, les PHA sont oxydés pour produire de la nouvelle biomasse gorgée de glycogène.

Les OAG sont en général en compétition directe avec les OAP pour la source de carbone (acide gras volatil) ce qui a pour conséquence de réduire l'avantage écologique de ces derniers. Une diminution du retrait du phosphate a été remarquée dans des systèmes EBPR où les OAG avaient proliféré (revu par Mino *et al.* 1998). Une des façons de limiter la croissance des OAG dans un système effectuant la déphosphatation biologique est d'augmenter le pH (Filipe *et al.*, 2001). En effet, alors qu'un pH élevé ne semble pas affecter l'assimilation d'acétate en anaérobiose chez les OAP, ces conditions semblent affecter négativement les OAG (Filipe *et al.*, 2001). Une étude stoechiométrique de Smolders *et al.* (1994 b) a toutefois confirmé que l'assimilation de l'acétate demande moins d'énergie lorsque le pH externe est moins élevé. À moins qu'une étape de neutralisation ne soit ajoutée au système, le pH élevé en phase anaérobie entraînera également un pH élevé pendant l'aérobiose ce qui aura pour conséquence de nuire à la croissance des OAP.

Parmi les espèces soupçonnées d'être des OAG, certaines comme *Amaricoccus* spp. (Maszenan *et al.*, 1997) et *Micropruina glycogenica* (Shintani *et al.*, 2000) ont été isolées. Cependant, une grande majorité des OAG connus demeurent impossibles à cultiver. C'est le cas des Alphaprotéobactéries formant des tétrades apparentées aux *Sphingomonas* (Kong *et al.*,

2002a; Beer *et al.*, 2004) ainsi que des gros coccobacilles associés à un nouveau groupe de Gammaprotéobactéries (Nielsen *et al.*, 1999; Crocetti *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2002a). Parmi ces OAG, seul le groupe de Gammaprotéobactéries a fait l'objet d'une étude approfondie (Kong *et al.*, 2006). En effet, ces Gammaprotéobactéries ont toutes comme caractéristiques morphologiques d'être de larges coccobacilles de 2-4 µm de diamètre. De plus, Bond et collaborateurs (1999) et Crocetti et collaborateurs (2002) ont enrichi ces Gammaprotéobactéries dans des réacteurs en cuvée. Il s'agit également du groupe désigné sous le nom de *Candidatus Competibacter phosphatis*. Des études phylogénétiques ont également mis en évidence qu'il existait une grande diversité à l'intérieur même du groupe des Gammaprotéobactéries considérées comme des OAG (Kong *et al.*, 2002b). En effet, après l'étude de plusieurs séquences, Kong et ses collaborateurs (2002b) ont identifié pas moins de sept sous-groupes différents.

## **2.7 Influence de la source de carbone et du pH sur la déphosphatation biologique**

L'acide gras volatil utilisé comme source de carbone lors de la phase anaérobie influence l'efficacité de la déphosphatation biologique. En effet, (Randall et Liu, 2002) ont montré que l'acétate permettait une meilleure assimilation des phosphates en aérobie que le méthanol ou l'éthanol. De plus, Oehmen *et al.* (2005b) ont montré que l'alternance de l'acétate et du propionate favorisait la croissance des OAP aux dépens des OAG en raison de la meilleure capacité d'acclimatation des OAP à l'alternance des substrats. De plus, une étude sur la déphosphatation biologique en biofilm a montré que l'acide acétique présentait une meilleure performance de relargage du phosphate en anaérobie que la plupart des autres sources de carbone (Li *et al.*, 2003).

Puisqu'il agit sur l'assimilation de l'acétate et sur la régulation du pH intracellulaire, le

pH du milieu influence le phénomène de la déphosphatation biologique (Filipe *et al.*, 2001). Ainsi, les OAP sont favorisés par rapport aux OAG lorsque le pH est supérieur à 7,5. En effet, à un pH supérieur à 7,5, les OAP assimilent la source de carbone plus rapidement que les OAG (Oehmen *et al.*, 2005 b). L'effet inverse est observé lorsque le pH descend sous la barre des 7,25 (Filipe *et al.*, 2001).

## 2.8 Dénitrification

Lorsqu'il est sous forme biodisponible, l'azote constitue une substance chimique importante pour la biochimie des êtres vivants, tout particulièrement dans la synthèse des protéines. Cependant, lorsque retrouvé en grandes quantités dans l'environnement, l'azote bioaccumulable est considéré comme une forme de pollution. Les problèmes reliés à l'excès d'azote dans l'environnement sont majoritairement d'origine anthropique. Ceux-ci sont reliés à des surplus d'azote sous sa forme ammoniacale ( $\text{NH}_4$ ) ou sous forme de nitrite et nitrate ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). En effet, les rejets agricoles provenant des engrais organiques et inorganiques ainsi que ceux issus des aquacultures sont d'importantes sources de déversements d'azote biodisponible dans l'environnement. Des accroissements des niveaux naturels en nitrite et nitrate peuvent entraîner des explosions de production de biomasse algale lorsque ces rejets sont faits dans des effluents ou dans des marais stagnants situés à proximité.

Naturellement, des bactéries présentes dans l'environnement ont la capacité de fixer le diazote gazeux dans le sol en le transformant en ammonium alors que d'autres nitrifient l'ammonium en nitrate et nitrite. Ces derniers éléments peuvent être retransformés en azote gazeux par le procédé de dénitrification (Zumft, 1997). La dénitrification est un des phénomènes de décontamination les plus importants. En effet, ce sont les nitrates qui constituent l'un des

principaux polluants agricoles, car l'ammoniac provenant du lisier et du fumier, malgré sa toxicité pour la faune aquatique, est rapidement transformé en  $\text{NO}_3^-$  dans le sol grâce à la nitrification. Ce sont donc les nitrates que l'on retrouve souvent dans les cours d'eau à proximité des entreprises agricoles et qui ont le potentiel de causer une prolifération excessive des algues dans le milieu. En effet, parce qu'ils sont facilement bioaccumulables et qu'ils peuvent constituer un élément limitant pour la croissance algale, les nitrates peuvent être la cause de l'eutrophisation des plans d'eau dans certaines régions.

### 2.8.1.1 *Processus biochimiques*

La dénitrification par les bactéries se déroule comme suit : en absence d'oxygène (anoxie), les nitrates et nitrites deviennent les principaux accepteurs d'électrons de la chaîne de transport d'électrons lors de la respiration cellulaire métabolique. En effet, la plupart des bactéries dénitrifiantes sont aérobies facultatives en ce sens que l'oxygène sera utilisé préférentiellement ou parallèlement aux nitrites et nitrates dans un milieu qui n'est pas anoxique. On qualifie de dénitrification complète lorsque les microorganismes, habituellement des bactéries, impliqués dans la réaction réussissent à faire passer les nitrates et nitrites par différents intermédiaires tels que le monoxyde d'azote et le monoxyde de diazote avant de finalement les transformer en azote gazeux (équation 1). Le processus se déroule selon l'équation suivante :



Il n'y a pas de groupes phylogéniques précis auxquelles les espèces bactériennes capables de dénitrifier appartiennent. Parmi les genres bactériens ayant la capacité de dénitrifier, notons *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Bacillus*, et *Hyphomicrobium* qui contiennent plusieurs espèces ayant été reconnues comme telles (Knowles, 1982; Timmermans et Van Haute, 1983;

Horwitz *et al.*, 1997; Zumft, 1997). D'autre part, certaines bactéries ne peuvent dénitrifier que partiellement comme *Streptomyces violaceoruber* et *S. nitrosporeus* qui ont la capacité de changer les nitrates en oxyde d'azote ou oxyde de diazote (Albrecht *et al.*, 1997).

## **2.9 Déphosphatation biologique en conditions dénitrifiantes**

Lorsque les conditions sont réunies, la déphosphatation biologique peut se faire de concert avec la réaction de la dénitrification (Kuba *et al.*, 1997; Barak *et van Rijn*, 2000). En effet, en anoxie, c'est-à-dire en absence d'oxygène et en présence de nitrates, les OAP semblent utiliser les nitrates comme accepteurs d'électrons au niveau de la chaîne de transport d'électrons. Une controverse existe actuellement en ce qui a trait à l'existence d'une différence entre les organismes accumulateurs de phosphate utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons (OAPs) et ceux utilisant le nitrate (DNOAPs) (Barker *et Dold*, 1996; Meinhold *et al.*, 1999). Certains auteurs affirment que les mêmes organismes seraient en mesure d'effectuer la déphosphatation biologique en présence de nitrate seulement ou d'oxygène avec des rendements différents (Ahn *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2003). Par contre, d'autres suggèrent que même si la plupart des DNOAP étaient capables de respirer l'oxygène de même que le nitrate, les OAP seraient incapables de respirer le nitrate (Kuba *et al.*, 1994). Avant l'étude d'Ahn *et collaborateurs* (2002), il était convenu que les OAP capables de respirer l'oxygène et le nitrate comme accepteur d'électron étaient deux groupes distincts ne pouvant coexister. Or, une étude d'écologie microbienne a permis de confirmer la grande similitude existant entre des réacteurs fonctionnant avec ou sans oxygène et/ou nitrate comme accepteur d'électron (Ahn *et al.*, 2002). L'étude a utilisé trois types de réacteur : un utilisant un mélange d'air et de nitrate, un utilisant seulement de l'air et un utilisant seulement du nitrate. Une analyse de la diversité microbienne a montré une grande

similitude au niveau de la diversité des trois réacteurs, particulièrement entre le réacteur avec air et nitrate, et celui seulement avec air (Ahn *et al.*, 2002).

Il y aurait des avantages à favoriser la croissance des DNOAPs plutôt que celle des OAPs, particulièrement du point de vue industriel où être en mesure d'enlever à la fois le phosphate et le nitrate des eaux usées pourraient s'avérer économiquement intéressant. Aussi, il est à noter que la déphosphatation biologique en conditions dénitrifiantes est souhaitable au point de vue de l'enlèvement biologique puisqu'elle permet des réductions au niveau de la demande chimique en oxygène (COD) et de la demande énergétique en aération (Zeng *et al.*, 2003). De plus, les DNOAPs seraient moins efficaces pour générer de l'énergie, ce qui diminuerait les divisions cellulaires ayant ainsi pour effet de diminuer les effets négatifs liés à la génération de biomasse, notamment tels que le colmatage et les coûts liés au traitement des boues (Kuba *et al.*, 1994).

## **2.10 Biofilm**

Les bactéries retrouvées en milieu aqueux dans l'environnement se présentent sous deux organisations : libres ou en agrégats (flocs ou biofilms). Alors que dans la première situation les microorganismes sont libres dans un environnement liquide et qu'ils sont isolés ou en très petits groupes, dans la seconde situation les agglutinations de bactéries, également appelées biofilm, se présentent soit en amas ou attachées à un substrat (Costerton *et al.*, 1995).

### **2.10.1.1 Phases de développement d'un biofilm**

Plusieurs étapes sont nécessaires pour former un biofilm, ce qui en fait un processus relativement complexe requérant une organisation de la part des bactéries (Characklis et Coosey,

1983). Premièrement, un attachement des cellules à la surface à coloniser est remarqué (Stoodley *et al.*, 2002). Cette étape peut être induite par différents facteurs tels que la présence de nutriments sur les surfaces, les conditions environnementales (pH, présence d'oxygène, de métaux traces, température) et le genre de surface (pores, matériaux) (O'Toole *et al.*, 2000). Les conditions environnementales idéales pour l'établissement d'un biofilm peuvent varier d'une espèce à une autre.

Afin de rejoindre la surface à coloniser pour former un biofilm, les bactéries utilisent différents modes de déplacement tels que la diffusion, la convection, la motilité ou la sédimentation (Davey et O'Toole, 2000; O'Toole *et al.*, 2000). L'adhésion des bactéries Gram négatif à la surface se fait via les fibrilles et les lipopolysaccharides, des structures retrouvées à la surface des microorganismes. Des protéines de surface telles que les adhésines de même que les pilis peuvent jouer un rôle dans l'attachement des cellules sur une surface (Costerton *et al.*, 1987; van Loosdrecht *et al.*, 1990; Davey *et al.*, 2000; O'Toole *et al.*, 2000).

Afin d'adhérer entre elles pour ainsi former un biofilm, plusieurs espèces bactériennes produisent des substances extracellulaires polymériques (EPS) formant le constituant majeur de la structure tridimensionnelle des communautés microbiennes (Cooksey, 1992). Les EPS servent également à la reconnaissance intra- et/ou interspécifique et à la détection des éléments du milieu. Les premières juxtapositions de cellules lors du début de la formation d'un biofilm se font indistinctement qu'il s'agisse de cellules de la même espèce ou d'espèces différentes (Fig. 2.2) (Lawrence *et al.*, 1995; Wolfaardt *et al.*, 1998).

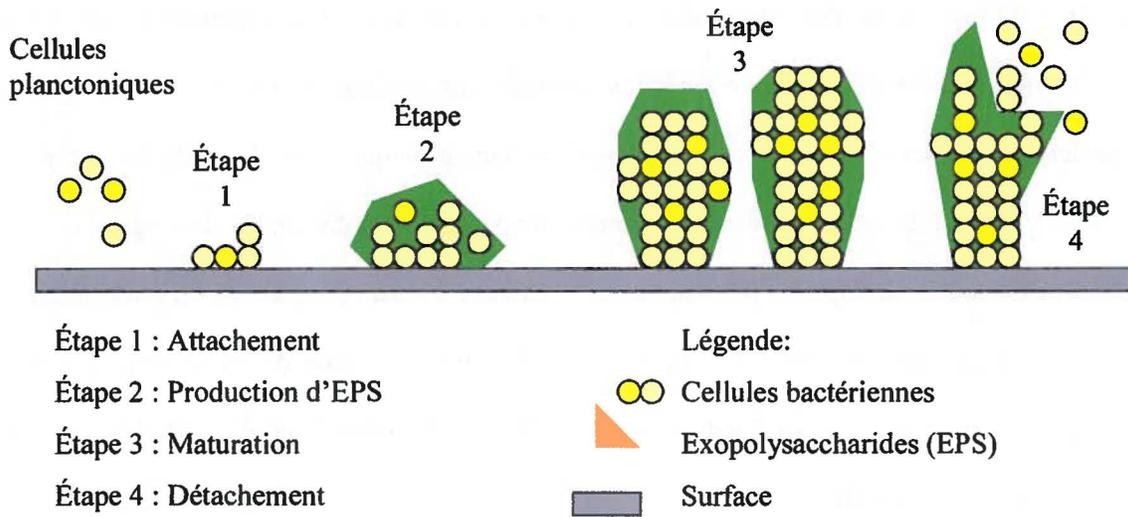


Figure 2.2 : Modèle de développement d'un biofilm.

La seconde étape consiste en l'attachement permanent des cellules à la surface et le début de la croissance, ce qui correspond à la formation d'un biofilm (Figure 2.2). L'apparition de minuscules colonies monospécifiques au départ, suivie d'un enchevêtrement de colonies d'origines différentes est alors observable. La division cellulaire est bien entendue à l'origine de ce phénomène. La fortification d'un biofilm se trouvant sur une large surface est possible grâce à la présence des exopolysaccharides permettant un lien physique entre les cellules d'espèces différentes ou similaires et rendant également permanent l'établissement des bactéries. Les phénotypes associés au déplacement vont ensuite changer à travers la population bactérienne ce qui va se traduire habituellement par la perte des flagelles et le gain de récepteurs de surface spécifiques à certaines bactéries (Costerton *et al.*, 1987; van Loosdrecht *et al.*, 1990; Davey *et al.*, 2000; O'Toole *et al.*, 2000).

En troisième lieu vient la maturation du biofilm qui est intimement liée au phénomène physiologique bactérien appelé *quorum sensing* (QS). Sommairement, le QS est la communication intra et inter espèces régulant la transcription des gènes entre les différents membres d'un milieu en fonction de la densité bactérienne. Cette cohésion régnant au sein d'un biofilm permet un certain « échange de bons procédés » entre ses membres, procurant ainsi un "comportement social" que les bactéries n'auraient pas individuellement. Ainsi, l'influence du QS dans la formation des EPS et des microcolonies ainsi que la création de structures tridimensionnelles est démontrée pour le développement de biofilm, alors qu'un impact sur l'hétérogénéité, l'architecture, la résistance au stress, le détachement cellulaire est soupçonné (Kjelleberg et Molin., 2002). On reconnaît un biofilm mature à sa structure tridimensionnelle où des canaux et des pores peuvent y être observés (Eberl, 1999). La structure protéique indique d'ailleurs la présence d'un réseau enzymatique complexe démontrant un niveau d'organisation plus important que pour les cellules bactériennes individuelles croissant indépendamment les

unes des autres (Costerton *et al.*, 1995). Cette coopération entre les cellules est un peu comparable avec celle observée chez une organisation des eucaryotes pluricellulaires.

Cependant, en présence d'un biofilm mature, il arrive fréquemment que les conditions locales ne correspondent plus à celles ayant poussé une espèce à coloniser, habituellement parce que les conditions du milieu ont changé (physicochimiques ou quantité de nutriments) ou parce que l'épaisseur du biofilm diminue l'apport en nutriments aux cellules à la base de celui-ci. Les bactéries peuvent alors soit entrer en dormance pour suivre et attendre un nouveau changement des conditions, soit se détacher du biofilm afin d'aller recoloniser un nouvel environnement ou elles sont dégradées et deviennent un substrat pour les organismes avoisinants. (Costerton *et al.*, 1995).

Finalement, la dernière phase du développement du biofilm est la colonisation de surfaces inexploitées, un rôle qui revient aux cellules se détachant du biofilm et qui devenant planctoniques (Costerton *et al.*, 1995). Il arrive aussi que, lors de la phase de sénescence d'un biofilm, les couches inférieures composées de cellules en dormance ou mortes puissent également renfermer des organismes vivants en anaérobie comme des bactéries sulfato-réductrices qui attendraient les conditions qui leur sont favorables pour proliférer.

#### **2.10.2.1 Rôle du biofilm**

À cause de la multitude de conditions changeantes, des milieux très diversifiés dans l'environnement et des partenariats interspécifiques nécessaires pour exploiter une ressource ou croître, la plupart des biofilms sont constitués de regroupements de plusieurs espèces bactériennes appelés consortiums (O'Toole *et al.*, 2000). Ces biofilms s'adaptent aux conditions du microenvironnement les entourant (Hamilton, 1987). La formation de biofilms procure

plusieurs avantages dont une meilleure résistance aux contraintes physiques telles que la dessiccation et le gel, de même qu'une résistance accrue aux biocides (voir O'Toole *et al.*, 2000), aux antibiotiques ainsi qu'à la prédation (Costerton *et al.*, 1995). Aussi, la proximité des organismes permet le recyclage : les déchets d'une espèce deviennent la source de nourriture d'une autre espèce.

La formation d'un biofilm est conditionnelle à la disponibilité des nutriments tels qu'une source de carbone et/ou un accepteur d'électrons. Donc, dans des conditions où les nutriments sont limitants, la formation du biofilm devrait être beaucoup plus rare et moins évolutivement intéressante (Novitsky et Morita, 1976). En effet, les bactéries ont la capacité de se mettre en état de dormance pendant des périodes de temps relativement longues lorsque les nutriments sont limitants. Cependant, dans les milieux limitants (oligotrophes) en nature, les biofilms se forment en surface, où les nutriments sont habituellement plus disponibles localement (Costerton *et al.* 1995). Aussi, il a été prouvé que la souche O517:H7 d'*E. coli* n'a la capacité de s'établir en tant que biofilm seulement lorsque les nutriments sont en faibles quantités (Dewanti et Wong, 1995).

### **2.10.3.1            *Système de déphosphatation biologique en biofilm***

Bien que la déphosphatation biologique en boue activée demeure le processus d'enlèvement de phosphate le plus fréquent, l'utilisation de réacteur à biofilm déphosphatant est également possible. Il existe plusieurs de types de réacteurs à biofilm. En déphosphatation biologique, les réacteurs séquentiels à lits fixes ou mobiles demeurent les plus étudiés. Il s'agit de réacteurs fonctionnant en séquence qui utilisent soit des supports mobiles pour la croissance du biofilm ou une surface fixe.

Quelques études utilisant des biofilms à lit fixe en déphosphatation biologique ont été

effectuées. Parmi celles-ci, Li et collaborateurs (2003) ont fabriqué un réacteur où huit médias de fibres étaient fixés à l'intérieur, sur lesquels croissait un biofilm effectuant de la déphosphatation biologique. Le réacteur était alimenté avec une eau usée synthétique avec une alternance des phases anaérobie et aérobie. Les cycles avaient une durée de 9 heures, soit 3 heures d'anaérobie et 6 heures d'aérobie. Après l'aérobie, une période de décantation de 20 minutes permettait à la biomasse excédentaire de se déposer au fond du réacteur pour être ensuite évacuée du système.

Même si la plupart des études faites sur les EBPR ont été faites avec des boues activées, il existe quelques exemples de système EBPR en biofilm à lit fixe, mais peu en biofilm à lit mobile. Helness et Odegaard (1999; 2001) ont été les premiers à utiliser un biofilm à lit mobile avec une eau usée synthétique ainsi qu'avec une eau usée municipale (Helness *et al.*, 2005). L'alternance de l'exposition aux conditions anaérobie et anoxie est le premier problème rencontré avec des biofilms à films fixes. En effet, ces systèmes demandent un changement des conditions du milieu très rapide afin d'éviter que les OAP ne remettent en suspension les polyP. Le second problème rencontré est celui de l'épaisseur du biofilm : il faut maintenir un biofilm mince afin de pouvoir changer en profondeur les conditions du milieu dans les meilleurs délais possible de même que pour faciliter l'enlèvement de la biomasse riche en phosphore. Afin de réduire l'épaississement du biofilm, l'apport de la source de carbone (acétate) doit être minimisé et un brassage doit être fait lors de la phase aérobie/anoxie, donc pendant la production de biomasse, facilitant ainsi le décollement du biofilm épais. Une étude utilisant un biofilm fixe pour l'enlèvement du phosphore en laboratoire a montré que le maintien d'un biofilm mince se faisait principalement par le détachement de morceaux de biomasse lesquels étaient ensuite récupérés dans l'effluent du réacteur (Li *et al.*, 2003).

## **2.11 Études phylogénétiques des populations bactériennes**

Les études phylogénétiques des populations bactériennes ont connu une recrudescence de popularité dans les dernières décennies suite à l'avènement des techniques d'analyse en biologie moléculaire. La classification des bactéries remonte à la fin du 19<sup>e</sup> siècle. En 1872, Cohn a défini six groupes de bactéries sur la base de leur morphologie. Ensuite, Gram a subdivisé ces groupes en 1884 grâce à une coloration basée sur la présence ou non d'une paroi riche en peptidoglycane observable en microscopie optique. Suite à la découverte de nombreuses bactéries, une nouvelle clé dichotomique basée sur le métabolisme, la physiologie ainsi que la pathogénèse a été élaborée.

Les percées en génétique à la fin des années 1980 ont ouvert la voie à une refonte complète de la classification des micro-organismes (DeLong *et al.*, 1989). Les bactéries sont désormais classées selon l'homologie des séquences du gène codant pour l'unité de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S. Ainsi, puisque les organismes homologues génétiquement au niveau de la séquence du 16S peuvent différer au niveau métabolique ou physiologique, il n'est pas rare de voir un remaniement complet de la classification d'il y a à peine 30 ans. Le principal avantage de l'utilisation d'outils génétiques en phylogénie est la relative stabilité à l'échelle du temps et la non-subjectivité de son interprétation.

### ***2.11.1 Analyses de la diversité microbienne***

Afin de vérifier la diversité d'un échantillon provenant d'un milieu complexe tel un biofilm d'un procédé de déphosphatation, plusieurs méthodes d'analyse outre les cultures existent.

### 2.11.1.1 *Génothèque 16S ribosomal et diversité microbienne*

Une des façons les plus répandues est d'utiliser l'amplification par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) du gène codant pour l'ARNr 16S et de faire une génothèque de clones issus de ces amplifications. La génothèque représente la diversité de la population bactérienne du milieu étudié. L'identification et le séquençage des clones distincts permettent d'établir quelles espèces bactériennes sont présentes dans l'échantillon (Lane *et al.*, 1985). Cette méthode permet aussi d'estimer la diversité d'une communauté microbienne à l'aide de méthodes statistiques telle la raréfaction (Hughes *et al.*, 2001).

Une autre façon d'estimer la diversité d'une population est d'obtenir un profil représentatif de la population. La technique de PCR couplée à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à gradient dénaturant d'urée et de formamide (DGGE) permet d'établir un tel profil. Ainsi, une partie du gène de l'ARNr 16S est amplifié du complexe bactérien. L'amplicon résultant composé des différentes séquences d'ARNr 16S est migré sur un DGGE qui permet de séparer les fragments d'ADN basé sur leur séquence et non leur longueur. Il en résulte donc un profil migratoire de bandes où en théorie chaque bande correspond à une espèce bactérienne (Muyzer *et al.*, 1993). Bien qu'il arrive parfois que des séquences différentes présentent des profils similaires, la répétition des DGGE dans le temps permet de diminuer cette possibilité. Aussi, en plus du profil de DGGE l'aspect général du biofilm ainsi que les performances des réacteurs étaient pris en considération afin de déterminer le meilleur moment pour effectuer l'échantillonnage pour constituer les banques de clones.

## 2.12 Hybridation *in situ* avec sondes fluorescentes

L'hybridation *in situ* est une technique permettant de visualiser les organismes dans le biofilm. Cette technique permet de quantifier de manière relative les groupes ou les espèces et d'observer l'arrangement spatio-temporel des organismes. L'hybridation *in situ* consiste en un appariement de sondes longues de 15 à 25 nucléotides avec l'ADN ou l'ARN de l'organisme visé. Les sondes sont habituellement attachées soit à des molécules fluorescentes nommées fluorochromes, soit à des molécules capables de s'unir à des molécules fluorescentes.

Les séquences provenant des unités ribosomales 16S et 23S pour les bactéries et 18S et 28S pour les eucaryotes sont les plus communément utilisées à la fois à cause du nombre important de ribosomes retrouvés dans les cellules (plusieurs milliers dans une cellule vivante) mais également à cause d'abondantes banques de données disponibles (plus de 300 000 séquences sur GenBank). De plus, les séquences ribosomales sont constituées de sections conservées pouvant faire office de séquence pour des sondes à large spectre et pour des sections hypervariables à partir desquelles des sondes spécifiques peuvent être conçues. La plupart des sondes présentement utilisées sont répertoriées dans une base de données nommée « Probase » (<http://www.microbial-ecology.net/probase/intro.asp>) (Loy *et al.*, 2003).

Puisque les sondes d'hybridation *in situ* ciblent habituellement les ribosomes, l'activité cellulaire de ces derniers, va influencer la quantité de sondes liées à l'organisme cible. Il est également possible que certaines séquences de l'ARNr soient hors d'atteinte de la sonde à cause de protéines liées aux ribosomes ou au repliement de l'ARNr. (Loy *et al.*, 2008)

L'hybridation *in situ* à fluorescence (FISH) a permis d'observer des milieux complexes et de confirmer leur structure, ce qu'il aurait été impossible de faire en utilisant des colorants moins spécifiques. Par exemple, il a été possible de visualiser des OAP d'une biomasse effectuant de la

déphosphatation biologique (Ahn *et al.*, 2007). Puisque la nature exacte des OAP demeure ambiguë, les principales cibles des sondes de FISH sont le *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, le genre *Rhodocyclus* sp. ainsi que le genre *Dechlorimonas* sp. qui sont tous dominants dans la plupart des études de déphosphatation biologique (Ahn *et al.*, 2002). Évidemment, les groupes compétiteurs des OAP, les OAG sont également souvent ciblés par les études de FISH. La principale espèce ciblée par ces études a été *Candidatus Competibacter phosphatis*, bien que d'autres groupes semblent démontrer des caractérisations des OAG (Seviour *et al.*, 2003).

## 2.13 Microscopie

La microscopie est un outil grandement utilisé en microbiologie, car elle permet d'observer les microorganismes. Plusieurs utilisations de la microscopie sont faites en microbiologie. La microscopie optique nous permet d'observer dans le spectre visible des spécimens colorés de manière à les contraster par rapport à l'arrière-plan. Aussi, il y a la microscopie en épifluorescence qui utilise la faculté qu'ont certaines molécules (fluorochromes) à émettre dans une longueur d'onde lorsqu'elles sont excitées dans une autre. Finalement, la microscopie confocale à balayage laser utilise un laser afin d'exciter le champ à une longueur d'onde précise et à une profondeur de champ précise.

### 2.13.1.1 Microscopie en épifluorescence

La microscopie en épifluorescence consiste à exciter une sonde fluorescente marquant un échantillon et à recueillir la fluorescence émise par celui-ci. L'utilisation de filtres pour

l'excitation et l'émission ciblant des intervalles de longueurs d'onde précises de la molécule fluorescente permet de visualiser cette dernière dans l'échantillon. À l'opposé de la microscopie optique conventionnelle, la source lumineuse n'est pas orientée vers l'objectif, mais passe par celui-ci afin d'exciter la molécule fluorescente contenue dans l'échantillon. Seule l'émission de l'excitation du fluorochrome est captée par l'objectif.

Un des principaux problèmes de la microscopie en épifluorescence est qu'il est impossible de visualiser un échantillon à une profondeur de champ précise. En effet, ce type de microscopie excite l'échantillon sur toute l'épaisseur de l'échantillon et récolte la fluorescence émise de la même façon. Il arrive alors qu'en présence d'un échantillon plus épais, la fluorescence émise forme une image hors foyer où il est quasi impossible de distinguer les structures ou les cellules.

#### **2.13.2.1      *Microscope confocal à balayage laser (CLSM)***

Deux propriétés distinguent la microscopie confocale à balayage laser de la microscopie en épifluorescence. Dans un premier temps, un laser remplace la lampe comme source d'excitation ce qui a pour conséquence de permettre une excitation à une longueur d'onde précise (Tableau 2.1). Ensuite, l'utilisation du laser permet également de focaliser la source de lumière et celle du détecteur à un seul point. Le principe derrière cette microscopie permet ainsi de considérer seulement ce qui est au foyer en éliminant tout ce qui est au-dessus ou au-dessous du point focal. Les échantillons ayant une certaine épaisseur comme les biofilms peuvent ainsi être analysés couche par couche jusqu'à une profondeur maximale variant entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  selon la transparence de l'échantillon et la pénétration des sondes. L'organisation des groupes de cellules ainsi que la structure tridimensionnelle d'un échantillon peuvent ainsi être scrutées sans en

compromettre l'intégrité. Les pixels fluorescents détectés par un microscope confocal à balayage laser sont ensuite amplifiés grâce à un tube photomultiplicateur.

Tableau 2.1 : Types de lasers utilisés en microscopie confocale.

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

#### 2.13.1.1 Fluorochromes

On désigne sous le terme de fluorochromes toutes les molécules d'origine biologique ou chimique ayant comme propriété d'absorber des photons à une longueur d'onde précise et de réémettre des photons à une longueur d'onde plus importante donc à un niveau énergétique moindre. Chaque fluorochrome a un spectre d'excitation et d'émission qui lui sont propres. Les fluorochromes sont utilisés à différents usages comme la coloration des acides nucléiques (acridine orange, Hoechst 33258, iodure de propidium et DAPI) ou liés à des sondes moléculaires spécifiques (FITC, Cy3 et Cy5). Parmi les désavantages liés à l'utilisation de certains fluorochromes, on retrouve la photostabilité et la grande envergure des pics d'excitation ou d'émission (Tableau 2.2). Par exemple, bien que largement utilisée, la fluorescéine (FITC) est relativement instable au niveau de l'intensité du signal fluorescent dans le temps. Aussi, l'iodure de propidium a un large pic d'émission ce qui peut entraîner l'excitation d'un autre fluorochrome qui, hypothétiquement, aurait une longueur d'onde d'excitation proche du pic d'émission. Outre ces inconvénients, il existe nombre de fluorochromes naturels nommés chromatophores. Parmi

les plus répandus dans le vivant, on retrouve la chlorophylle a et b chez les organismes photosynthétiques ainsi que le NADH chez la plupart des vivants. La fluorescence de ces molécules est principalement attribuable au noyau benzénique des chromatophores.

Tableau 2.2 : Fluorochromes utilisés comme colorations fluorescentes.

Fluorophores	Couleurs	Excitation [nm]	Émission [nm]
CY3	Vert, Vert-jaune	548	562
CY5	Rouge	650	670-700
DAPI	Ultraviolet	345	458
Bromure d'éthidium	Bleu-vert	510	595
FITC	Vert	494	518
Fluorescéine	Vert	495	517
GFP	Vert	395/489	509
Nile Red		485	525
TOTO-1	Vert	514	533
YOYO-1	Bleu-vert	491	509
YOYO-3	Rouge	612	631

Modifié de : <http://www.iss.com/resources/spectra.html>

## 2.14 Résultats des études précédents ce projet

Les expériences décrites dans le cadre de cette thèse sont complémentaires à celles réalisées par trois étudiants de l'École Polytechnique de Montréal dans le cadre de leur maîtrise en Sciences appliquées. En effet, Bertand Vallet, Juan Restrepo et Charles-Vincent Lussier ont exploité des unités expérimentales effectuant de la déphosphatation biologique dans des réacteurs à lits mobiles au Biodôme de Montréal et au Laboratoire régional des sciences aquatiques de l'Université Laval à Québec (LARSA).

L'étude effectuée par B. Vallet avait pour objectif d'établir un système original de déphosphatation biologique utilisant un bac de concentrat pour concentrer le phosphate plutôt que d'enlever de la biomasse riche en phosphate. Aussi, deux expériences quant au mode opératoire en eau douce artificielle et en eau salée ont été menées dans le cadre de ce mémoire : l'une avec l'effluent d'un mésoscome d'eau de mer et l'autre avec un effluent synthétique de pisciculture d'eau douce. L'étude effectuée par J. Restrepo visait à appliquer les principes testés par B. Vallet au traitement d'un affluent piscicole d'eau douce au LARSA. Quant à l'étude de C.-V. Lussier, elle avait pour objectif d'améliorer les performances du procédé en testant ses limites, c'est-à-dire en variant la source de carbone et la présence d'éléments essentiels, la concentration en oxygène et la durée des phases.

Quatre expériences de déphosphatation biologique ont donc été effectuées dans le cadre de cette étude et ainsi nommées Expériences I, II, III et IV. Dans un premier temps, l'utilisation d'une eau saumâtre du Saint-Laurent marin (SLM) du Biodôme de Montréal a été utilisée pour adapter la déphosphatation en eau salée (Expérience I) (Vallet *et al.*, 2009). Ensuite, une expérience utilisant, comme affluent à traiter, de l'eau douce enrichie artificielle en nitrates et en phosphates a été mise de l'avant (Expérience II) (Vallet, 2007). Dans une expérience

subséquent, les limites du système avec un affluent artificiel en eau douce ont été testées (Expérience III) (Lussier, 2008). Finalement, une expérience qui utilisait les rejets d'eau d'un élevage de poissons en guise d'affluent a été conduite (Expérience IV) (Restrepo *et al.*, 2009). La figure 2.3 représente un schéma du fonctionnement des réacteurs au cours des quatre Expériences.

### **2.15 Principe général du procédé**

La déphosphatation biologique est possible lorsqu'il y a alternance des phases anaérobie et aérobie (anoxie). Pour ce faire, l'équipe d'ingénieurs associée au projet a conceptualisé un procédé permettant à la biomasse de rester dans le réacteur sur des billes afin de faciliter la gestion du procédé. Aussi, un bac d'eau anaérobie a été ajouté aux réacteurs proprement dits, afin de disposer en tout temps d'une eau conditionnée pour l'étape anaérobie. Parce que cette étape est cruciale à l'enlèvement du phosphate par les bactéries, ce bac, appelé « bac de concentrat », s'avérait une bonne façon de procéder. L'alternance des étapes anaérobie (bac de concentrat) et aérobie (eau à traiter) était donc assurée.

### **2.16 Description des réacteurs**

Le système, aussi nommé « banc d'essai », était constitué de deux réacteurs identiques fonctionnant selon une séquence d'événements minutés complètement mélangés (sans zone morte) de 110 L reliés chacun à une cuve de concentrat de 220 L (IB 1801, Bonar plastics, Lindsay, ON, Canada) (Fig. 2.4) (Vallet *et al.*, 2009). L'utilisation d'un système à cette échelle permet d'observer les phénomènes de façon macroscopique sans avoir les contraintes de la pleine

échelle. Les cuves de 110 L représentaient l'essentiel des bioréacteurs. Chacun des bioréacteurs était rempli de 35 L de médias en plastique (Cascades-1A®, Koch-Glitsch, Wichita, KS, É.-U.) (Fig. 2.5). Ces médias avaient la particularité d'offrir une surface utilisable de quantité importante (surface de 19 cm<sup>2</sup> chacun) ainsi que des espaces suffisamment importants pour permettre une bonne surface de contact avec l'eau. L'utilisation de médias mobiles permettait la vidange complète de l'eau contenue dans les réacteurs, ce qui entraînait des modifications rapides dans le type d'eau mis en présence de la biomasse. L'alternance des conditions anaérobie et aérobie nécessaire à l'obtention d'un système effectuant de la déphosphatation biologique a été obtenue grâce à l'utilisation d'un affluent synthétique riche en phosphate et en accepteurs d'électrons (NO<sub>x</sub><sup>-</sup>, O<sub>2</sub>) pour la phase aérobie ainsi qu'à l'utilisation d'un bac de 220 L concentrant les phosphates contenant une eau anaérobie utilisée pour tous les cycles durant environ une semaine.

## **2.17 Expérience I: Traitement d'un effluent d'eau de mer**

Le Biodôme de Montréal opère en circuit fermé un bassin de 2 500 m<sup>3</sup> d'eau salée froide (10 °C). Ce mésocosme porte le nom de Saint-Laurent marin (SLM). Les niveaux de nitrate et de phosphate dans le SLM ont déjà atteint des valeurs de 180 mg NO<sub>3</sub>-N/L et de 28 mg PO<sub>4</sub>-P/L (Trepanier *et al.*, 2002).

### **2.17.1 Mode opérationnel**

Les réacteurs utilisés en eau salée étaient les mêmes que ceux utilisés en eau douce (Fig. 2.7). Les réacteurs en eau salée ont fonctionné pendant 174 jours au cours desquels deux modes de fonctionnement ont été expérimentés ou testés consécutivement (Tableau 2.3). Durant les 20 premiers jours d'opération, le banc d'essai a été opéré en conditions dénitrifiantes en mode cuvée

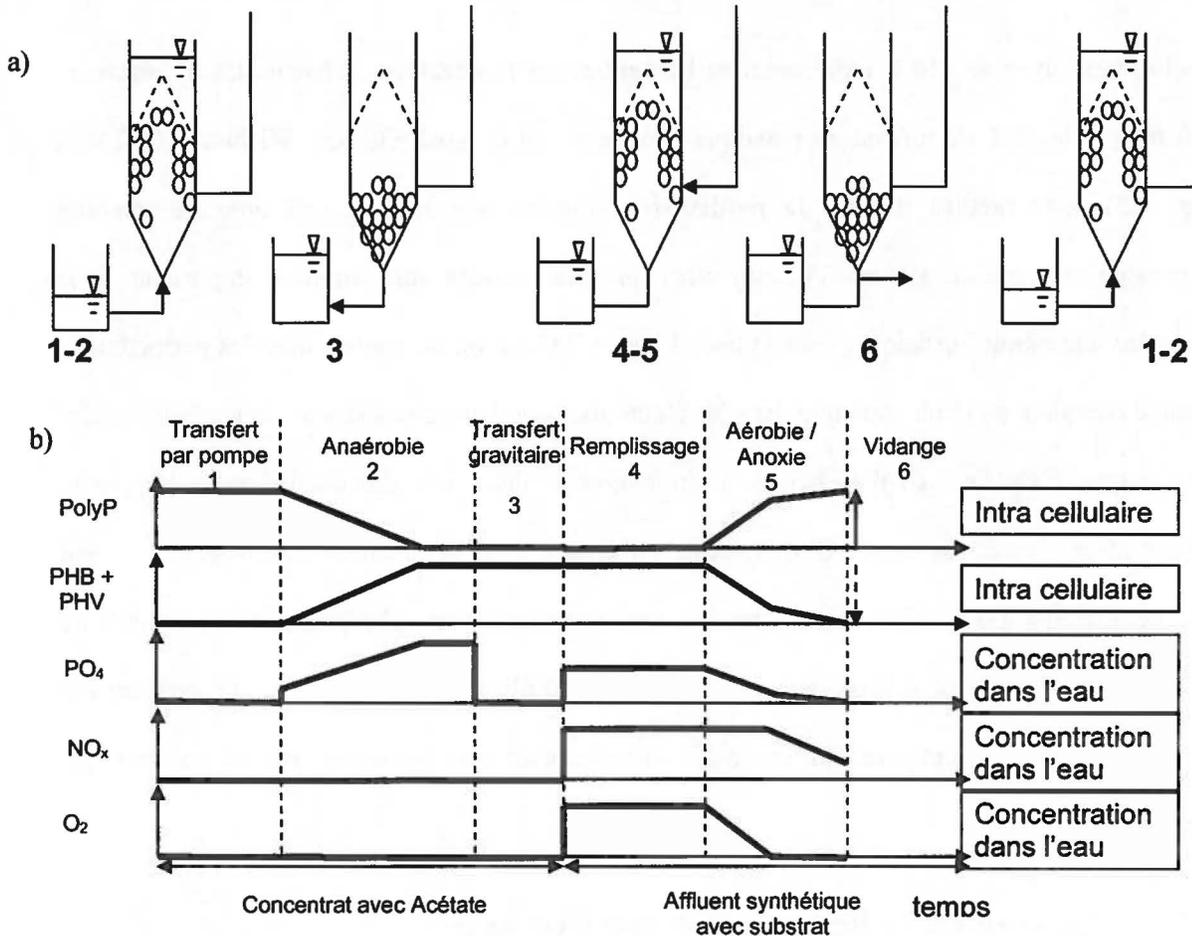


Figure 2.3 : Schéma du réacteur à chacune des étapes de la déphosphatation biologique dans le système avec bac de concentrat (a) et suivi théorique des principales molécules d'intérêt au cours de ces étapes (b) (Modifié de Vallet, 2007).

1. L'eau en anaérobie contenant l'acétate était transférée du bac de concentrat au réacteur.
2. PHASE ANAÉROBIE : L'assimilation de l'acétate sous forme de PHA avait alors lieu. Pour ce faire, les polyP et le glycogène intracellulaires fournissaient l'énergie nécessaire ce qui entraînait du relargage de phosphate dans l'eau du concentrat.
3. L'eau chargée de phosphate retournait par transfert gravitaire au bac de concentrat.
4. Le réacteur était ensuite rempli par l'affluent synthétique.
5. PHASE AÉROBIE/ANOXIE : Suite à l'arrivée de l'eau de l'affluent dans le réacteur, les PHA intracellulaires étaient utilisés comme source de carbone, tandis que l'O<sub>2</sub> et les NO<sub>x</sub> servaient d'accepteurs d'électron et que le phosphate a été accumulé sous forme de granule de Poly-P.

(Labbé *et al.*, 2003; Labelle *et al.*, 2005; Dupla *et al.*, 2006). La biomasse s'est développée en condition dénitrifiante avec l'affluent salé provenant du SLM avec un ajout d'acétate comme source de carbone. Durant les 154 jours suivants, la biomasse a subi une alternance des phases anaérobie et aérobie/anoxie afin de favoriser la croissance des OAP et l'activité déphosphatante. Ainsi, cette période a débuté lorsque la biomasse présente avait la capacité d'éliminer les 70 mg NO<sub>3</sub>-N/L contenus dans l'eau du SLM. Suite à une étude menée en dénitrification précédemment (Labbé *et al.*, 2003), l'importance de l'ajout d'éléments traces a été mise de l'avant. Conformément à cette étude, des éléments traces ont été ajoutés dans le bac de concentrat afin d'obtenir des concentrations finales de 150 mg Fe/L, 80 mg Mn/L et 10 mg Cu/L durant la phase aérobie (Vallet *et al.*, 2009). D'autre part, l'acétate a été également ajouté manuellement dans le bac de concentrat en anaérobie de manière à garder une concentration supérieure à 200 mg DCO/L. Chaque semaine, l'eau du bac de concentrat a été remplacée par un mélange d'eau salée nouvelle préparée en utilisant le produit Instant Ocean<sup>®</sup> (Aquarium Systems Inc., Mentor, OH, É.-U.). La salinité du SLM variait de 25 à 31 g/L alors que celle du bac de concentrat oscillait entre 27 et 32 g/L.

Tableau 2.3: Durée des phases d'opération du réacteur avec l'eau du SLM avec bac de concentrat

Partie	Phase					
	Remplissage affluent aérobie	Aérobie	Vidange à l'égout	Transfert du concentrat	Anaérobie	Transfert au concentrat
A	5 min	180 min	15 min	5 min	90 min	15 min
B	5 min	240 min	15 min	5 min	90 min	15 min
C	5 min	240 min	15 min	5 min	120 min	15 min
Test de relargage	5 min	240 min	15 min	5 min	300 et 360 min	15 min

## **2.18 Expériences II et III : Eau douce avec affluent synthétique (Biodôme de Montréal)**

### **2.18.1 *Affluent artificiel d'eau douce***

L'affluent synthétique d'eau douce a été préparé à partir de l'eau potable de la ville de Montréal dans un réservoir de 5 m<sup>3</sup> (Fig. 2.6). Cette eau a été enrichie de phosphate, de nitrate et de chlorure de potassium ainsi que de certains éléments traces (Tableau 2.4). L'Expérience II a eu lieu sur une période de 240 jours et la biomasse subissait le cycle décrit au tableau 2.5 (Vallet, 2007).

L'Expérience III a été effectuée sur une période de 257 jours durant lesquels trois conditions d'expérimentations ont été testées. La partie A a duré 105 jours et l'affluent utilisé provenait de la recette de proposée par Smolders et al. (1994a) à laquelle de l'acétate et du propionate étaient ajoutés (Tableau 2.6) (Lussier, 2009). Des extraits de levure et du cobalt ont été aussi ajoutés. La partie B a duré 116 jours et comportait des tests en flacons afin de vérifier l'effet du pH, de la DCO et de la concentration en phosphore sur le relargage des Pi. Pour la partie C, qui a duré 36 jours, la longueur de la période anaérobie a été augmentée, ce qui a permis d'améliorer les performances des réacteurs.

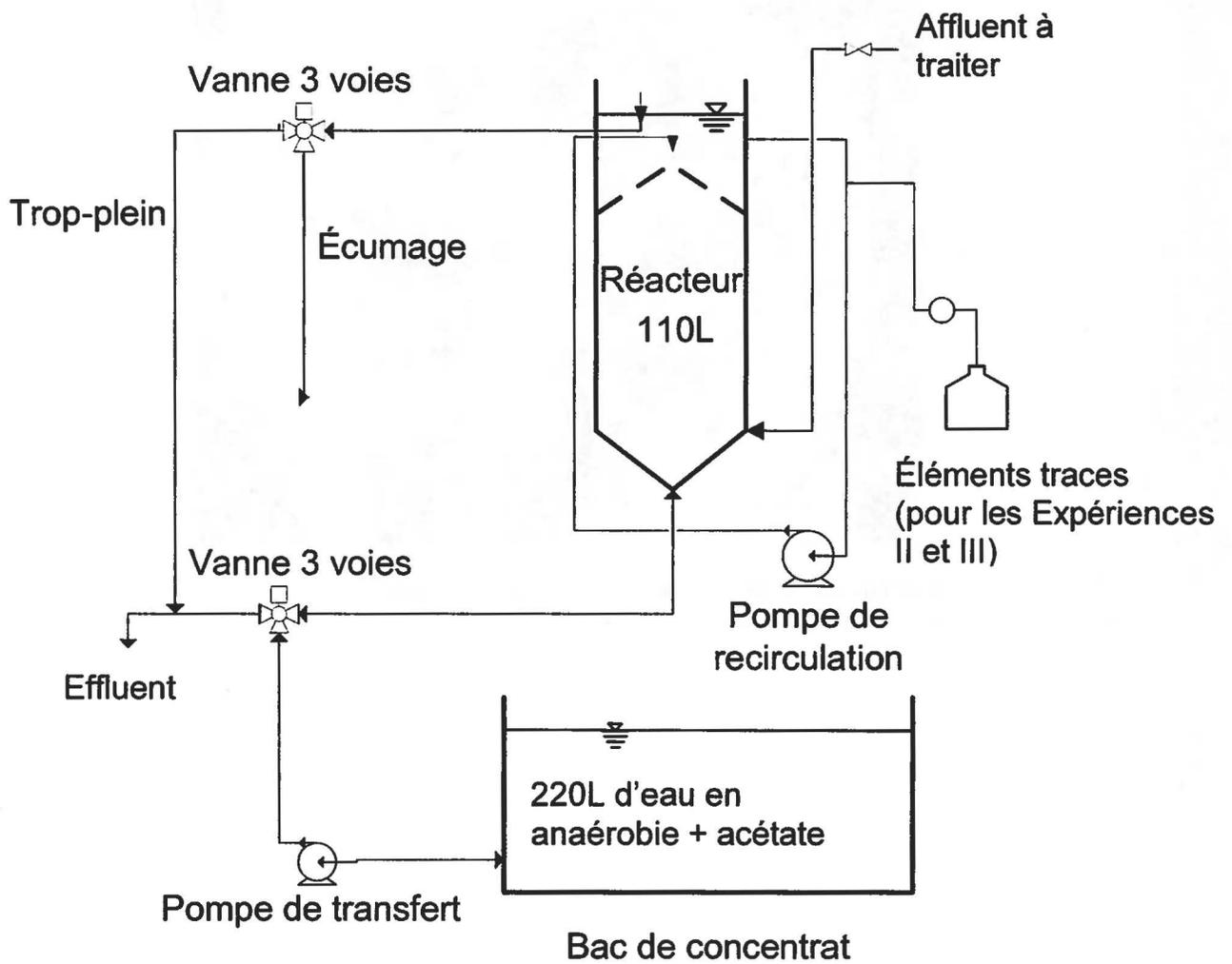


Figure 2.4 : Montage expérimental du banc d'essai au Biodôme de Montréal. Ce montage a été utilisé pour les Expériences I, II, III et IV. (Modifié d'une présentation de Vallet *et al.*, 2006).



Figure 2.5 : Medium de plastique Cascades-1A® (Koch-Glitsch, Wichita, Kansas) avec de la biomasse. Le diamètre du médium est de 5 cm.

Tableau 2.4 : Caractéristiques de l'affluent synthétique d'eau douce (n=14) utilisées par Vallet (2007).

Paramètres	Unités	Affluent synthétique d'eau douce
O <sub>2</sub>	mg/L	9,0 ± 0,3
Température		19,8 ± 1,6
pH		8,0 ± 0,3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg N/L	34,6 ± 3,8
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	mg P/L	14,8 ± 1,2
Ca <sup>2+</sup>	mg/L	33 *
Mg <sup>2+</sup>	mg/L	8,3 *
K <sup>+</sup>	mg/L	1,5 * + 8,5

\* : Valeurs moyennes des analyses de l'eau potable de la ville de Montréal

Tableau 2.5 : Durée (en minutes) des phases d'un cycle dans l'Expérience II.

Phases d'un cycle						Durée totale d'un cycle
Transfert par pompe	Anaérobie	Transfert gravitaire	Changement d'eau	Aérobie / Anoxie	Vidange	
5	90	15	5	150 à 180	15	280 à 310

Tiré du mémoire de B. Vallet (2007)

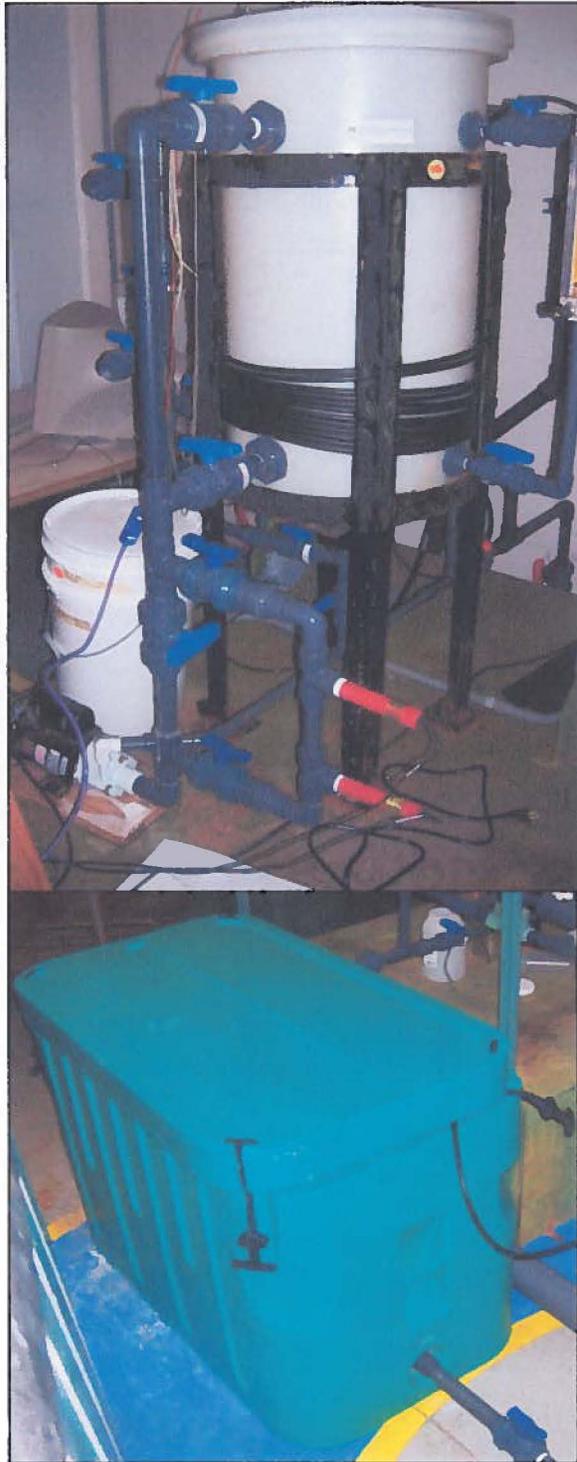


Figure 2.6 : Bioréacteur de 110 L (en haut) et bac de concentrat de 220L (en bas) retrouvés au Biodôme de Montréal.

### **2.18.2**            *Établissement de la biomasse déphosphatante dans les réacteurs*

La croissance de la biomasse en eau douce a été démarrée avec un inoculum provenant de liqueur mixte provenant de la station de traitement des eaux usées de la ville de Granby. Cette usine de traitement des eaux est réputée pour effectuer une déphosphatation partielle de ses eaux.

### **2.18.3**            *Cycle typique d'opération*

Un cycle commençait par le transfert par pompe de l'eau du concentrat dans le réacteur (Fig. 2.6). Ce transfert durait cinq minutes. L'eau du concentrat était faite à partir de l'eau potable à laquelle l'acétate était ajouté au début de la phase anaérobie grâce à une pompe péristaltique de manière à obtenir au moins 50 mg en demande chimique en oxygène par litre (DCO/L) pour l'eau dans le réacteur durant la phase anaérobie. Une solution d'éléments traces a été également ajoutée au concentrat. Elle consistait en une solution d'eau de la ville de Montréal (tableau 1) à laquelle ont été ajoutés 370 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 130 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  et 20 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (Labbé et al., 2003). L'acétate a été utilisé comme source de carbone. Un système de recirculation permettait à l'eau d'être brassée et ainsi de mettre en contact la biomasse avec la source de carbone et les éléments traces trouvés dans l'eau. Ensuite, une phase anaérobie de 90 minutes avait lieu permettant à la biomasse d'utiliser les réserves de polyphosphate et de glycogène intracellulaires pour fournir l'énergie nécessaire à l'absorption de la source de carbone disponible (acétate). Ensuite, l'eau en anaérobie était retournée au bac de concentrat par gravité (le réacteur était surélevé d'environ 30 cm par rapport au bac de concentrat), ce qui prenait 15 min. La biomasse sur les médias était ensuite mise en contact avec l'eau à traiter (aérobie) laquelle était pompée dans le réacteur en 5 min à partir d'un bassin de 5 m<sup>3</sup> contenant l'affluent synthétique.

Durant 150 à 180 minutes, le phosphate de l'affluent était assimilé par la biomasse sous forme de granules de polyphosphates à l'intérieur des cellules des OAP. Finalement, l'eau traitée était vidangée au drain par gravité en 15 min. Un cycle normal durait donc entre 280 et 310 minutes (Tableau 2.5).

## **2.19 Expérience IV: Eau douce d'un affluent piscicole (LARSA)**

Un des deux réacteurs du Biodôme de Montréal ayant acquis une activité déphosphatante satisfaisante a été transporté au LARSA, un laboratoire d'aquaculture situé sur le campus de l'Université Laval (Fig. 2.7). À l'instar des réacteurs au Biodôme de Montréal, le réacteur de 110 L était relié à un bac de concentrat de 220 L contenant l'eau en anaérobie (Fig. 2.7). Le réacteur contenait 800 médias (Cascades-1A®, Koch-Glitsch, Wichita, KS) qui avaient une surface de 19 cm<sup>2</sup> chacun pouvant accueillir la biomasse. L'eau provenait d'un effluent de bassins d'élevage de truites arc-en-ciel (30 kg/m<sup>3</sup>) (Restrepo *et al.*, 2009).

### **2.19.1 Cycle typique d'opération**

Le concentrat contenant un excès d'acétate a été transféré par pompe dans le réacteur (3 min) de façon à obtenir des concentrations de 70 mg DCO/L. La phase anaérobie a duré 90 min. Le concentrat a été retourné dans le bac de concentrat par gravité (9 min) jusqu'à la prochaine phase anaérobie induisant une augmentation de la concentration en phosphate à chacun des cycles. L'effluent piscicole à traiter a été pompé dans un bac de 300 L en plexiglas brassé mécaniquement. À partir de ce bac, le remplissage du réacteur a été effectué par un transfert gravitaire (18 min). La phase aérobie / anoxie a duré 3 à 4 heures selon les paramètres

opérationnels. L'oxygène et le nitrate contenus dans l'eau ont servi alors d'accepteurs d'électrons et entraînaient l'accumulation du phosphate de l'eau par les OAP sous forme de Poly-P en utilisant l'énergie de dégradation des granules de PHA intracellulaires. La vidange du réacteur s'effectuait finalement par gravité (8 min) (Tableau 2.6).

Tableau 2.6 : Durée (en minutes) des phases d'un cycle avec l'affluent provenant d'un bassin d'une pisciculture.

Phases d'un cycle						Durée totale d'un cycle
Transfert par pompe	Anaérobie	Transfert gravitaire	Changement d'eau	Aérobie / Anoxie	Vidange	
3	90	9	18	180 à 240	8	308 à 368

Informations tirées de J. Restrepo *et al.*, (2009)



Figure 2.7 : Photographie du réacteur au LARSA. Le réacteur (a) a été approvisionné par un affluent venant de la cuve c. Le concentrat était dans le bac de concentrat (b) (J. Restrepo *et al.*, 2009).

## 2.20 Description des Expériences

La première expérience utilisait un bassin opérant en circuit fermé de 3 250 m<sup>3</sup> d'eau salée froide (10 °C) situé au Biodôme de Montréal. Ce mésocosme porte le nom de Saint-Laurent marin (SLM). Ce bassin avait déjà été l'objet de plusieurs analyses de ses paramètres physico-chimiques qui ont permis d'établir que les niveaux de nitrate et de phosphate dans le SLM ont déjà atteint des valeurs de 180 mg NO<sub>3</sub>-N/L et de 28 mg PO<sub>4</sub>-P/L. Les réacteurs utilisés en eau salée ont été les mêmes que ceux utilisés en eau douce pour les Expériences II et III. Les réacteurs en eau salée ont fonctionné pendant 174 jours durant laquelle deux modes de fonctionnement ont été mis de l'avant. Durant les 20 premiers jours d'opération, le banc d'essai a été opéré en conditions dénitrifiantes en mode cuvée avec un biofilm sur lits mobiles (Labbe *et al.*, 2003b ; Labelle *et al.*, 2005 ; Dupla *et al.*, 2006). La biomasse s'est donc développée en conditions dénitrifiantes avec l'affluent salé provenant du SLM avec un ajout d'acétate comme source de carbone. Durant les 154 jours suivants, la biomasse a subi une alternance des phases anaérobie et aérobie/anoxie afin de favoriser la croissance des OAP et l'activité déphosphatante. Ainsi, cette période a débuté lorsque la biomasse présente avait la capacité d'éliminer les 70 mg NO<sub>3</sub>-N/L contenus dans l'eau du SLM.

La figure 2.8 montre ce qui est advenu de la biomasse au cours des essais en eau salée. Bien qu'une quantité croissante de la biomasse a été observée lors de la période de dénitrification (1-A) (1708 mg SVT/L pour R1 et 1240 mg SVT/L pour R2), une chute drastique a été observée des quantités de biomasses (174 SVT/L pour R1 et 289 SVT/L pour R2) lorsque l'alternance des conditions anaérobie et aérobie a été amenée (1-B). Les deux réacteurs ont été arrêtés à un certain moment afin de prévenir le détachement excessif de la biomasse des biobilles.

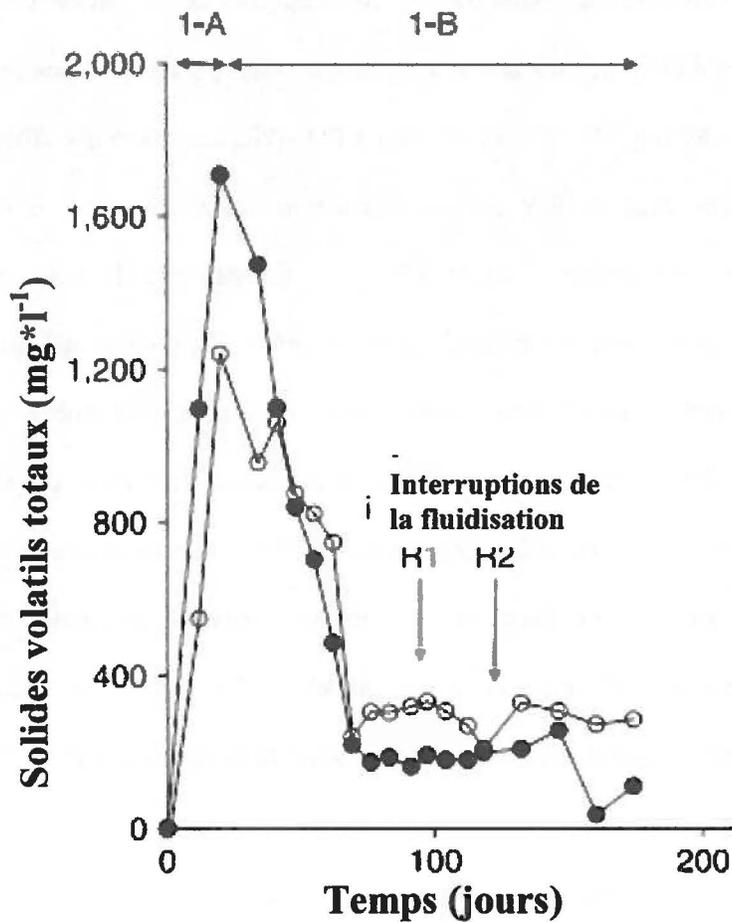


Figure 2.8 : Devenir des solides volatiles totaux fluctuant par rapport au temps suivant le démarrage avec un affluent salé. Les ronds pleins représentent le réacteur 1 (●) et les ronds vides représentent le réacteur 2 (○). La période 1-A a servi pour la croissance de la biomasse en conditions dénitrifiantes et la période 1-B a été opérée en conditions de déphosphatation. (Modifié de Vallet *et al.*, 2009)

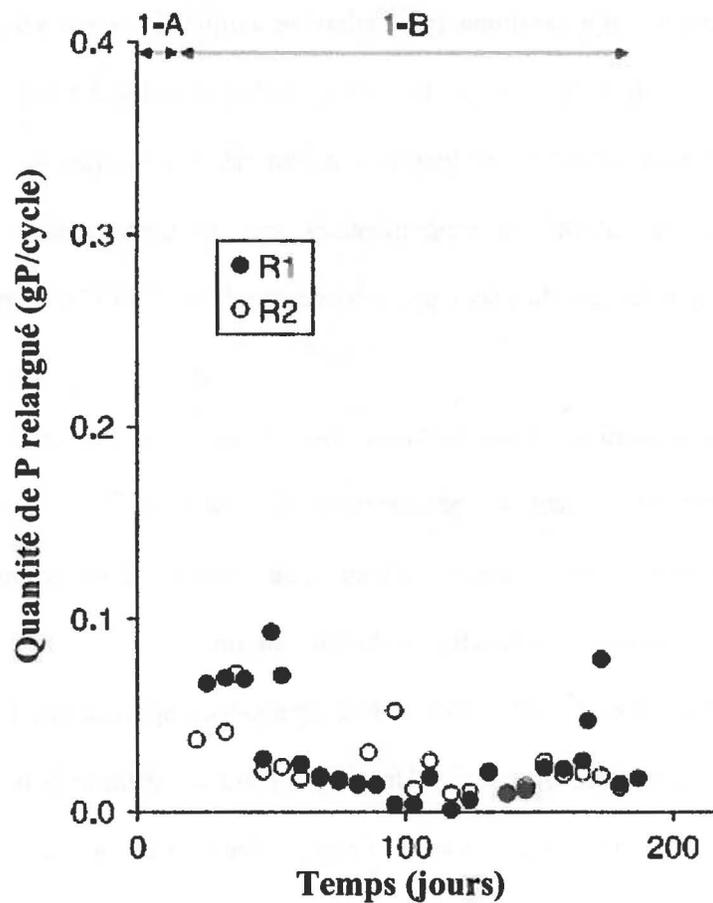


Figure 2.9 : Quantité de phosphore relargué par cycle selon le nombre de jours après le départ en eau salée. Les ronds pleins représentent le réacteur 1 (●) et les ronds vides représentent le réacteur 2 (○). Les réacteurs ont été opérés en conditions dénitrifiantes durant la période 1-A afin de favoriser la croissance de la biomasse et en conditions de déphosphatation durant la période 1-B. (Modifié de Vallet *et al.*, 2009)

L'Expérience I qui consistait à tenter l'enlèvement du phosphore de façon biologique à partir d'un affluent naturel salé n'a pas donné les résultats escomptés en ce qui a trait au maintien d'une biomasse capable de déphosphatation. En effet, Vallet et collaborateurs (2009) ont mis en évidence que même en partant d'une biomasse acclimatée à un milieu marin en dénitrification biologique, lorsque les conditions expérimentales ont été ajustées pour la déphosphatation, l'accumulation et le relargage du phosphate sont demeurés négligeables (0,09 mg P/cycle) (Fig. 2.9).

La première expérience visait à établir une activité biologique de déphosphatation dans deux réacteurs avec un affluent synthétique préparé à partir de l'eau potable de la ville de Montréal supplémentée de phosphate, de nitrate et de chlorure de potassium ainsi que certains éléments traces. Les réacteurs ont fonctionné durant 240 jours.

La figure 2.10 (Vallet, 2007), montre une croissance importante de la biomasse dans des conditions de déphosphatation biologique. Une augmentation constante de la matière totale (MT) et de la matière volatile totale (MVT) pour les deux réacteurs a été observée. La MT correspond à la matière ne s'étant pas évaporée à 110 °C, alors que la MVT est la MT moins le poids de la matière restant après un séjour dans le four à 450 °C. La MVT est considérée comme représentant la matière utile aux réactions biologiques. Le colmatage étant un problème fréquent dans les réacteurs, un nettoyage des conduites a été nécessaire autour du 120<sup>e</sup> jour. Suite à ce nettoyage des conduites, la croissance a poursuivi sa progression pour atteindre au jour 200, 3200 mg/L et 2000 mg/L de MT pour les réacteurs 1 et 2 respectivement. Les quantités de MVT étaient environ de 1250 mg/L et de près de 1000 mg/L pour respectivement les réacteurs 1 et 2. Puisque la matière organique correspond *grosso modo* à la quantité relative de MVT sur MT, on a remarqué que même si la croissance du réacteur 2 a été moins importante, la proportion de matière organique était relativement supérieure.

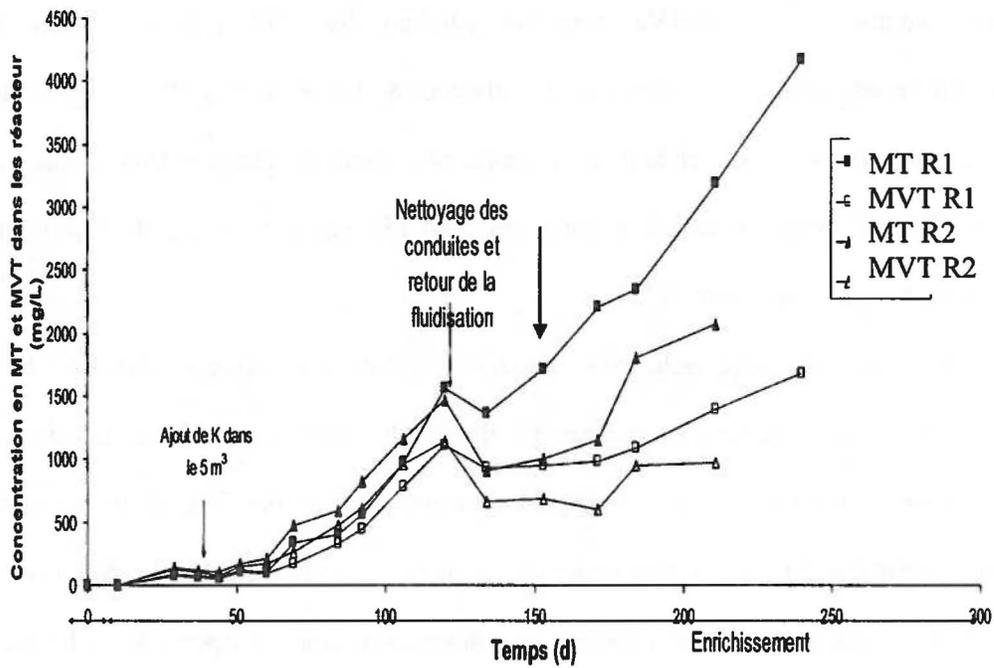


Figure 2.10 : Suivi de la quantité de matières totales (MT) et de matières volatiles totales (MVT) dans les réacteurs 1 et 2 du Biodôme de Montréal en conditions de déphosphatation avec un affluent artificiel. La flèche représente le moment où l'échantillon a été pris pour dériver la génothèque l'Expérience II. (Modifié Vallet, 2007)

La figure 2.11 montre que les quantités de phosphate relargué par cycle dans les bacs de concentrat ont augmenté de manière continue pendant les 150 premiers jours de l'expérimentation en eau douce pour atteindre des niveaux de 0,3 et 0,34 g P/ cycle pour les réacteurs 1 et 2 respectivement. Cependant, les niveaux de phosphate relargué dans les bacs de concentrat ont diminué progressivement à partir du jour 155 environ, et ce, de façon plus importante dans le réacteur 1 que dans le 2.

Suite aux essais de déphosphatation biologique avec un affluent piscicole (voir Expérience IV), C.V. Lussier a tenté de pousser les limites du système en utilisant un affluent synthétique (Lussier, 2009). En effet, cette expérience comportait 3 parties (Fig. 2.10). La partie A visait à tester l'acétate et du propionate comme source de carbone et a duré 105 jours. La partie B a vu l'ajout de biomasse active déphosphatante provenant du réacteur en opération au LARSA (voir Expérience IV). La phase B a duré 116 jours. Finalement, la partie C visait à tester l'augmentation de la durée de la phase anaérobie. Celle-ci a duré 36 jours.

La figure 2.12 montre les performances des réacteurs lors de l'optimisation des performances en eau douce avec affluent synthétique. Bien que l'accumulation du phosphore ait été déficiente au cours des premiers 105 jours de l'essai (Partie A), les performances se sont grandement améliorées par la suite. Ce moment correspond à l'ajout de la biomasse provenant du LARSA. En effet, l'Expérience IV s'étant terminée, la biomasse de cette expérience a été ramenée au Biodôme de Montréal afin d'aider à l'optimisation des performances en eau douce avec affluent synthétique. Fait à remarquer, jusqu'à 68% du phosphore contenu dans l'affluent a pu être récupéré dans le concentrat du réacteur 1 durant la partie B. Des variations ont cependant été remarquées lors des parties B et C. En effet, l'accumulation du phosphore a diminué de manière importante suite aux nettoyages de la conduite de recirculation, aux jours 150 et 215. Ce phénomène s'explique par le rétablissement d'un débit plus important suite au nettoyage de la

conduite ce qui a mené à l'enlèvement de la majeure partie de la biomasse et du précipité qui se trouvait sur les parois des conduits. On a noté également une perte de la biomasse sur les supports explicable par un changement des conditions hydrauliques ce qui a affecté la capacité déphosphatante du système. Aussi des tests de relargage ont eu des répercussions néfastes sur les performances du procédé pendant plusieurs jours. En effet, à la suite à ces tests effectués aux jours 164 et 210, une diminution de la quantité de phosphates accumulés a été observée en fonction de l'âge d'un concentrat (Fig. 2.12).

Un des deux réacteurs traitant un effluent synthétique en effectuant de la déphosphatation biologique au Biodôme de Montréal (Expérience II) et qui avait une activité déphosphatante satisfaisante a été transporté au LARSA, un laboratoire d'aquaculture situé sur le campus de l'Université Laval. À l'instar des réacteurs au Biodôme de Montréal, le réacteur de 110 L a été relié à un bassin de 220 L contenant le concentrat en anaérobie. Il a été utilisé pour traiter une eau usée provenant de bassins d'élevage de truite arc-en-ciel. Cinq essais ont été réalisés au cours de cette expérience.

La figure 2.13, modifiée de l'article de Restrepo et collaborateurs (2009), montre le pourcentage du phosphore enlevé ( $P_{\text{accumulé}}/P_{\text{départ}}$ ) et ratio entre la DCO (demande chimique en oxygène) par rapport au phosphate dans l'affluent ( $P-PO_4$ ) du réacteur au LARSA. Lors des essais I, II et III, l'acétate a été directement injecté dans le réacteur pour une concentration initiale de 70 mg DCO/litre dans le réacteur. Les essais I, II et III ont été effectués dans les mêmes conditions à l'exception du phosphate dans l'affluent dont les valeurs étaient respectivement 1,5, 5,5 et 10 mgP/L. Pour ce qui est des essais IV et V, l'acétate a été ajouté plutôt dans le bac de concentrat à 300 mg DCO/L. Le seul changement ayant été mis de l'avant

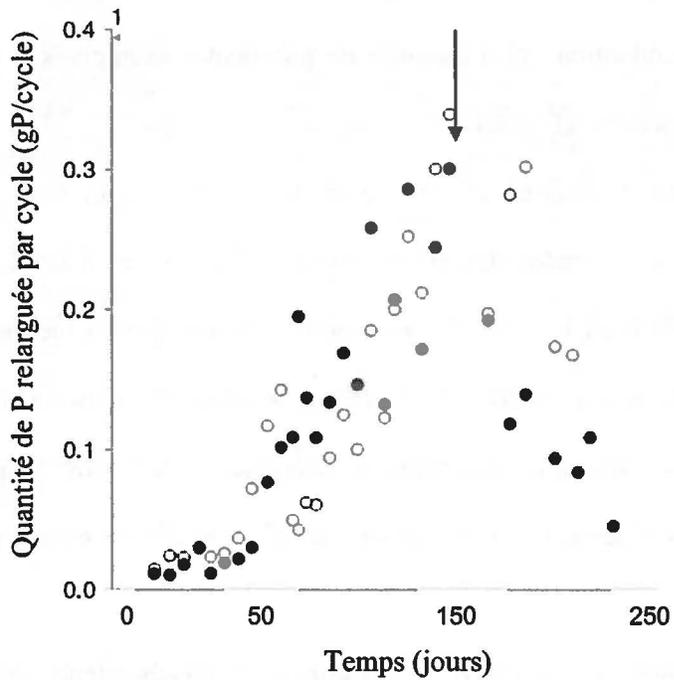


Figure 2.11 : Quantification du phosphore relargué dans les bacs de concentrat pour les réacteurs 1 (●) et 2 (○) lors de l'Expérience II. La flèche indique le moment de l'échantillonnage de la biomasse ayant servi pour l'extraction de l'ADN pour la construction d'une génothèque. (Modifié du mémoire de B. Vallet, 2007)

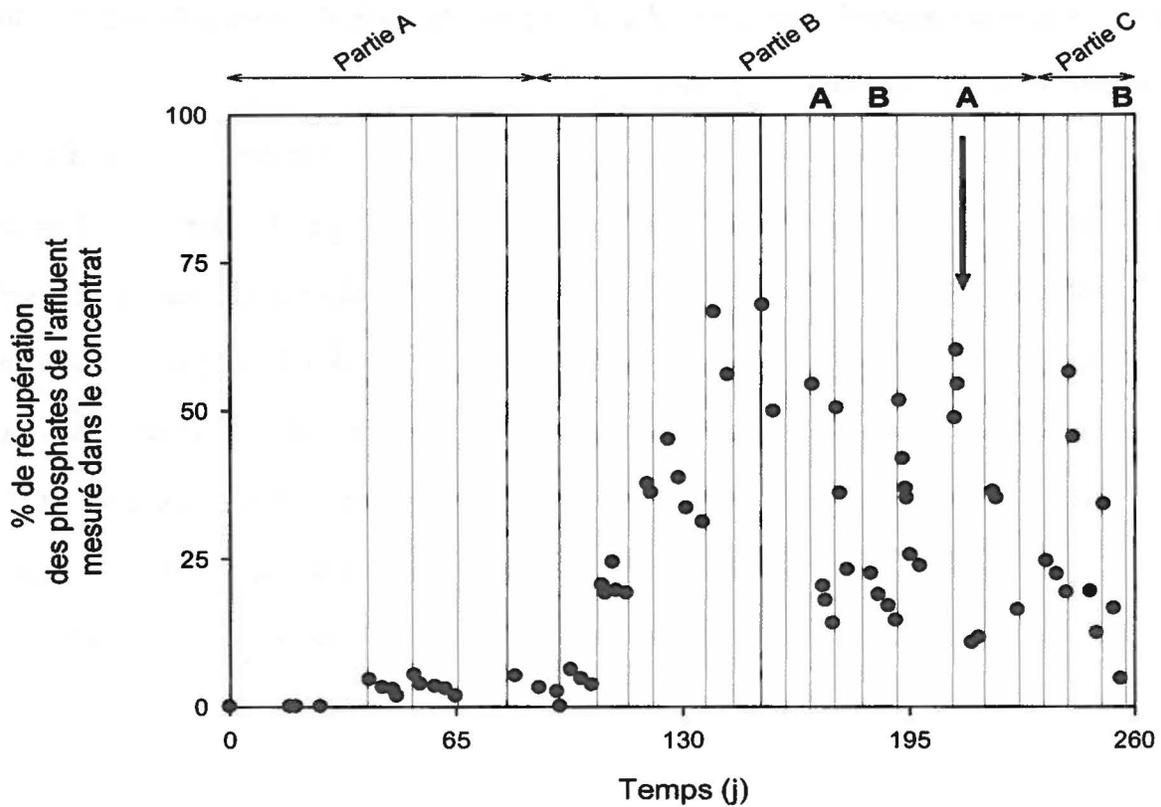


Figure 2.12: Récupération des  $\text{o-PO}_4$  de l'affluent dans le concentrat du réacteur 1 au cours de l'expérience III. Chaque trait vertical marque le début d'un concentrat. La lettre A désigne un nettoyage excessif des conduites et la lettre B un test de relargage. (Tiré de Lussier, 2008). La flèche indique le moment de l'échantillonnage de la biomasse ayant servi pour l'extraction de l'ADN pour la construction d'une génothèque.

pour l'essai V par rapport à l'essai IV a été de faire passer la phase aérobie/anoxie de 180 à 240 min pour 10 mgP/L (Restrepo *et al.*, 2009).

L'essai I a présenté des niveaux de P accumulé par rapport au P de départ entre 40 et 50 % et des ratios de DCO sur la quantité de phosphate ( $\text{PO}_4/\text{P}$ ) allant de 35 à 50 % (Fig. 2.13). Pour ce qui est de l'essai II, les niveaux de P accumulé par rapport au P de départ et les ratios de DCO sur le phosphate se situaient entre 18 et 35 % à l'exception de l'échantillon du 60<sup>e</sup> jour où la DCO a été à 70 %. Durant l'essai III, les niveaux de P accumulé par rapport au P de départ oscillaient entre 25 et 35 % environ, tandis que les ratios de DCO sur le phosphate ont varié entre 20 et 50 %. Pour ce qui est des essais IV et V, les niveaux de P accumulé par rapport au P de départ oscillaient de 50 et 75 % environ, tandis que les ratios de DCO sur le phosphate ont varié entre 10 et 20 % (Fig. 2.13).

## 2.21 Hypothèses de travail

Les poissons rejettent dans leur environnement des déchets azotés et phosphatés. Dans la nature, ces produits sont récupérés par l'écosystème et utilisés comme nutriment par les microorganismes. Cependant, dans les entreprises aquicoles, la microflore n'est pas favorisée pour augmenter le retrait de ces produits. L'azote sous forme d'ammoniaque, de nitrites et/ou de nitrate et le phosphate sont donc rejetés directement dans l'environnement. Le problème est d'autant plus important dans des bassins fonctionnant en circuit fermé comme le grand bassin d'eau salée du Biodôme de Montréal. En effet, l'eau de ce bassin a présenté des niveaux anormalement élevés de nitrates et de phosphates (Trepanier *et al.*, 2002). Un système de déphosphatation biologique en conditions dénitrifiantes était un moyen écologique et économique

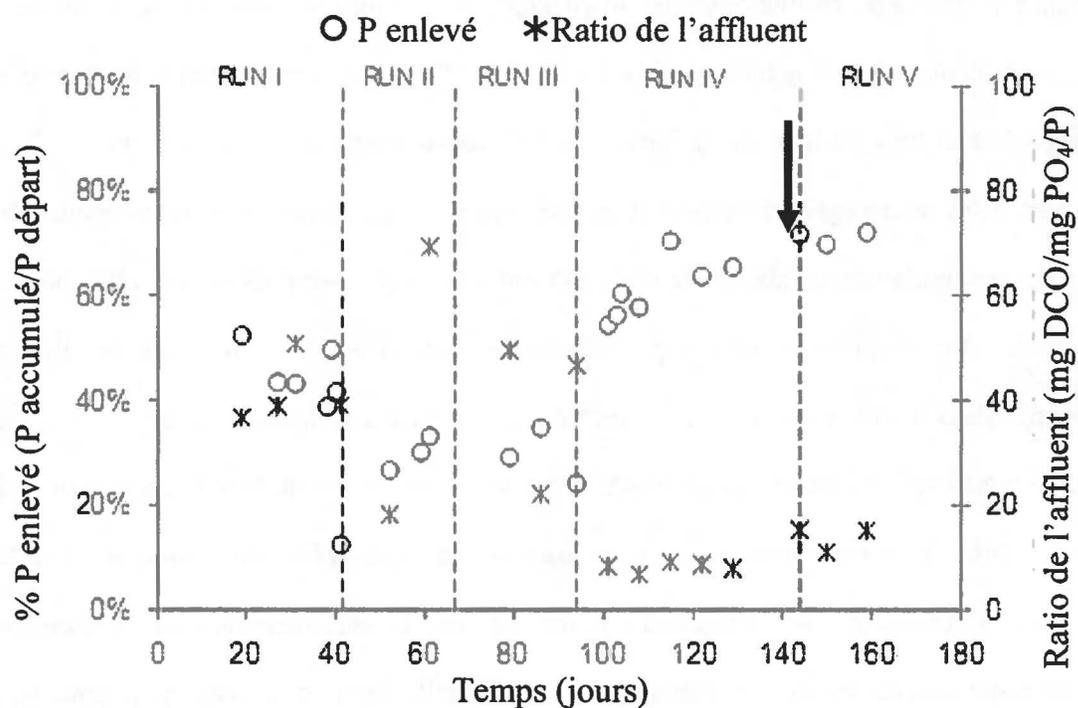


Figure 2.13 : Ratios d'enlèvement du phosphate et de la demande chimique en oxygène/PO<sub>4</sub>-P dans l'affluent pendant les 5 périodes de l'expérimentation au LARSA. La flèche indique le moment de l'échantillonnage de la biomasse ayant servi pour l'extraction de l'ADN pour la construction d'une génothèque. (Modifié de Restrepo *et al.*, 2009).

de venir à bout de ce problème. Grâce à un projet multidisciplinaire comptant sur des expertises en biologie moléculaire, en microbiologie et en ingénierie, la mise en fonction de bioréacteurs faisant de la déphosphatation biologique a été réalisée. Dans ces bioréacteurs à lit mobile, la croissance du biofilm a été favorisée grâce à l'ajout d'acétate comme source de carbone.

Parmi les microorganismes qui ont été cultivés dans les bioréacteurs, la croissance des organismes accumulateurs de phosphate (OAP) devait y être favorisée puisque les conditions ont été définies afin d'optimiser leur apparition et leur maintien. Un suivi des populations bactériennes dans les bioréacteurs a été effectué par diverses techniques de microscopie et de biologie moléculaire. Au cours de ce projet, l'interprétation des résultats obtenus a permis de mieux connaître la composition de la flore bactérienne déphosphatante retrouvée dans les bioréacteurs. L'originalité scientifique du projet est que la caractérisation de la biomasse déphosphatante cultivée en biofilm d'un système plein échelle fonctionnant en circuit fermé pour des milieux d'eaux douce et salée n'avait encore jamais été faite. Une comparaison des espèces obtenues dans les deux conditions a été également effectuée.

Une des hypothèses de cette étude était que le système novateur avec substitution de l'eau et la concentration du phosphate dans un bac de concentrat permettrait de favoriser la croissance d'OAP et ce, même sous forme de biofilms. Une autre hypothèse était de caractériser la biomasse par des techniques de microscopie et de biologie moléculaire afin de nous permettre d'expliquer les performances obtenues par les équipes d'étudiants en génie assignées au projet. Finalement, nous croyions également qu'il n'y aurait de différences entre la composition de la biomasse provenant d'un biofilm d'un système pleine échelle fonctionnant en circuit fermé pour des milieux d'eaux douces par rapport à un système similaire en eaux salées.

## 2.22 Buts de l'étude

L'objectif général de l'étude était de caractériser la flore bactérienne de bioréacteurs effectuant de la déphosphatation biologique dans des conditions d'exploitation diverses.

Les objectifs spécifiques de cette étude sont :

- 1- la caractérisation de la flore bactérienne présente dans les unités pilotes déphosphatantes,
- 2- le suivi de cette flore jusqu'à l'atteinte d'une déphosphatation appréciable et d'une stabilité spécifique,
- 3- le suivi des principaux facteurs biochimiques de la déphosphatation biologique,
- 4- la visualisation des espèces principales par hybridation *in situ* avec sondes fluorescentes (FISH),
- 5- ainsi que la caractérisation des biofilms à l'aide d'analyses phylogénétiques des populations ayant atteint les meilleurs niveaux de déphosphatation.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is essential for ensuring transparency and accountability in the organization's operations.

2. The second part of the document outlines the various methods and tools used to collect and analyze data. It highlights the need for consistent data collection procedures and the use of advanced analytical techniques to derive meaningful insights from the data.

3. The third part of the document focuses on the role of technology in data management and analysis. It discusses how modern software solutions can streamline data collection, storage, and processing, thereby improving efficiency and accuracy.

4. The fourth part of the document addresses the challenges associated with data management, such as data quality, security, and privacy. It provides strategies to mitigate these risks and ensure that the data remains reliable and secure throughout its lifecycle.

5. The fifth part of the document concludes by summarizing the key findings and recommendations. It stresses the importance of a data-driven approach in decision-making and the need for continuous monitoring and improvement of the data management process.

## Chapitre III

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1 Échantillonnage de la biomasse

La biomasse a été échantillonnée au début de l'expérimentation puis à toutes les deux semaines quand l'enlèvement du phosphate a été significatif. A chaque occasion, deux ou trois billes étaient prélevées, mises dans un contenant de 120 ml et recouvertes avec de l'eau provenant de l'affluent traité dans le réacteur au moment de l'échantillonnage. Du glycérol était ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 15 % (v/v) et les échantillons étaient ensuite congelés à -80 °C.

Afin de récupérer des échantillons de biofilm et de biomasse, des lames de microscopie ont également été déposées sur des supports à lames suspendus dans les réacteurs. Ces lames ont été utilisées dans les bioréacteurs afin d'y faire croître un biofilm d'épaisseur variable en fonction du temps, et ce, pour les Expériences I et IV. Les lames étaient également échantillonnées toutes les deux semaines.

L'excédent de la biomasse sur les lames et leurs supports a été gratté et conservé à -80°C aux fins d'analyses ultérieures. Des champs (deux par lame) d'environ un centimètre carré ont été conservés intacts pour les analyses microscopiques. Ces carrés de biofilm ont été dans un premier temps fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% PBS pendant une à trois heures (selon l'épaisseur du biofilm). Ensuite, plusieurs lavages (au moins trois) à l'eau nanopure ou au PBS ont permis d'éliminer une grande partie du paraformaldéhyde excédentaire. Le lavage à l'eau a aussi permis de réduire de beaucoup la quantité de sel lorsque les échantillons provenaient des bassins d'eau salée. Suite aux lavages, les lames ont été conservées à -20°C dans un mélange de 1:1 d'éthanol et de PBS.

### 3.1.1 *Traitement des échantillons*

Les échantillons ont été d'abord rincés à l'aide de PBS 1X trois fois afin d'éliminer le glycérol. Ensuite, les billes ont été grattées dans un Pétri de verre contenant 50 ml d'eau milliQ. Cette suspension a été subséquemment centrifugée à 2500 rpm. Le culot a été dispersé/lavé deux fois dans les mêmes conditions afin d'éliminer le plus possible les débris cellulaires et de dissoudre les sels associés aux biofilms. Une fois les rinçages terminés, la biomasse a été mise à -80 °C pendant 24h pour ensuite être lyophilisée pendant 48h, puis entreposée à température de la pièce jusqu'au moment des analyses.

### 3.2 **Dosage du phosphore**

Les mesures du phosphore total ont été effectuées selon les procédures décrites dans le *Standards methods* (APHA *et al.*, 1998). Les protocoles 4500-P B et 4500-P E ont été utilisés pour connaître la quantité de phosphore dans un échantillon. Il s'agissait ici de transformer tout le phosphore organique et les précipités en orthophosphate réactif avant les analyses.

Les échantillons ont été préparés selon la méthode 4500-P B du *Standard methods for examination of water and wastewater* (Clesceri *et al.*, 1996). En résumé, un échantillon de la biomasse au poids connu après lyophilisation (environ 50 mg) a été mis dans un volume de 25 ml d'eau milli-Q. À cette eau, 500 µl d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 30% et 0,2 g d'ammonium persulfate ([NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (0,2 g) ont été ajoutés pour acidifier l'échantillon. Le tout a ensuite été placé dans un autoclave pendant 30 minutes à 121 °C pour effectuer la digestion au persulfate. Après refroidissement des échantillons, le pH a été ajusté entre 7 et 9 à l'aide de NaOH 1N et le volume final a été ajusté à 50 ml avec de l'eau milli-Q. Une décoloration des échantillons s'est avérée nécessaire dans certains cas avant le dosage colorimétrique. Pour ce faire, 200 mg de

charbon activé lavé a été mis en contact avec ces échantillons pendant 5 minutes à une agitation de 200 rpm. Les échantillons colorés ont été filtrés à travers un filtre 2,5 µm de porosité (Whatman, Clifton, NJ, É.U.). La manœuvre a été répétée jusqu'à l'obtention d'échantillons incolores. Un témoin à décoloration a été effectué parallèlement avec de l'eau milli-Q. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 2500 rpm pendant 5 minutes puis filtrés sur une membrane 0,45µm.

Par la suite, 3,5 ml de chacun des échantillons ou des standards ont été mis en présence de 1 ml du réactif vanadate-molybdate selon la méthode 4500-P E du *Standard methods for examination of water and wastewater* (Clesceri *et al.*, 1996). Le réactif vanadate-molybdate était constitué de deux solutions : la solution A consistait en 150 ml d'eau milli-Q contenant 12,5 ml d'ammonium molybdate. La solution B était composée de 0,625 g d'ammonium metavanadate ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) dissous dans 150 ml d'eau milli-Q chauffé, refroidi, additionné d'HCl concentré et encore refroidi. Les deux solutions ont été mises ensemble et le volume total ajusté à 500 ml. Dix minutes après avoir mis les différents échantillons et les standards en présence du réactif vanadate-molybdate, l'absorbance a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre SP6-550 UV/VIS (Pye Unicam Ltée, Cambridge, Angleterre) pour les longueurs d'ondes de 400, 420 et/ou 470 nm. La droite d'étalonnage a été effectuée avec des solutions de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  allant de 1 à 5 mg  $\text{P-PO}_4^{2-}$ /L, 2 à 10 mg  $\text{P-PO}_4^{2-}$ /L et de 4 à 20 mg  $\text{P-PO}_4^{2-}$ /L pour les absorbances de 400, 420 et 470 nm, respectivement. La courbe d'étalonnage a été effectuée à chaque essai. Les échantillons et les standards ont tous été mesurés en duplicata.

Bien que la plupart des échantillons aient été analysés selon la méthode précédente, une seconde technique a été utilisée pour valider certains résultats et accélérer les analyses. Cette seconde technique, qui a été utilisée à l'École Polytechnique de Montréal, présente de nombreux avantages comme une précision et une reproductivité accrue des mesures. Les échantillons ont

été d'abord lyophilisés pour ensuite être envoyés à l'École Polytechnique de Montréal. Des échantillons de 0,1 à 0,5 g de biomasse lyophilisée provenant des réacteurs des expériences I, II et III ont été analysés pour les phosphates totaux. L'analyse des ions  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_x$  a été effectuée en utilisant un analyseur d'ions automatique (Model Quickchem 8500, Lachat Instruments Inc., Co, USA).

### **3.3 Dosage des PHB (modifié de Oehmen *et al.*, 2005a)**

Une quantité connue de biomasse lyophilisée (15 à 20 mg) a été placée dans des éprouvettes vissées de 10 ml en verre. À cette biomasse, 2 ml d'une solution méthanol-  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et d'acide benzoïque (100 mg/L de benzoate de sodium dans 100 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3% (v/v) dans du méthanol pur) et 2 ml de chloroforme ont été ajoutés. Les échantillons ont été incubés pendant 6 h à 100 °C sur une plaque chauffante Hach (Loveland, Co, É.-U.). Un millilitre d'eau milli-Q a été ajouté une fois le mélange refroidi pour éliminer les particules solubles de la phase chloroforme. Les échantillons ont été agités vigoureusement pendant 2 minutes avant de les laisser reposer pendant 1h, permettant ainsi de laisser le temps à la phase chloroforme de se séparer à nouveau et de migrer vers le bas du tube. La phase chloroforme a été récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et a été déposée dans une fiole à scintillation. Les lectures des échantillons ont été comparées à une droite standard faite avec des solutions standards de polyhydroxybutirate, de polyhydroxyvalérate et d'acide caproïque toutes à 500 ppm dans du méthanol. Des échelles de 0 à 100 ppm ont été établies à chacun des dosages pour chacun des standards. Les standards ainsi que les échantillons ont subi ensuite une silylation. Cent  $\mu\text{l}$  des standards ont été mis dans des fioles à scintillation à fond conique. Ensuite, le liquide a été évaporé sous jet d'azote. Ensuite, 500  $\mu\text{l}$  de solution de silylation a été ajouté composée de 250  $\mu\text{l}$  de pyridine (50 %), 225  $\mu\text{l}$  de BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide) (45 %) et 25

$\mu\text{l}$  de TMCS (trimethylchlorosilane) (5 %). Les fioles ou flacons ont ensuite été scellés et incubés à 70 °C pendant 3 heures. Deux  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon ont été injectés et analysés à l'aide d'un chromatographe à phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse couplé (GC-MS) dont la colonne mesurait 30 m, avait un diamètre de 25 mm et une phase stationnaire de 0,25  $\mu\text{m}$ . Les temps de rétention ont été de 3,5 min pour le PHB, de 5 min pour le PHV et de 6,5 pour l'acide benzoïque.

### **3.4 Dosage total des hydrates de carbone (glycogène)**

Le principe de ce dosage est le suivant : les hydrates de carbone de types hexose et pentose, lorsqu'ils sont chauffés avec de l'acide sulfurique concentré, forment des furfurals qui réagissent avec les amines aromatiques pour former un produit coloré dont la concentration peut être déterminée au spectrophotomètre (Jenkins *et al.*, 2004). Trois solutions ont d'abord été préparées. La première était une solution de KOH 30 % (p/v). Il y avait également une solution standard de 100 ml d'eau distillée contenant 100 mg de glucose et 150 mg d'acide benzoïque. Finalement, le réactif d'anthrone consistait en 200 mg d'anthrone, dans 5 ml d'éthanol 95 % dans une fiole jaugée de 100 ml où le volume a été complété avec une solution d'acide sulfurique 75 % (v/v avec de l'eau). À la biomasse lyophilisée, 1 ml de KOH 30 % a été ajouté à des éprouvettes en verre (avec bouchons vissés). Ces éprouvettes ont été déposées dans un bain-marie à 100°C pour 3 heures. Durant l'incubation, les tubes ont été brassés toutes les 15 à 20 minutes afin d'optimiser la digestion. Ensuite, les tubes de biomasse digérée ont été laissés à l'air jusqu'à la diminution de la température. Lorsque la température des tubes avoisinait les 25-30 °C, 3 ml d'eau et 8 ml d'éthanol 95 % à -20 °C ont été ajoutés. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes. Les culots ont été séchés à 60 °C. Les culots séchés ont été

resuspendus dans 1 ml d'eau milli-Q. Un dixième de ce volume a été alors prélevé et complété à 1 ml avec de l'eau milli-Q, le tout placé dans des éprouvettes vissables de 10 ml. Cinq ml de réactif d'anthrone ont été ajoutés à tous les tubes et les tubes ont été agités vigoureusement avant d'être déposés sur de la glace. Ensuite, les tubes ont été ébouillantés pendant exactement 10 minutes pour ensuite être mis dans un bain d'eau glacée. L'absorbance à 625 nm a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre pour chacun des échantillons. Les résultats d'absorbance ont été comparés à une courbe standard qui consistait à faire subir la réaction avec l'anthrone à des quantités connues de glucose. La courbe standard a été déterminée pour chacune des expériences de dosage de glycogène. Il s'agissait de mettre en présence 5 ml du réactif d'anthrone et une quantité connue de glucose ramenée à un volume de 1 ml. Ensuite, les éprouvettes vissables contenant les standards ont été plongées dans de l'eau bouillante pendant 10 minutes et les absorbances lues au spectrophotomètre. Aussi, un blanc consistant à 1 ml d'eau milli-Q subissant la réaction d'anthrone a été également effectué afin d'avoir une absorbance basale. Tous les dosages ont été effectués au minimum en duplicata pour chacun des échantillons testés. Une droite d'étalonnage était effectuée à l'aide d'une solution concentrée parallèlement à chacun des dosages d'échantillon.

### **3.5 Test statistique**

Les résultats de dosages du phosphore, des PHB et du glycogène ont été comparés entre eux par des tests de Student comparant les moyennes. Tous les tests ont été effectués en considérant que le  $H_0$  représentait qu'il n'y avait aucune différence entre deux moyennes et  $H_1$  signifiait qu'il existait une différence. Les différences ont été considérées significatives lorsque le résultat du test était plus petit ou égal à 0,05.

### 3.6 Extraction des acides nucléiques

Dans un tube de 2 ml vissable, 250 mg de billes de verre stériles (0,4-0,5 mm), 500 µl de tampon TEN (Tris HCl 50mM, EDTA 10mM, NaCl 150mM, pH8), 500 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) et 40 µl de SDS 20 % ont été mis en présence d'environ 100 mg de biomasse. Le mélange a été homogénéisé durant 20 secondes à vitesse 4 avec un appareil à homogénéisation FastPrep modèle FP120-115 (Thermo Savant, GMI, Ramsey, MN, É.U.). Afin d'augmenter l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques, l'homogénéisation a parfois été répétée une seconde fois : l'échantillon était alors conservé sur de la glace pendant cinq minutes avant d'être à nouveau homogénéisé. L'échantillon a été centrifugé pendant 15 minutes à 16000 g et le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube de 1,5 ml. Le phénol résiduel a été ensuite récupéré par l'ajout de 500 µl de chloroforme/ alcool isoamylique (49/1). L'échantillon a subi une seconde centrifugation à 16000 g durant 5 minutes. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube contenant 167 µl d'acétate d'ammonium 10 M. Après avoir laissé reposer l'échantillon 20 minutes sur de la glace, le tube a été centrifugé pendant 15 minutes à 16000 g et 500 µl de surnageant ont été transférés dans un nouveau tube où 2 volumes d'éthanol 95% étaient ajoutés. L'échantillon a été placé à -20 °C pour au moins 30 minutes. L'échantillon a subi alors une quatrième centrifugation à vitesse de 16000 g durant 15 minutes. Le culot a été ensuite lavé avec un 500 µl d'éthanol 70% et centrifugé à vitesse maximale pendant 2 minutes. Le culot a finalement été resuspendu dans de l'eau milli-Q filtrée stérile (50-200 µl selon la quantité d'ADN obtenue).

Cinq µl de l'échantillon, auquel 2 µl de tampon de chargement a été ajouté, ont été placés sur un gel d'agarose UltraPure™ 1 % (Invitrogen, Carlsbad, CA, É.U.) avec du TAE 1X (2,42 g de Tris hydroxyméthyl aminométhane, 0,571g d'acide acétique glacial et 50 ml d'EDTA 0,5 M

pH 8 dans un volume de 500 ml d'eau milli-Q) et ont subi une électrophorèse de 90 V pendant 45 minutes. L'échantillon a été comparé à 5 µl l'ADN du phage lambda digéré avec l'enzyme Styl (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, Angleterre) mélangé avec un tampon de chargement. La migration de l'échantillon sur le gel d'agarose a été visualisée par la coloration du gel avec un bain de bromure d'éthidium (6 mg/l) dilué dans du TAE 1X. Après 10 minutes de coloration, l'ADN ayant migré dans le gel s'est lié avec le bromure d'éthidium. L'excédant de bromure a été enlevé en décolorant le gel d'agarose dans de l'eau pendant environ 10 min. Le bromure d'éthidium a permis la visualisation de l'ADN sous rayonnement ultraviolet. Le gel a été ainsi photographié à l'aide d'un système Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, É.U.) composé d'une caméra surplombant un plateau d'où rayonnent des UV (Gel Doc 1000, Bio-Rad, Hercules, CA, É.U.).

### **3.7 Amplification des gènes 16S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Les gènes 16S ribosomaux ont été amplifiés par PCR avec des amorces universelles. Deux séries d'amplification ont été effectuées. Dans la première série, les amorces 534r et 341F-CG ont été utilisées pour amplifier une partie du gène 16S (Tableau 3.1). Le produit de cette PCR a ensuite servi à déterminer la diversité microbienne par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE). Dans la seconde série, les amorces 8f et 1534r ont été utilisées pour amplifier la presque totalité du gène 16S (Tableau 3.1). Les produits de ces PCR ont servi à générer une génothèque des gènes 16S ribosomaux représentant l'ensemble de la diversité bactérienne dans le biofilm de chacune des quatre expériences analysées dans le cadre de cette étude.

Sauf exception, les mélanges réactionnels PCR ont été les mêmes pour toutes les réactions. Seules les amorces et la nature des échantillons ont pu différer. Typiquement, les mélanges PCR consistaient en un volume d'échantillon (1-5  $\mu\text{l}$  selon la concentration d'ADN dans celui-ci), 36,5  $\mu\text{l}$  d'eau milli-Q filtrée sur membrane 0,22  $\mu\text{m}$  et stérilisée à l'autoclave, 5  $\mu\text{l}$  de tampon 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ) GE Healthcare), 1  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10X (GE Healthcare), 1  $\mu\text{l}$  d'amorce sens (100 picomoles/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  d'amorce anti-sens (100 picomoles/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  d'albumine bovine (BSA) 25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  et 0,5  $\mu\text{l}$  de Taq polymérase 5000  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (GE Healthcare). Les amplifications PCR ont été effectuées dans un GenAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster, CA, É.U. Le programme suivi pour les amorces 534r et 341F-CG et les amorces 8f et 1534r ciblant le 16S utilisait les paramètres décrits dans le tableau 4. Les changements ont été effectués seulement en ce qui concerne les températures d'appariement et le nombre de cycles d'amplification (Tableau 3.2).

Suite à l'identification par la génothèque des espèces jouant un rôle important dans le système de déphosphatation biologique (voir sections suivantes), des PCR avec des sondes spécifiques ciblant ces organismes ont été effectuées afin de détecter leur présence dans le système. En effet, des PCR ciblant les bactéries considérées comme des OAP et les OAG ont été effectuées afin de détecter la présence de ces organismes. Aussi, des PCR ciblant des sections du gène codant pour le 16S de différentes eubactéries et archaebactéries autofluorescentes ont été effectuées afin de vérifier la présence de ces organismes. De plus, des PCR ciblant spécifiquement la polyphosphate kinase des OAP ont été effectuées afin de confirmer la présence de ces derniers (McMahon *et al.*, 2002).

Les échantillons testés pour les PCR spécifiques ont été faits en triplicata. Les échantillons choisis pour être investigués davantage étaient ceux présentant des propriétés

particulières comme de l'autofluorescence ou provenant d'un biofilm ayant un niveau de déphosphatation élevé.

Tableau 3.1 : Étapes de la PCR avec les amorces 8f et 1534r ainsi qu'avec les amorces 341F-CG et 534r

Étape	Étape	Température (°C)	Durée (minutes)	Répétition
1	Dénaturation initiale	94	3	1
2	Hybridation	55	3	1
3	Élongation	72	¾	30 cycles
4	Dénaturation	94	¾	
5	Hybridation	55	¾	
6	Élongation finale	72	10	1

### 3.8 Amorces

Comme mentionné dans la section précédente, des amorces spécifiques à certains organismes d'intérêt ont été utilisées (Tableau 3.2). Tout d'abord, des amorces visant les organismes autofluorescents ont été synthétisées à partir des connaissances de la littérature. Parmi celles-ci, des amorces ciblant les cyanobactéries nommées CYA106Fc, CYA359Fc, CYA781R(a) et CYA781R(b) ont été utilisées. Les conditions des PCR respectaient celles décrites par Nubel *et al.* (1997). Les amorces pufM.557F et pufM.750R visaient une partie du gène codant pour le 16S de bactéries pourpres photosynthétiques (Achenbach *et al.*, 2001). Aussi, des amorces ciblant les bactéries vertes sulfureuses et non-sulfureuses ont été utilisées (GS.619F et GS.1144R, et CFX.856F et CFX.1240R). Finalement, pour les bactéries autofluorescentes, le groupe des héliobactéries a été visé par les amorces HB.418F et HB.1159R. Toutes ces réactions PCR ont été effectuées selon les protocoles optimisés par Achenbach *et al.* (2001).

Tableau 3.2 : Séquences des amorces utilisées						
Noms des amorces	Séquences des amorces	T° d'hybridation (°C)	Nbr de cycles	Quantités d'amorces par réaction (pmol/µl)	Références	
SP6 T7	5' – AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA G - 3' 5' – TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	55	30	10	Ling et al., 1989	
pA (8f) pH (1534r)	5' AGA GTT TGA TC(c-a) TGG CTC AG 3' 5' AAG GAG GTG ATC CA(g-a) CCG CA 3'	55	30	10	Bruce et al., 1992, Edwards et al., 1989	
341f- GC  534r	5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG   CCT ACG GGA GGC AGC AG -3' 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	55	30	10	Muyzer al., 1996	
CYA1 06Fc CYA3 59Fc CYA7 81R(a) CYA7 81R(b)	5'-CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A- 3', 5'-GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG-3', 5'-GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T-3' 5'- GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T-3'	60	35	5	Nubel et al., 1997	
pufM.5 57F pufM.7 50R	5'- CGC ACC TGG ACT GGA C-3' 5'-CCC ATG GTC CAG CGC CAG AA-3'	55	30	8,75	Achenbach et al., 2001	
GS.619 F GS.114 4R	5'- GGG GTT AAA TCC ATG TGC T-3' 5'- CAG TTC ART TAG AGT CC-3'	55	30	8,75	Achenbach et al., 2001	
CFX.8 56F CFX.1 240R	5'- TGC CTT AGC TCA CGC GGT AA-3' 5'- GCA ACG CAT TGT CGT GGC CA-3'	55	30	8,75	Achenbach et al., 2001	
HB.41	5'-TCT TCG GAT TGT AAA CCC-3'	55	30	8,75	Achenbach et al.,	

8F	5'-CCG GTC GTC CCG GGC A-3'				2001
HB.11					
59R					
ArchD	5' TTC (c/t)GG TTG ATC C(c/t)G CC(g/a)	55	30	8,75	
ArchG	GA 3'				
	5' GGC GGT GTG TGC AAG GAG CA 3'				
PAO65	5' CTG GAG TTT GGC AGA GGG 3'	53	30	10	Crocetti et al, 2000
1F	5' GTT AGC TAC GGC ACT AAA AGG 3'				
PAO84					
6R					
GAOQ	5' AAG CCC TTT AGG CGG GGA 3'	53	30	10	Crocetti et al. 2002
431F	5' TTC CCC GGA TGT CAA GGC 3'				
GAOQ					
989R					

---

Outre les cyanobactéries et les bactéries autofluorescentes, certaines archaebactéries sont capables d'émettre de la fluorescence. Aussi, des amorces capables de cibler le gène codant pour les séquences 16S des archaebactéries ont été utilisées afin de vérifier la présence de ces dernières dans le biofilm (ArchD et ArchG).

### 3.9 Principe du DGGE

Le principe de l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) vient de la propriété que possède l'ADN de se fractionner en segments distincts que l'on nomme domaines de dénaturation. On peut fractionner l'ADN soit en haussant la température, soit en augmentant la concentration d'un produit dénaturant soit en combinant ces deux méthodes. Le fractionnement s'effectue en fonction de la séquence nucléotidique des échantillons d'ADN. Le gradient dénaturant du gel doit être linéaire afin de bien séparer les deux brins de l'ADN, ce qui rendait sa

structure tridimensionnelle moins uniforme impliquant que la migration dans le polyacrylamide se faisait à un niveau réduit. Le niveau de dénaturation du gel, la température et la tension dans le champ électrique passant par le gel vont influencer la vitesse de migration. Cependant, c'est surtout la concentration du dénaturant qui contribue à donner à chacun des fragments d'ADN amplifiés une position spécifique sur le gel. La pince GC sert d'ailleurs d'ancre par la forte liaison liant ces deux nucléotides (trois ponts hydrogène).

Afin d'effectuer les PCR-DGGE, des échantillons de biofilm ont été d'abord collectés toutes les deux ou trois semaines au cours de chacune des quatre expériences. Comme pour l'échantillonnage de la biomasse, trois médias étaient retirés du système et la biomasse de ceux-ci était grattée et regroupée pour ensuite être analysée. Le résultat de tous les échantillonnages a été analysé. Ensuite, une amplification PCR d'une région hypervariable du gène codant pour l'unité ribosomale 16S a été effectuée pour chacun des échantillons. Les réactions ont été effectuées à l'aide des amorces 341f munies d'une pince GC et 534r (Tableau 3.2) ce qui donnait des fragments d'environ 250 pb. Le gel a été formé d'un mélange graduel de deux solutions : la première ayant un faible pourcentage de dénaturant (0%), la seconde ayant un fort pourcentage de dénaturant (80%). La composition de la solution à faible pourcentage de dénaturant était 10 ml d'une solution d'acrylamide : bis (37,5 :1) 40%, 1 ml de TAE 50X et 39 ml d'eau milli-Q, totalisant 50 ml. La solution à fort potentiel dénaturant a été composée de 10 ml d'une solution d'acrylamide : bis (37,5 :1) 40%, 1ml de TAE 50X, 16 ml de formamide déionisée, 16,8 g d'urée. Le volume a été complété à 50 ml avec de l'eau milli-Q. Suite à la filtration des deux solutions à travers une membrane 0,45 µm, ces deux solutions ont été dégazées par agitation sous une jarre anaérobie pendant 15 minutes. Les solutions ont ensuite été placées sur de la glace avec des solutions de persulfate d'ammonium 10% et de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine) (Bio-Rad). La polymérisation étant retardée par la baisse de la

température des solutions, la solution à faible potentiel dénaturant a pu être placée dans la chambre B du dispositif à formation du gradient (Bio-Rad), tandis que la chambre A a été remplie de la solution à haut pourcentage de dénaturant. La solution de la chambre A a été sous agitation constante alors que 100 µl de persulfate d'ammonium et 10 µl de TEMED ont été ajoutés dans chacune des solutions. Rapidement, le levier reliant les deux chambres a été mis en position ouverte pour permettre à la solution de la chambre B de venir se mélanger à la solution de la chambre A. Le tuyau dans lequel le liquide mélangé formant le gel a été placé au centre des vitres constituant le montage pour le gel. Les puits de chargement ont été formés à l'aide d'un peigne placé au sommet du gel avant que ce dernier ait fini de polymériser. Ainsi, environ 300 ng de produits PCR par échantillon ont subi une migration dans un gel contenant 8% de polyacrylamide (acrylamide: N-N'-méthylène bisacrylamide 37,5 : 1) et un gradient linéaire de dénaturation allant de 30 à 70%. Les échantillons à migrer étaient constitués de 12 µl d'ADN d'amplicon et 8 µl de tampon de chargement pour un total de 20 µl pour les échantillons de consortium. La migration des échantillons a duré 16 heures dans du TAE 1X à 60 °C à 100 V et 0,05 A pour un gel. Suite à la migration, le gel a été coloré au bromure d'éthidium (10 µg/ml).

### **3.10 Génothèques des gènes de l'ARNr 16S.**

#### ***3.10.1 Purification des produits PCR***

Des génothèques pour les Expériences I, II et III ont été réalisées avec des amplicons obtenus suite à des PCR ciblant le gène codant pour l'unité ribosomale 16S avec les amorces 8f et 1534r. Au total, 240 clones ont été criblés et 216 ont été séquencés. Chaque clone a été séquencé à chaque extrémité et les séquences résultantes ont été réunies en une seule séquence. Ainsi, les échantillons de biomasse présentant les meilleures performances de déphosphatation biologique

et une certaine stabilité au niveau de la diversité spécifique ont été sélectionnés pour les génothèques. La stabilité de la biomasse bactérienne a été obtenue lorsque les profils migratoires du DGGE montraient peu de variation entre les échantillons. Les amplicons ont été purifiés à l'aide de la trousse QIAquick (Qiagen, Montgomery County, MD, É.U.).

### ***3.10.2 Ligation et transformation***

Des aliquotes de 2 et 4 µl de produit PCR concentré et purifié ont été mélangés à 5 µl de tampon de ligation 2X rapide (60 mM Tris-HCl (pH 7,8), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 2mM ATP et 10% de polyéthylène glycol) avec 1 µl (50 ng) du vecteur pGEM®-T Easy (Promega, Madison, Wi, É.-U.), 1 µl de T4 DNA Ligase (Promega, Madison, Wi, É.-U.) et 1 µl d'eau milli-Q stérile. La ligation a été incubée 1 heure à la température de la pièce ou 48 heures à 4 °C. L'incubation a permis l'insertion du fragment d'environ 1500 pb dans le vecteur de 3000 pb pGEM®-T Easy (Fig. 3.1). L'étape suivante consistait en la transformation des cellules compétentes. Pour ce faire, des boîtes de Pétris sur lesquelles des géloses LB/ampicilline/IPTG/X-GAL (LB : 10g/l de Bacto® tryptone, 5g/l de Bacto® extrait de levure, 5 g/l de NaCl pH 7,0; stérilisées pendant 30 minutes à l'autoclave; 0,1 mg/ml d'ampicilline, 0,1 mM d'IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) et 0,5 mM de XGAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) ont été ajoutés lorsque la température a descendu sous la barre des 50 °C. Une fois la solution bien mélangée, des géloses ont été coulées avant d'être conservées à 4 °C jusqu'au moment de leur utilisation. Les ligations ont été centrifugées et un volume de 3 µl des réactions a été mis dans un tube de 1,5 ml stérile maintenu sur glace. Parallèlement, 0,1 ng de plasmide non ligué a été préparé pour des fins de contrôle. Après 5 minutes dans un bain de glace, les cellules compétentes à haute efficacité JM109 (Promega,

Madison, WI, É.-U.) ont été mélangées par inversion des tubes avant qu'un volume de 50 µl de ces cellules ne soit ajouté et mélangé à chaque tube de réaction de ligation. Cent µl ont été ajoutés au contrôle. Suite à une incubation de 20 minutes sur de la glace, les cellules compétentes ont été soumises à un choc thermique de 45 secondes dans un bain à 42 °C, avant d'être remises sur de la glace pour 2 minutes. Ensuite, 500 µl de LB ont été ajoutés et le tout a été incubé à 37°C pendant 30 min à 200 rpm. Cent µl ont été étalés sur une gélose LB-agar 5% avec ampicilline et X-gal.

Entre 100 à 200 colonies blanches ont été repiquées pour chacune des expériences et l'ADN plasmidique a été extrait de chacune. Afin de s'assurer que l'ADN plasmidique était en quantité suffisante pour le séquençage et que les inserts étaient complets, des amplifications PCR utilisant les séquences des bouts adjacents à l'insert à l'intérieur du plasmide. Il s'agissait des amorces SP6 et T7 (Tableau 3.2). Certaines des amplifications PCR ont été différenciées grâce à une digestion par les endonucléases *AfaI* (*RsaI*) et *HhaI*, mais pour la plupart, le produit PCR a été envoyé à Génome Québec pour en obtenir la séquence.

### 3.11 Arbres phylogénétiques

Les séquences obtenues ont été ensuite comparées aux banques de données du NCBI (National Center of Biotechnology Information) avec le logiciel BLAST (sur le site du NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) et le logiciel FASTA (sur le site EMBL : <http://www.ebi.ac.uk/>). Les séquences 16S les plus homologues à nos séquences nous ont permis de déterminer les affiliations les plus probables avec les espèces représentées. Le logiciel ARB a ensuite été utilisé pour compléter l'étude phylogénétique. Pour ce faire, le logiciel a permis d'aligner les séquences entre elles et de déterminer leur affiliation parmi plus de 100 000 séquences connues du gène codant pour l'unité 16S ribosomale. Aussi, grâce à ARB, nos

séquences ont pu être intégrées à l'arbre phylogénétique global des bactéries ce qui a permis de représenter les séquences connues se rapprochant le plus de nos séquences. Finalement, la banque de données reliée à ARB décrit les conditions et les lieux qui a permis de découvrir chacune des souches présentes dans la banque de données ce qui s'avère particulièrement pertinent pour des études portant sur des souches bactériennes demeurant encore à ce jour impossibles à isoler avec les méthodes de culture microbiologiques traditionnelles. Des arbres ont été créés pour les différentes subdivisions des bactéries afin de mieux observer les alignements des clones trouvés dans le cadre de cette étude. Ainsi, sept arbres ont été produits, soit un pour chaque regroupement de bactéries. Il s'agit des alphaprotéobactéries, des betaprotéobactéries, des deltaprotéobactéries, des gammaprotéobactéries, des acidobactéries, des chloroflexi de même que des bactéries non cultivables appartenant à OP11.

## **3.12 FISH**

### ***3.12.1 Sondes ADN***

Des sondes oligonucléotidiques ont été utilisées pour la technique FISH (Tableau 3.3). La sonde EUB338 liée à Cy5 (excitation à 649 nm, émission 670), qui cible l'ensemble des eubactéries présentes dans le biofilm (Amann *et al.*, 1990), a été utilisée afin d'estimer la quantité totale de bactéries présentes. Le groupe des alphaprotéobactéries a été mis en évidence avec les sondes ALF968 (Neef, 1997) et ALF1b (Manz *et al.*, 1992) liées à la FITC (fluorescéine isothiocyanate) (excitation à 490 nm, émission 525 nm) à une concentration de formamide de 20%. Le groupe des betaprotéobactéries a été mis en évidence avec la sonde BET42a (Beer *et al.*, 2004) liée à la FITC à une concentration de formamide de 35%. Ainsi, la sonde Gamma-1 a été

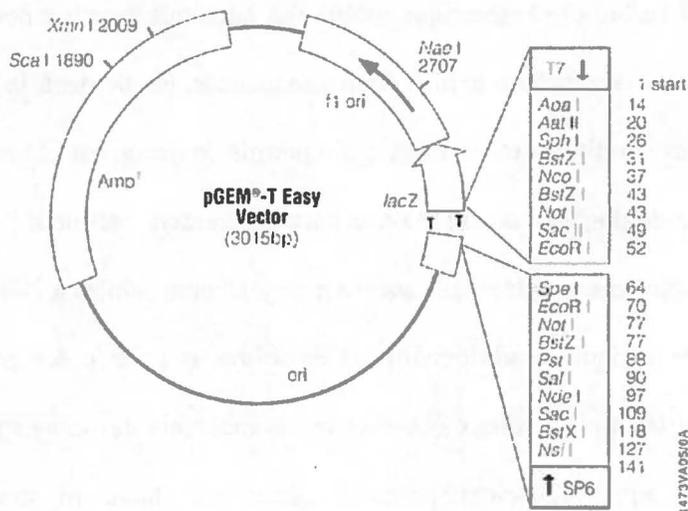


Figure 3.1 : Le plasmide pGEM-T Easy (Invitrogen) a été mis au point afin de réaliser le clonage des produits PCR. Ce vecteur est fourni sous forme ouverte et additionné de thymidine aux extrémités 3' terminales. Ce plasmide contient de nombreux sites de restriction à l'intérieur de son MCS (Multi Cloning Site). Ces sites de restriction permettent l'excision de l'insert par digestion. (Voir <http://www.invitrogen.com/>).

utilisée alors qu'elle était liée au fluorochrome Cy3. Des sondes spécifiques pour les OAP, telle la PAO651 (Crocetti *et al.*, 2000), ont été utilisées et liées au fluorochrome Cy3 (excitation à 552 nm, émission 615) à une concentration de formamide de 35% s'hybridant aux *Candidatus Accumulibacter* sp. L'utilisation des sondes PAO462 et PAO846 s'hybridant spécifiquement *Candidatus A. phosphatis* ont également été utilisées (Crocetti *et al.*, 2000). Cependant, selon l'étude de (Crocetti *et al.*, 2000), les clones trouvés dans leur procédé d'EBPR semblaient s'hybrider à presque toutes les sondes utilisées. La sonde ciblant des OAG a également été utilisée sur la biomasse. En effet, les sondes GAOQ431 et GAOQ898 ont été liées à la FITC afin d'être utilisées conjointement avec les sondes Gamma-1, dont elle fait partie, et PAO651, qui cible les OAP, principales compétitrices des OAG.

### ***3.12.2 Protocole d'hybridation in situ***

Parce que les oligonucléotides fluorescents doivent pénétrer dans les cellules afin d'aller s'hybrider à leurs sites complémentaires sur le ribosome, il a été primordial d'induire la perméabilisation des cellules. Les lames portant des biofilms dont l'échantillonnage est décrit à la section 3.1 ont été, dans un premier temps, lavées au PBS 1X deux ou trois fois afin d'enlever toutes traces de dépôts indésirables (sels, déchets organiques, cellules mortes, etc.). Ensuite, la biomasse a été déshydratée dans des bains d'éthanol en pourcentages progressivement plus importants (50, 70 et 95 %) (Lanthier *et al.*, 2002). Il est à noter que certains échantillons ont été conservés à 4 °C durant plusieurs semaines dans de l'éthanol 70 %. Les champs microscopiques ont subi des hybridations avec une solution de 0,9 M de NaCl, 0,02 M de Tris-HCl, 0,01 % dodécyl sulfate de sodium [pH final 7.2] contenant 25 ng de sonde fluorescente par µl et un

oligonucléotide d'aide (s'il y a lieu). Les concentrations en formamide déionisée variaient selon les données du tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Séquences des sondes oligonucléotidiques et leur site cible

Sondes	Séquence (5' -3')	Site cible d'ARNr	Spécificité	% Formamide	Référence
EUB338	GCTGCCTCCCGTA GGAGT	16S, nt 338-355	Bactéries	0 - 50	Amann et al., 1990
ALF1b	CGTTCGYTCTGA GCCAG	16S, nt 19-35	$\alpha$ -proteobacteria, qq Deltaproteobacteria, Spirochaetes	20	Manz et al., 1992
ALF968	GGTAAGGTTCTG CGCGTT	16S, nt 968 - 985	$\alpha$ -proteobacteria, excepté les Rickettsiales	20	Neef, 1997
BET42a	GCCTTCCCCTTC GTTT	23S, nt 1027-1043	$\beta$ -proteobacteria	35	Manz et al., 1992
PAO651	CCCTTGCCAAA CTCCAG	16S, nt 651 - 668	Groupe de Candidatus "Accumulibacter"	35	Crocetti et al., 2000
PAO462	CCGTCATCTACW CAGGGTATTAAC	16S, nt 462 - 485	Candidatus "Accumulibacter phosphatis"	35	Crocetti et al., 2000
PAO846	GTTAGCTACGGC ACTAAAAGG	16S, nt 846 - 866	Candidatus "Accumulibacter phosphatis"	35	Crocetti et al., 2000
Gamma-1	GCCTTCCCACATC GTTT	16S, nt 1027 - 1043	$\gamma$ -proteobacteria	35	Manz et al., 1992
GAOQ431	TCCCCGCCTAAA GGGCTT	16S, nt 431 - 448	Candidatus Competibacter phosphatis	35	Crocetti et al., 2002
GAOQ989	TTCCCCGGATGTC AAGGC	16S, nt 989 - 1006	Candidatus Competibacter phosphatis	35	Crocetti et al., 2002

### 3.13 Coupes minces

Puisque les biofilms peuvent varier en épaisseur de quelques micromètres à près d'un millimètre, les coupes minces peuvent s'avérer très utiles à l'observation d'un échantillon. En effet, puisque les sondes fluorescentes ne pénètrent généralement pas plus profond que 100

microns, la structure d'un biofilm plus épais peut échapper à la microscopie confocale à balayage laser. Dans le cas de cette étude, l'utilisation de blocs de paraffine contenant les échantillons séchés au xylène a été choisie pour l'exploration des biofilms épais. Il a ainsi été possible d'étudier les biofilms d'épaisseur importante (jusqu'à 1 mm) avec une précision appréciable.

Suite au traitement des échantillons comme pour les expériences d'hybridation in situ avec sondes fluorescentes (décrit dans la section précédente), les échantillons de biofilm ont été déshydratés par des trempages répétés dans du xylène pur. Pour ce faire, des fioles à scintillation contenant un mélange de paraffine fondue et de xylène (1 :1) ont été préparées et maintenues à 60 °C. Des fioles de xylène pur ont également été maintenues à 60 °C. Les échantillons conservés dans de l'éthanol 70% ont été mis dans de l'éthanol 95% (trois lavages successifs avec 20 min d'incubation) pour ensuite être mis dans du xylène pur (trois passages successifs avec 10 min d'incubation pour chacun). Ensuite, il a fallu transférer les échantillons déshydratés dans les fioles à scintillation contenant le mélange xylène et paraffine (Paraplast®, BioRad) (1 :1) 60 °C. Il a fallu s'assurer que les échantillons étaient bien recouverts par la paraffine. On a laissé figer la paraffine à la température de la pièce durant la nuit. Des fioles contenant de la paraffine pure ont été mises à 60 °C durant la nuit. Le lendemain, les fioles contenant les échantillons et la paraffine figée ont été remises à 60 °C et le mélange de paraffine et de xylène remplacé par de la paraffine pure à 60 °C pendant 1 h. L'opération a été faite deux autres fois afin de s'assurer qu'il ne restait plus de xylène dans la paraffine. À la fin de la dernière incubation, les échantillons ont été mis dans un moule pour le microtome. La paraffine s'est rigidifiée très rapidement. Une fois le bloc de paraffine séché et solidifié sous la hotte chimique à la température de la pièce, de minces couches de 5 à 20 µm d'épaisseur de paraffine et d'échantillon de biofilm ont été taillées et conservées sur des lames de microscope traitées avec un enrobage de gélatine. Afin de retirer

l'excédant de paraffine sur la lame, un déparaffinage a été effectué sur tous les échantillons. Pour ce faire, trois lavages successifs au xylène ont été faits qui furent suivis par au moins deux rinçages à l'éthanol 95 % et un temps de séchage sous la hotte chimique. Les coupes étaient alors prêtes à subir une hybridation *in situ* avec les sondes fluorescentes.

### **3.14 Colorations**

#### **3.14.1 Coloration de Neisser**

Sur une lame de microscope, une petite quantité de la biomasse a été déposée à l'aide d'un manche de Koch et fut séchée à l'air. La première coloration a été effectuée durant 30 secondes avec une solution de bleu de méthylène (1 g de bleu de méthylène en poudre dilué dans 5 ml d'éthanol 95 % et 5 ml d'acide acétique glacial, et complété à 100 ml avec de l'eau) ainsi qu'une solution de cristal violet (solution de 10 % de cristal violet p/v dans éthanol 95 % mise avec 6,7 ml d'éthanol 95 % et complété à 100 ml avec de l'eau). Les deux solutions ont été mélangées juste avant leur utilisation dans des proportions de 2 : 1 en faveur de la solution de bleu de méthylène. La lame portant l'échantillon coloré a été rincée rapidement avec de l'eau milli-Q pour ensuite être contre colorée avec une solution de brun de Bismark (0,33 g dans 100 ml d'eau milli-Q) durant 1 minute. La lame a été par la suite rincée à l'eau milli-Q et séchée à l'air avant d'être mise en observation sous un microscope optique à un grossissement de 1000 X à l'huile à immersion et illumination directe. On considère les cellules ou les granules bleu-violet comme positives, car le bleu de méthylène a une affinité pour les granules de polyP, alors que les cellules brun-jaune sont négatives (Jenkins *et al.*, 2004).

### **3.14.2 Coloration DAPI**

La coloration DAPI fut utilisée selon la technique décrite par Streichen *et al.* (1990). Les échantillons de biofilm ont été fixés sur des lames de microscope et mis en présence de 50 µl de DAPI (50 µg/ml de PBS) filtré avec un filtre de 0,2 µm (Millipore). Après 10 secondes, chaque lame a été brièvement rincée avec de l'eau distillée puis séchée la lame à température pièce. À 340 nm d'excitation, les granules intracellulaires de polyP fluorescent jaune alors qu'en présence de cellules n'ayant pas de granules de polyP, ces dernières vont demeurer bleues.

### **3.14.3 Coloration des polyhydroxyalkanoates (PHA)**

Sur une lame de microscope, une petite quantité de la biomasse a été déposée à l'aide d'un manche de Koch et a été séchée à l'air. Une solution de noir du Soudan B (0,3 % m/v dans une solution de 60 % éthanol 95 % et 40 % eau milli-Q) a servi pour la première coloration qui a duré 10 minutes. Le colorant a été ensuite rincé et la contre coloration à la safranine O (0,5 % m/v dans de l'eau milli-Q) a été ensuite faite pendant 10 secondes. La lame a été par la suite rincée à l'eau milli-Q et séchée à l'air avant d'être mise en observation sous un microscope optique à un grossissement de 1000 X à l'huile à immersion et illumination directe. Les granules de PHA ont été colorées en bleu-noir alors que les cytoplasmes des cellules n'ayant pas de PHA apparaissaient en rose (Murray *et al.*, 1994).



## CHAPITRE IV

### 4. Résultats

#### 4.1 Expérience I: Eau salée

Puisque les performances d'assimilation et de relargage du phosphore en eau salée n'ont pas donné les résultats escomptés et que la quantité de la biomasse dans le système a chuté radicalement, la suite du projet en eau salée n'a pu être reconduite au-delà des 210 jours de l'Expérience I. Même si la figure 4.1 semble montrer la présence d'OAP, aucune double coloration (Neisser et PHA) n'a permis de confirmer que les mêmes cellules possédaient à la fois des granules de PHA et des granules de polyP.

Sur les PCR ciblant les OAP, aucune amplification n'a pu être démontrée (données non montrées) ce qui confirme les résultats de l'absence d'activité déphosphatante. Aucune génothèque de clones et d'expérience de FISH n'a été tentée sur ces réacteurs. À l'instar de la biomasse d'eau douce, la diversité des microorganismes dans la biomasse en eau salée a été également suivie à travers le temps par DGGE. Les deux réacteurs présentaient des profils de diversités relativement stables dans le temps et des similitudes importantes entre les réacteurs 1 et 2. En effet, mis à part l'inoculum, on remarque une progression lente dans le profil de diversité (Fig. 4.2).

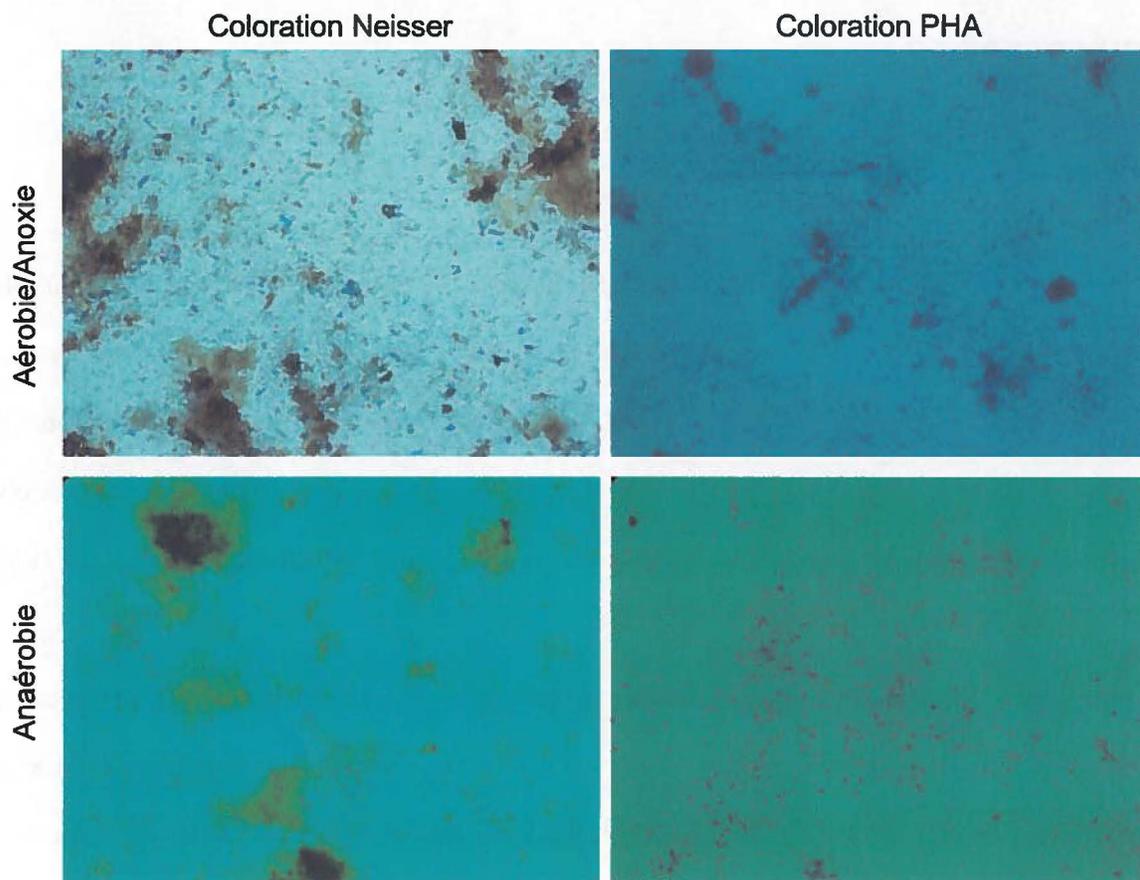


Figure 4.1 : Colorations de biofilm dispersé des réacteurs effectuant de la déphosphatation biologique en eau salée (Expérience I). Les images de la colonne de gauche sont le résultat des colorations de Neisser alors que celles de la colonne de droite sont des colorations PHA. Il s'agit de quatre champs microscopiques distincts. DAPI. 1000 X Microscopie optique.

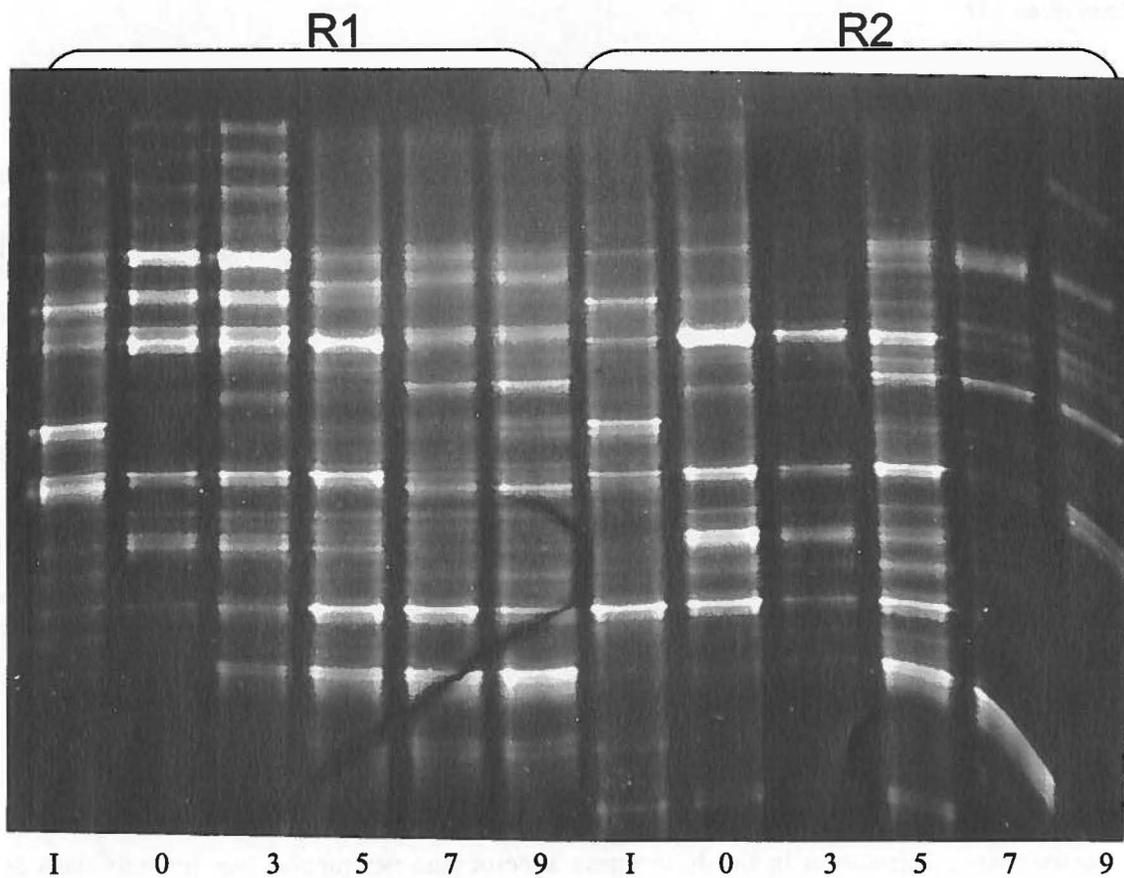


Figure 4.2 : Gel de polyacrylamide à gradient dénaturant (DGGE) d'échantillons de biomasse provenant des deux réacteurs (R1 et R2) du Biodôme de Montréal au cours de l'Expérience I (en eau salée). Les puits désignés par la lettre I sont les inoculums de départ. Les chiffres représentent le nombre de semaines suivant le début de l'alternance des phases anaérobie et aérobie. Avant la semaine 0, la croissance de la biomasse a été favorisée en conditions dénitrifiante.

## 4. Expérience II

### 4.1.1 Caractérisation biochimique de la biomasse déphosphatante

Les PHB (comme indicateur d'abondance des PHA), le glucose et le phosphore total intracellulaires ont été mesurés sur la biomasse prélevée. En principe, lorsqu'il y a déphosphatation, la quantité de PHA est maximale dans la phase anaérobie et minimale dans la phase aérobie, tandis que c'est l'inverse pour le phosphore intracellulaire (Fig. 2.1). Pour ce qui est du glucose, il devrait suivre les quantités de phosphate intracellulaire, c'est-à-dire être maximal à la fin de la phase aérobie et être minimal à la fin de l'anaérobie. En effet, les quantités de glucose reflètent les quantités de glycogène que les OAP accumulent durant la phase aérobie et utilisent durant la phase anaérobie pour fournir l'énergie nécessaire à la réduction (Mino *et al.*, 1998).

Nous avons observé conformément à la théorie que les niveaux de PHB ont été significativement supérieurs à la fin de la phase anaérobie par rapport aux niveaux dans la phase aérobie bien que les niveaux et la différence entre les ceux-ci aient été faibles, mais significativement différent (Fig. 4.3). En effet, les quantités de PHB mesurées étaient de  $8,8 \pm 1,5$  mg/g de la biomasse lyophilisée pour l'anaérobie et de  $4,82 \pm 0,07$  mg/g de biomasse lyophilisée pour la période d'aérobie/anoxie. Pour ce qui est du glucose, les résultats observés sont à l'inverse de ce qui est présenté dans la littérature, c'est-à-dire le niveau de glucose en anaérobie a été significativement supérieur à celui en aérobie/anoxie. Cette différence a été testée significative par un test de Student. Pour le phosphore total, aucune différence significative n'a été observée entre l'anaérobie et l'aérobie/anoxie.

#### 4.1.2 Caractérisation de la flore microbienne

La caractérisation de la biomasse s'est effectuée dans un premier temps par des colorations. Des échantillons de biomasse ont été traités par les colorations de polyphosphates et de PHA pour les quatre expériences. Ces deux colorations ont pour effet de mettre en évidence les granules de polyphosphate intracellulaire (coloration de polyP) et les granules de polyhydroxyalkanoates (coloration PHA). À la fin de la phase aérobie où les OAP sont habituellement gorgés de polyP, les granules de polyP étaient significativement plus importantes en nombre que les granules de PHA. Aussi à la fin de la phase anaérobie, les granules de PHA étaient beaucoup plus nombreuses que les granules de polyP (Fig. 4.4). La double coloration utilisant la coloration de PHA avec la coloration des polyP par le DAPI (Kawaharasaki *et al.*, 1999) a également permis de constater la présence dans les mêmes organismes à la fois de granules de polyP mais également de PHA (Fig. 4.4).

Sur la figure 4.2, les colorations ont également été effectuées sur un échantillon de la boue activée provenant de l'usine de traitement des eaux usées de Granby ayant servi d'inoculum de départ pour cette expérience. Les colorations mettent en lumière la présence initiale de granules de PHA et de polyP intracellulaires. Cependant, beaucoup d'autres organismes semblent également présents comme des bactéries filamenteuses (Fig. 4.4a).

La diversité des bactéries dans la biomasse en eau douce a également été suivie à travers le temps. Pour ce faire, un profil de diversité a été dérivé par PCR-DGGE. Il a été présumé que tous les amplicons d'une même espèce bactérienne terminent leur migration à la même hauteur sur un DGGE.

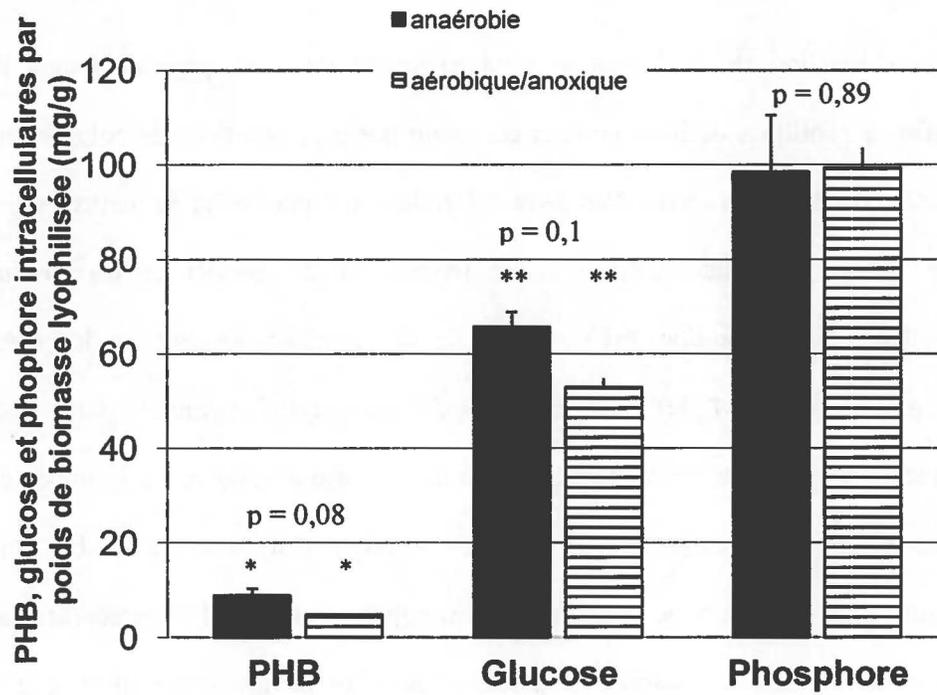


Figure 4.3 : Quantités intracellulaires de PHB, glucose et phosphore total pour l'Expérience II du réacteur 1 (affluent synthétique au Biodôme de Montréal). n = 3 (trois par paramètres mesurés par condition expérimentale). Les différences significatives ont été désignées par \* pour les PHB et \*\* pour le glucose.

La figure 4.5 montre l'évolution de la biomasse dans les réacteurs de l'Expérience II. Chaque bande d'ADN correspondrait en théorie à une espèce bactérienne. Il est possible de constater que la stabilité est plus grande entre les jours 112 et 148, mis à part la disparition de deux bandes et l'apparition de deux autres dans le haut du gel et l'apparition de bandes de secondes importances secondaires. Ceci suggère que lorsque les échantillons de biofilm utilisés pour dériver la génothèque ont été prélevés au jour 150, la diversité bactérienne était stable.

Pour s'assurer de la présence de *Candidatus A. phosphatis* dans l'échantillon sélectionné pour dériver la génothèque, une PCR ayant pour amorces des séquences spécifiques de l'ARNr 16S de cet OAP. La figure 4.6 montre le produit de cette PCR sur l'échantillon du jour 148 de l'expérience I. Le produit PCR de l'échantillon se trouvant dans le puits du centre a été fortement amplifié par ces amorces.

## 4.2 Expérience III

Un profil de diversité de cette biomasse optimisée a été établi au fil du temps afin de vérifier la stabilité spécifique de la biomasse (Fig. 4.7). Hormis une double bande apparaissant aux jours 0 et 140 et disparaissant aux jours 63 et 207, les profils de diversité observés sont demeurés semblables au cours de l'expérience. Certaines bandes ont pâli avec le temps alors que d'autres ont foncé comme pour la bande inférieure de l'échantillon du jour 207.

Les colorations des granules de PHA et de polyP obtenues ont montré la présence d'organismes capables d'assimiler des PHA sous forme de granules et d'organismes capables d'assimiler des polyP et de les accumuler sous forme de granules (Fig. 4.8). Aussi, un suivi de

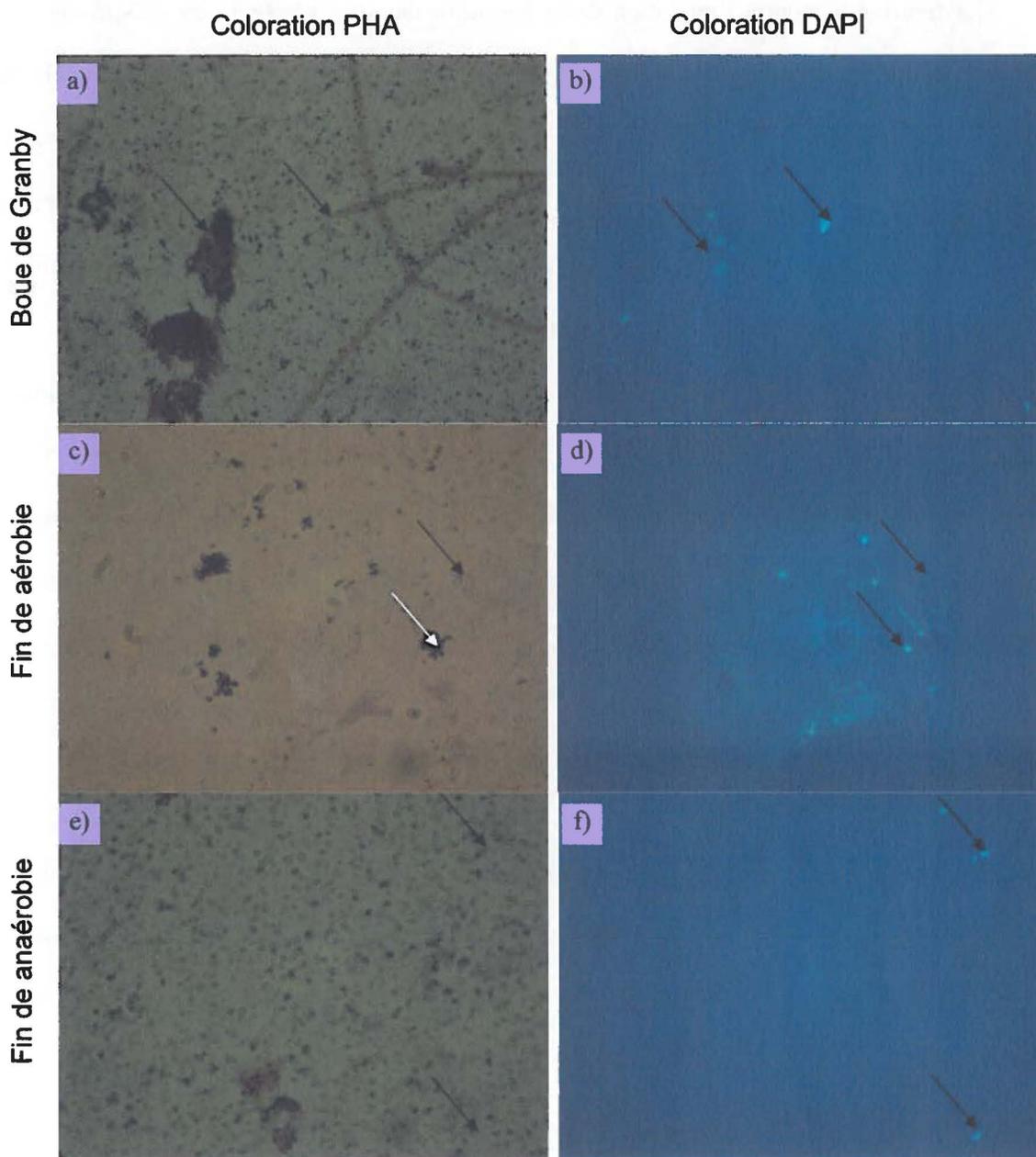


Figure 4.4 : Colorations de biofilm dispersé des réacteurs effectuant de la déphosphatation biologique en eau douce à Granby et dans les réacteurs du Biodôme. Les images de la colonne de gauche sont le résultat de la coloration PHA (point noir) avec le noir de Soudan alors que celles de la colonne de droite sont des colorations polyP avec le DAPI (point vert). Le champ microscopique pour l'image a) est le même que pour l'image b). Le même exercice se répète pour les images c) et d) ainsi que pour e) et f). Les flèches représentent les endroits où les colorations se juxtaposent, 1000 X Microscopie optique.

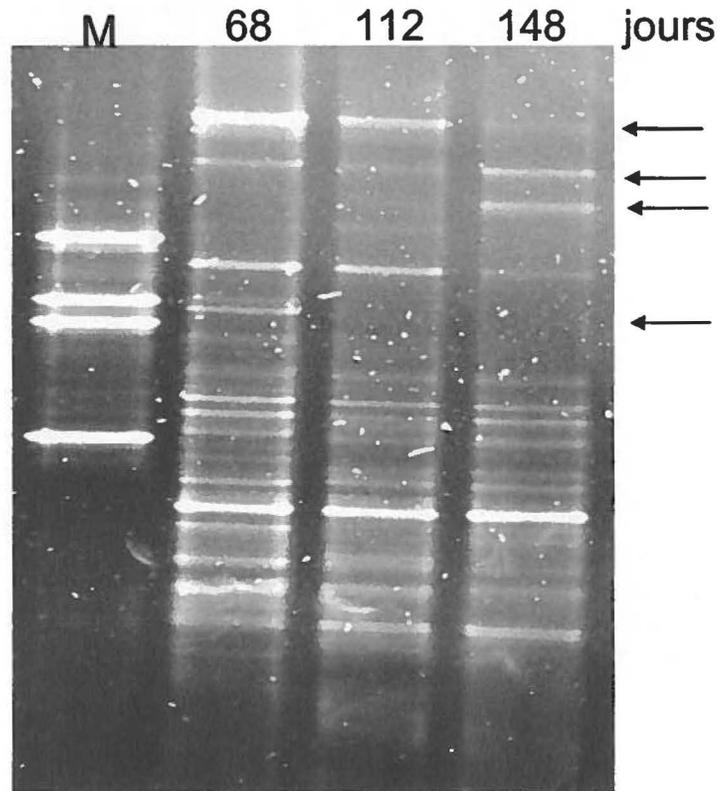


Figure 4.5 : Gel de polyacrylamide à gradient dénaturant de trois échantillons provenant d'un réacteur déphosphatant un affluent synthétique. Le premier puits représenté par la lettre M est un marqueur maison composé de 4 espèces différentes. Les flèches représentent les différences notoires entre les échantillons.

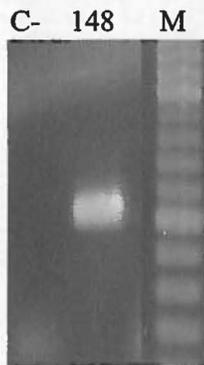


Figure 4.6 : Produits PCR spécifique ciblant les OAP pour l'échantillon du jour 148. Le premier puits contenait un contrôle négatif. Le second, une amplification d'une partie du gène codant pour l'unité ribosomale 16S de *Candidatus A. phosphatis* et dans le 3<sup>e</sup> puits, un marqueur de poids moléculaire a été placé. L'expérience a été effectuée pour le jour 148 de l'Expérience II.

0 63 140 207 jours

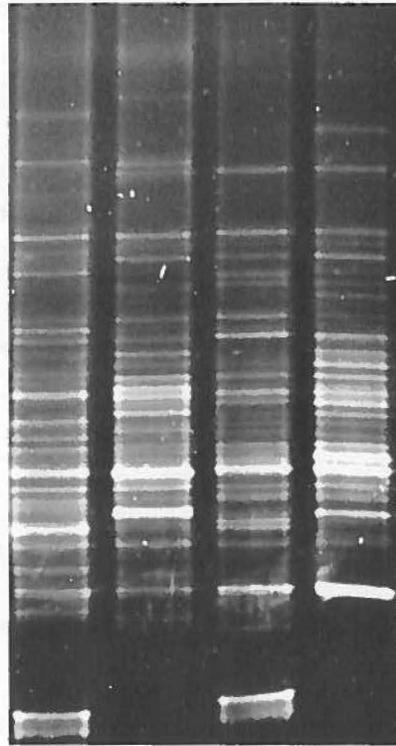


Figure 4.7 : Gel de polyacrylamide à gradient dénaturant de trois échantillons provenant d'un réacteur déphosphatant un affluent synthétique.

cycle a été effectué sur la biomasse de l'Expérience III pour l'échantillon du 207<sup>e</sup> jour. Les quantifications des PHB, du glycogène intracellulaire ainsi que du phosphate total ont été effectuées plusieurs fois durant le cycle (Fig. 4.9). Les données prises au début de la phase anaérobie et au début de l'aérobie ont été comparées. Les PHB intracellulaires ont augmenté durant la phase anaérobie et ont significativement diminué durant la phase aérobie. Ceux du glucose ont suivi le patron inverse, comme la littérature le suggère en augmentant significativement (Mino *et al.*, 1998). Les niveaux de phosphate total intracellulaires démontrent une tendance stable.

La figure 4.10 montre une amplification PCR du gène codant pour le gène de l'ARNr 16S des OAP (*Candidatus A. phosphatis*). Bien que la même quantité d'ADN de la biomasse initiale ait été mise pour chacune des réactions PCR, on remarque que l'amplification augmente entre le jour 0 et le jour 207 de l'expérience.

#### **4.3 Expérience IV: Eau douce d'un affluent piscicole (LARSA)**

Bien que l'Expérience IV a été établie avant l'expérience III, la numérotation des expériences a été déterminée dans le but de minimiser la description des méthodologies entre les expériences pour faciliter la lecture et les explications. Donc, suite aux excellents résultats pour l'enlèvement du phosphate considérable au LARSA (Fig. 2.11 essai IV), des dosages des quantités de PHA, de glucose et de phosphore intracellulaire ont été effectués pour la caractérisation de la biomasse effectuant la déphosphatation biologique pour le jour 140. La figure 4.11 montre que la biomasse provenant du système de déphosphatation avec un affluent piscicole avait des performances comparables à ce qui est trouvé dans la littérature. En effet, à la

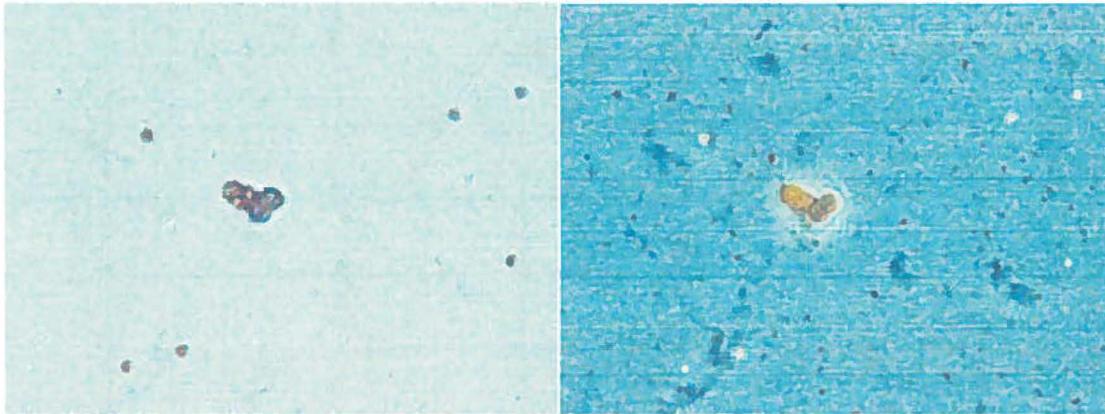


Figure 4.8 : Colorations d'un biofilm dispersé des réacteurs effectuant de la déphosphatation biologique en eau douce en fin d'anaérobie. L'image de gauche est le résultat de la coloration PHA (point noir) alors que celle de droite est une coloration polyP avec DAPI (point vert). Le champ microscopique pour les deux images est le même. 1000 X Microscopie optique.

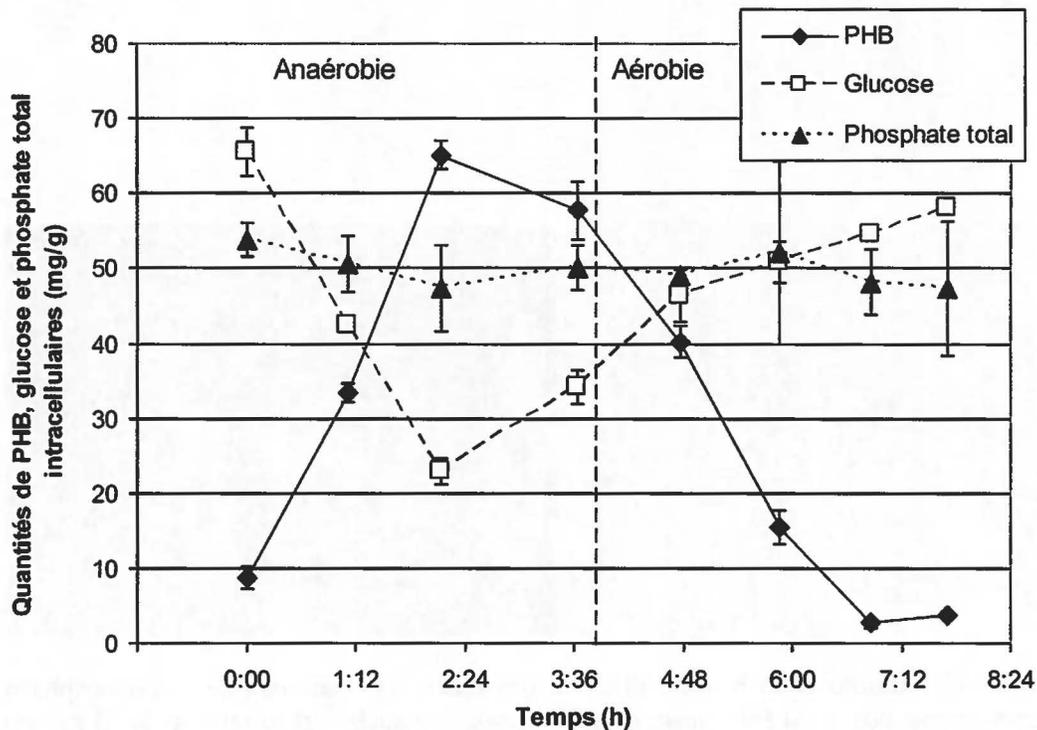


Figure 4.9 : Suivi d'un cycle à la 207e journée de l'Expérience III pour les quantités de PHB, glucose et phosphate total intracellulaires. n = 24 par paramètre (3 par point d'échantillonnage).

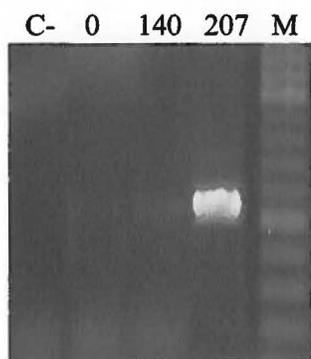


Figure 4.10 : Produit PCR spécifique ciblant les OAP pour les échantillons des jours 0, 140 et 207 de l'Expérience III. Le premier puits contenait un contrôle négatif. Les trois échantillons sont des amplifications d'une partie du gène codant pour l'unité ribosomale 16S de *Candidatus A. phosphatis* et dans le 5<sup>e</sup> puits, un marqueur de poids moléculaire a été placé.

fin de la phase anaérobie, la quantité de PHB, principal PHA en importance, était significativement supérieure à la quantité en fin de phase aérobie / anoxie. Par contre, les niveaux de glucose observés se sont révélés semblables autant pour les échantillons en anaérobie qu'en aérobie / anoxie. Pour ce qui est de la quantité de phosphore totale, des niveaux significativement supérieurs en fin d'aérobie / anoxie par rapport à ceux en fin d'anaérobie ont été remarqués, ce qui concorde avec ce qui est rapporté dans la littérature (Mino *et al.*, 1998).

Les profils bactériens PCR-DGGE ont été déterminés par PCR-DGGE aux jours 21, 84 et 140 (Fig. 4.12). Hormis une bande dominante dans l'échantillon du jour 21 s'atténuant complètement dans les deux autres semaines d'échantillonnage, les profils étaient similaires. Aussi, deux bandes apparaissant, une dans le haut et l'autre dans le bas du gel au cours des jours d'échantillonnage. Le profil de bandes présente de grandes similarités entre les trois jours d'échantillonnage. L'échantillon du jour 140 a été utilisé pour construire la génothèque du LARSA (essai IV) ce qui correspond au moment où la biomasse a été la plus efficace pour effectuer la déphosphatation biologique.

La figure 4.13 montre un échantillon de biomasse dispersée qui a été coloré avec la coloration PHA et du DAPI concentré au jour 125 en début de phase aérobie. La superposition des zones de points noirs et verts des deux images représente des cellules capables d'accumuler des granules de polyphosphate et des granules de PHA. Des cellules accumulant les PHA sans toutefois accumuler des polyP sont également présentes. Ces cellules pourraient simplement être des OAP ayant vidé leur réserve de polyP en fin de phase anaérobie.

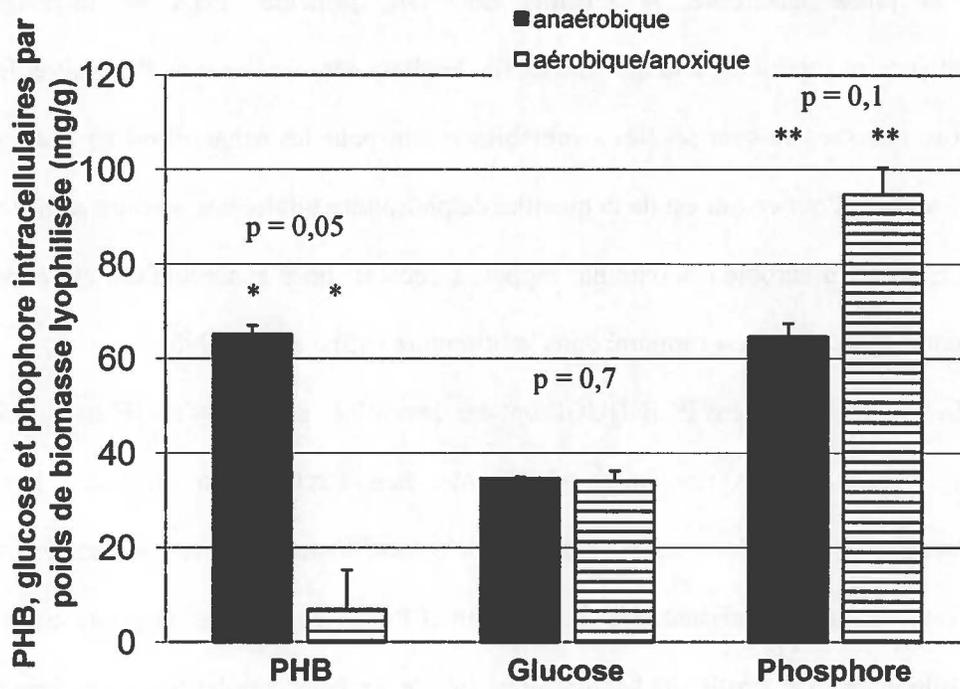


Figure 4.11 : Quantités intracellulaires de PHB, de glucose et de phosphore total pour l'Expérience IV du réacteur 1 (affluent piscicole au LARSA) pour le jour 140. n = 3 (trois par paramètres mesurées par condition expérimentale). (Les différences significatives ont été désignées par \* et \*\* pour les PHB et le phosphore, respectivement).

La figure 4.14 représente des amplifications PCR du gène codant pour le gène 16S de l'OAP *Candidatus Accumulibacter phosphatis*. Les amplifications ont été effectuées sur des échantillons pris aux jours 0, 21, 84 et 140. Bien qu'il soit impossible d'affirmer que les quantités d'ADN de *C. Accumulibacter phosphatis* soient significativement différentes entre les temps d'échantillonnages en raison des sources de variabilité de la PCR standard, la reproductivité de ce résultat (3 réplicats) ainsi que le contrôle dans les quantités d'ADN mises initialement nous permettent de remarquer une progression dans l'intensité de la bande. La plus grande intensité est remarquée au jour 140, moment où un échantillon a aussi été prélevé pour dériver la génothèque des gènes de l'ARNr 16S.

#### 4.5 Hybridations *in situ* avec sondes fluorescentes (FISH)

Afin de mieux caractériser la flore microbienne composant le biofilm déphosphatant, des expériences FISH ont été effectuées. Il s'agissait ici d'utiliser des sondes ciblant des groupes ou des espèces spécifiques susceptibles de se retrouver dans notre système.

La figure 4.15 montre que le biofilm d'eau douce avec un affluent synthétique provenant de l'Expérience II contenait des OAP grâce aux sondes PAO liées au fluorochrome CY3 (rouge) ciblant *Candidatus A. phosphatis*. La sonde qui donnait les meilleurs résultats était la PAO651. De plus, la sonde liée à la FITC (vert-jaune) ciblait les betaprotéobactéries, incluant *A. phosphatis*. Les zones couvertes par les deux types de sondes se chevauchent. Finalement, un colorant à acides nucléiques (Syto62) a été utilisé afin de visualiser l'ensemble des organismes présents dans le biofilm (bleu). Les zones des trois fluorochromes se sont juxtaposées presque parfaitement, produisant une image montrant des cellules très pâles (Fig. 4.15).

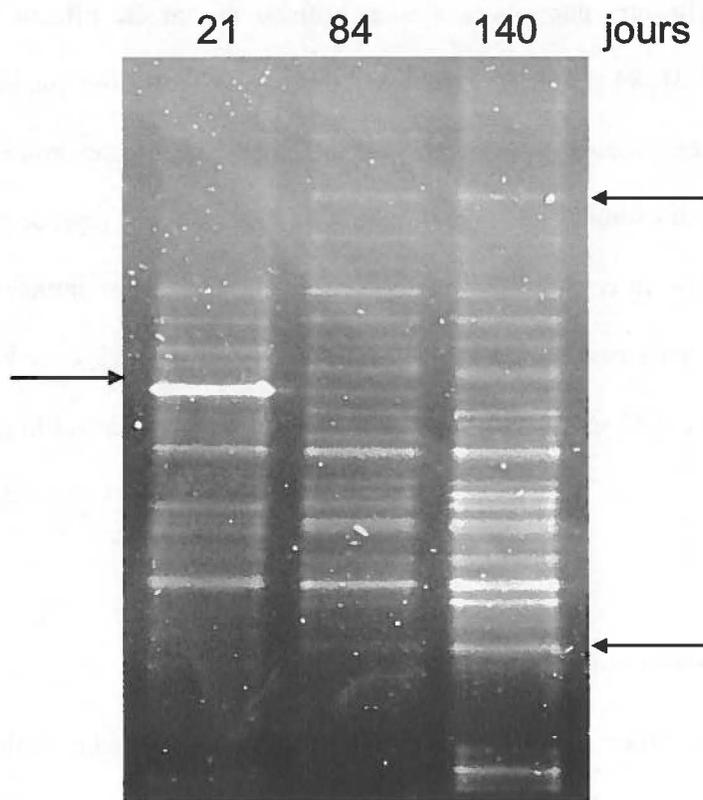


Figure 4.12 : Profil bactérien dérivé de PCR-DGGE sur trois échantillons provenant du réacteur déphosphatant un affluent piscicole.

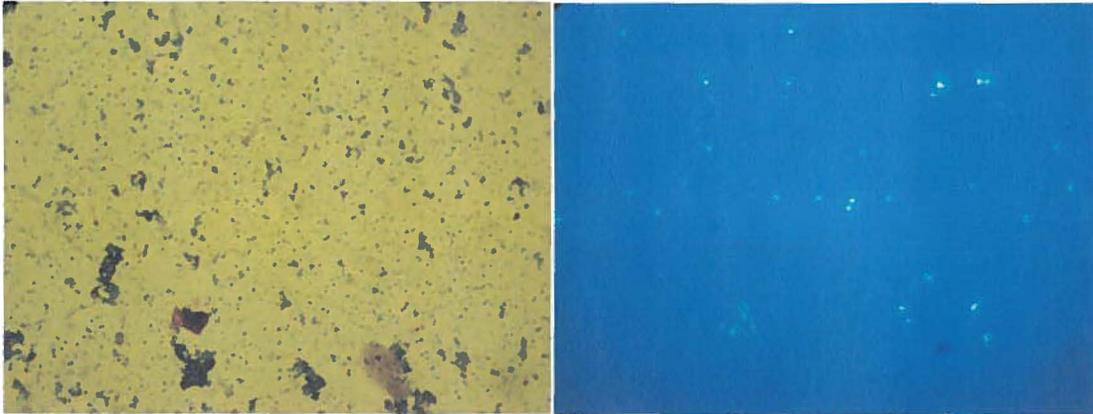


Figure 4.13 : Colorations de biofilm dispersé des réacteurs effectuant de la déphosphatation biologique en eau douce avec un affluent piscicole. L'image de gauche est le résultat de la coloration PHA (points noirs) alors que celle de droite est une coloration polyP avec DAPI (points verts). Le champ microscopique pour les deux images est le même et proviennent d'un échantillon en fin d'anaérobie. 1000 X Microscopie optique.

C- 0 21 84 140 M

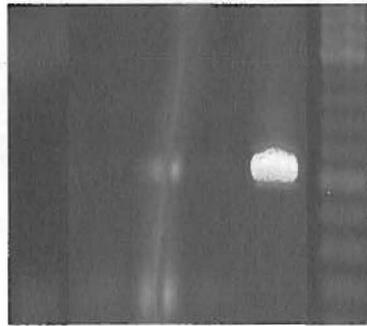


Figure 4.14 : Produit PCR spécifique ciblant les OAP pour l'échantillon des jours 0, 21, 84 et 140 de l'Expérience I. Le premier puits contenait un contrôle négatif. Les quatre échantillons sont des amplifications d'une partie du gène codant pour l'unité ribosomale 16S de *Candidatus A. phosphatis* et dans le 6<sup>e</sup> puits, un marqueur de poids moléculaire a été placé.

La figure 4.16 montre une autre partie du même biofilm sous l'angle des OAG. La sonde ciblant les gammaprotéobactéries est utilisée en a, tandis qu'une sonde liée à la FITC ciblant *Candidatus Competibacter phosphatis*, une espèce d'OAG, a été utilisée en b (Figure 4.20 a et b). Syto62 a été également utilisé comme colorant pour l'ensemble des acides nucléiques (Fig. 4.16 c). À l'instar de la figure 4.15, la figure 4.16 montre plusieurs zones où les trois images sont parfaitement juxtaposées (Fig. 4.16 d). Cependant, on remarque que pour plusieurs agglomérats de cellules, seuls la sonde ciblant les gammaprotéobactéries et le colorant à acides nucléiques sont présents. Ce résultat montre l'absence de *Candidatus C. phosphatis* dans cette partie du biofilm, mais la présence de gammaprotéobactéries.

Des images semblables ont été obtenues d'un échantillon provenant du réacteur utilisé au LARSA (Expérience IV) au jour 140. En effet, les proportions d'environ 33% des pixels d'images issues des deux systèmes étudiés par rapport aux pixels des bactéries appartenaient à *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (Fig. 4.17). Durant les expériences de FISH, on a remarqué que le biofilm était autofluorescent. En effet, des expériences sans sonde fluorescente ont montré des images où plusieurs bactéries apparaissaient très clairement suite à une excitation en microscopie confocale à balayage laser (Fig. 4.18).

Parmi les formes de cellules récurrentes, les amas en forme de tétrades sont nombreux dans les figures 4.15 à 4.18. Dans le cas de cette dernière, presque toutes les cellules sont disposées en tétrades. Puisqu'il s'agissait d'une expérience sans sonde d'hybridation, on peut émettre l'hypothèse que ces bactéries sont autofluorescentes. Elles sont également nombreuses dans les images 4.15 et 4.16. Afin de déterminer la présence de bactéries autofluorescentes, des PCR ciblant le gène codant pour le 16S de certains groupes de bactéries autofluorescentes ont été effectuées (voir Tableau 3.2 des amorces dans la section Matériel et Méthodes). Ainsi des PCR ciblant les archaebactéries, les cyanobactéries (Nübel *et al.*, 1997) ainsi que les bactéries pourpres

phototropiques, les bactéries vertes sulfureuses et non sulfureuses et le genre *Heliobacter* (Archenbach *et al.*, 2001) ont été effectuées afin de s'assurer que tous les groupes bactériens autofluorescents aient été couverts. Aucune des amorces n'a permis l'amplification de l'une ou l'autre des séquences ciblées, et ce, malgré des expériences à l'aide d'un appareil à gradient de température et à plusieurs concentrations d'amorces et d'ADN pour la réaction PCR. Les conditions optimales d'où les séquences des amorces ont été tirées (Nübel *et al.*, 1997 ; Archenbach *et al.*, 2001) ont également été testées sans succès.

Il est à remarquer que des amas de tétrades sont les plus autofluorescents dans le biofilm (Fig. 4.18). Bien que des tétrades ont récemment été identifiées dans des boues activées effectuant de la déphosphatation biologique comme appartenant au genre *Defluvicoccus* (Ahn *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007), il n'existe aucune étude disant qu'elles auraient des capacités autofluorescentes. Ces bactéries sont surtout associées aux bactéries compétitrices des OAP, donc aux OAG.

#### **4.6 Composition de la flore bactérienne de la biomasse déphosphatante**

Trois génothèques de clones du gène codant pour l'unité ribosomale 16S ont été effectuées afin de déterminer les espèces en présence dans les réacteurs selon différentes conditions, chacune correspondant à une des trois expériences en eau douce (II, III et IV). Au total, 240 clones ont été criblés pour des profils à l'enzyme de restriction *AfaI*, soit 80 clones par génothèque. De ce nombre, 216 clones ont été séquencés. Ces séquences ont été comparées entre elles et 106 ont été déterminées comme différentes et ont été comparées aux bases de données

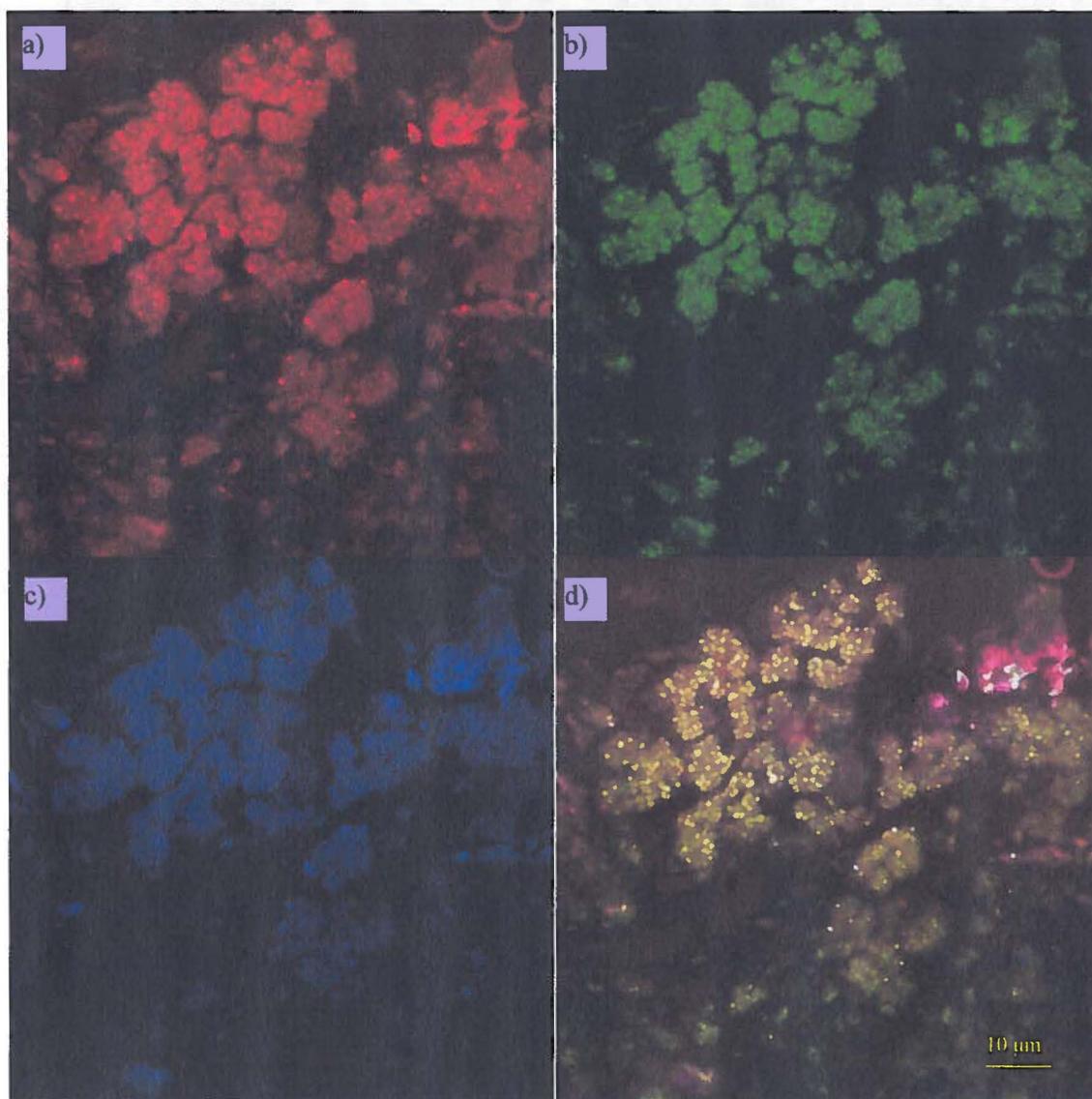


Figure 4.15 : Images d'un même champ microscopique du biofilm provenant d'un système de déphosphatation avec un affluent artificiel (Expérience II) en hybridation *in situ* avec sondes fluorescentes. Le panneau a est le résultat d'une sonde ciblant *A. phosphatis* liée au CY3. Le panneau b est vu grâce à l'hybridation d'une sonde ciblant les betaprotéobactéries lié à la FITC. Le panneau c est le résultat de l'utilisation du Syto62 (ciblant l'ARN et ADN). Le panneau d est une composition des images a, b, c fusionnées ensemble.

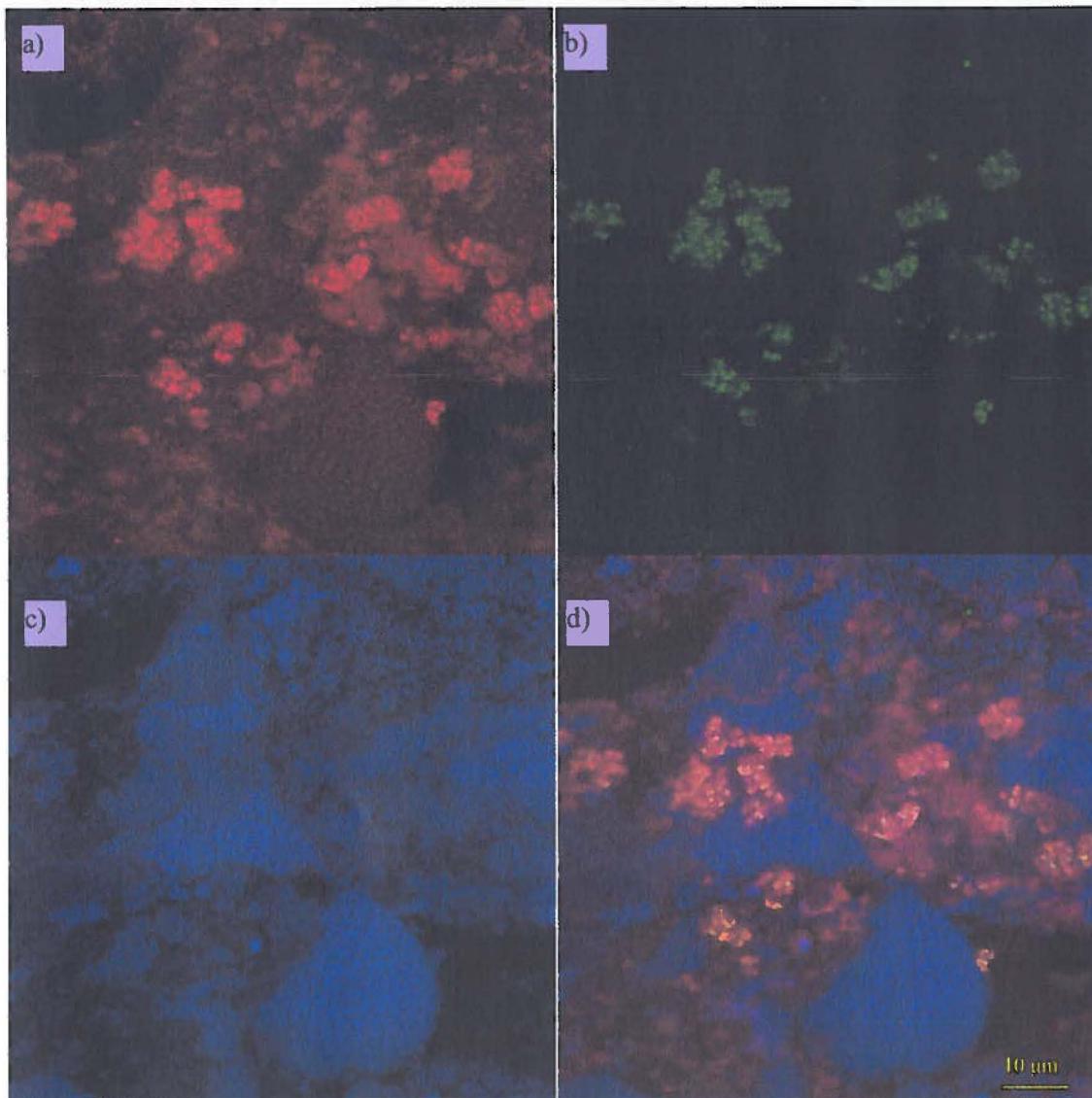


Figure 4.16 : Images d'un même champ microscopique du biofilm provenant d'un système de déphosphatation avec un affluent artificiel (Expérience III) en hybridation *in situ* avec sondes fluorescentes. Le panneau a est vue grâce à l'hybridation d'une sonde ciblant les Gammaprotéobactéries liée à CY3. Le panneau b est le résultat d'une sonde ciblant *C. phosphatis* liée au FITC. Le panneau c est le résultat de l'utilisation du Syto62 (ciblant l'ARN et ADN). Le panneau d est une composition des images a, b, c fusionnées ensemble.

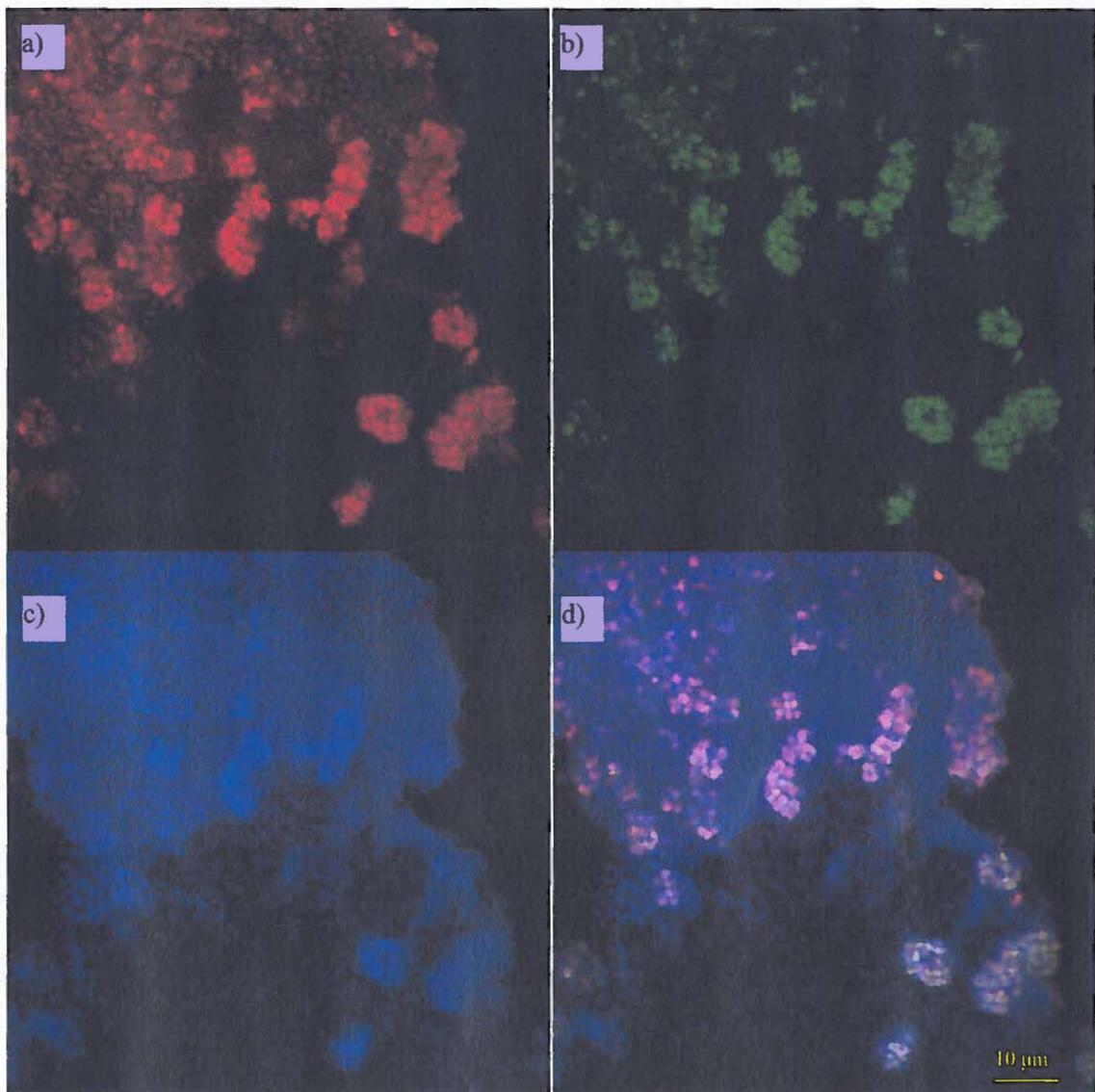


Figure 4.17: Image d'un champ microscopique du biofilm provenant d'un système de déphosphatation avec un affluent d'un bassin d'aquaculture (Expérience IV) en hybridation *in situ* avec sondes fluorescentes. L'image est vue grâce à l'hybridation d'une sonde ciblant les Betaprotéobactérie liée à CY3. Le panneau b est le résultat d'une sonde ciblant *Candidatus A. phosphatis* liée au FITC. Le panneau c est le résultat de l'utilisation du Syto62 (ciblant l'ARN et ADN). Le panneau d est une composition des images a, b, c fusionnées ensembles.

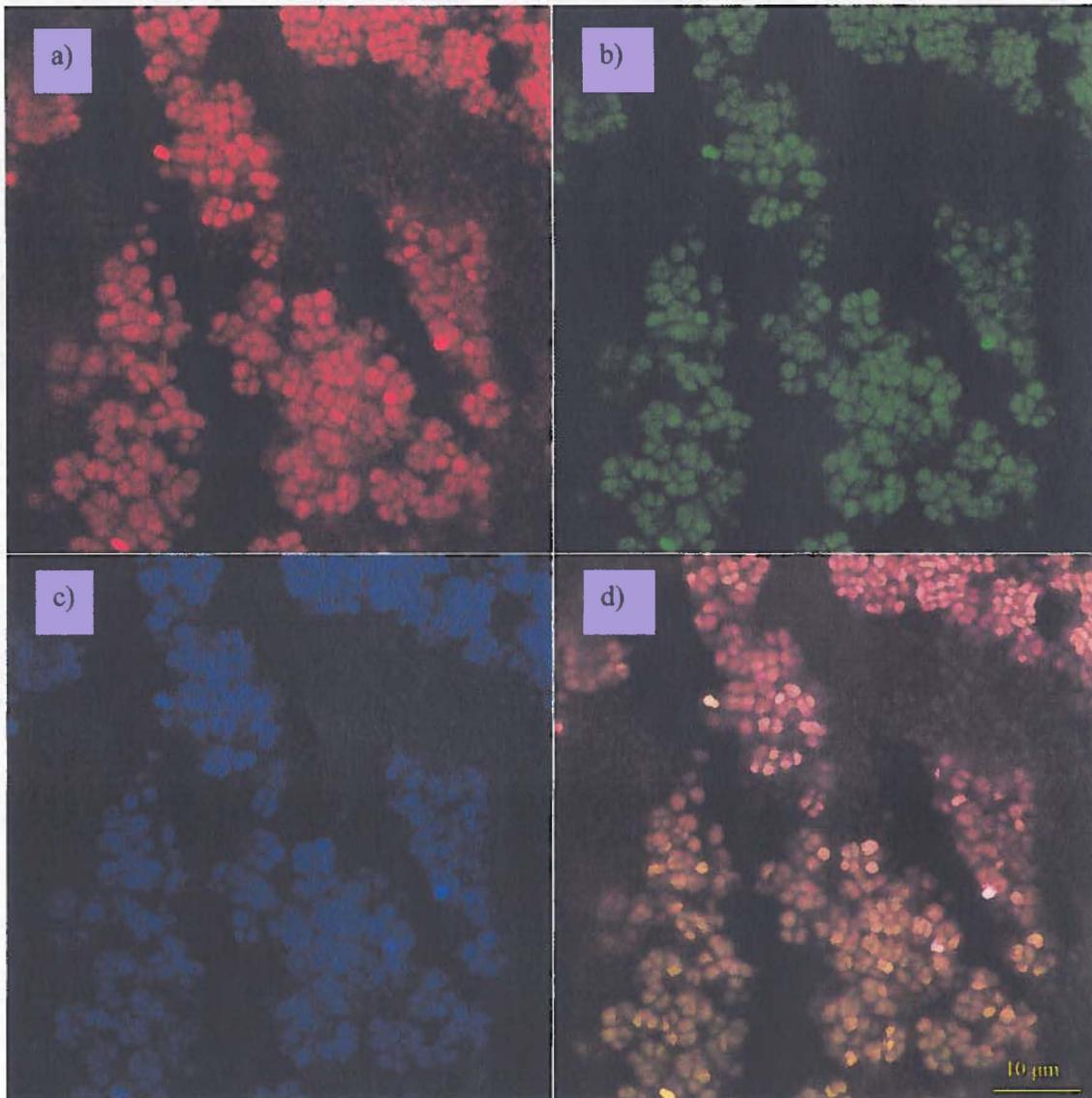


Figure 4.18 : Images d'un même champ microscopique du biofilm provenant d'un système de déphosphatation avec au cours de l'Expérience IV. Aucune sonde fluorescente n'a été utilisée pour cette image. Les panneaux a, b et c ont été excités à des longueurs d'onde de 568 nm, 488 et 638 nm, respectivement. Le panneau d est une composition des images a, b, c fusionnées ensemble.

afin de déterminer leur affiliation la plus probable avec les lignées bactériennes connues. Ce résultat a pu être constaté grâce à l'alignement des séquences et la comparaison avec la base de données de ARB. Le rééchantillonnage a été effectué par le logiciel ARB afin de confirmer ces 106 affiliations. Ces 106 séquences différentes seront éventuellement déposées dans une base de données publique. Un classement des profils *AfaI* combiné aux séquences a permis de faire une quantification sommaire des lignées bactériennes présentes (Tableau 4.1). La lignée des Bétaprotéobactéries a été la plus importante en nombres de clones (77), et en nombre de séquences différentes (47). La lignée des Gammaprotéobactéries a représenté une quantité de clones équivalant (76), mais a produit un nombre moindre de séquences distinctes (21). Les Alphaprotéobactéries, troisième groupe en importance quant au nombre de clones obtenus (35) présentaient 20 séquences différentes. Les autres lignées étaient moins représentées au point de vue du nombre de clones (6 à 8) et du nombre de séquences distinctes.

Tableau 4.1 : Nombres de clones associés à chaque groupe bactérien et nombre de séquences différentes pour chacun de ces groupes.

	Nombre de séquences différentes	Nombre de clones obtenus
<b>Alphaprotéobactéries</b>	<b>20</b>	<b>35</b>
<b>Betaprotéobactéries</b>	<b>47</b>	<b>77</b>
<b>Deltaprotéobactéries</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
<b>Gammaprotéobactéries</b>	<b>21</b>	<b>76</b>
<b>Chloroflexi</b>	<b>6</b>	<b>8</b>
<b>Acidobacteries</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
Candidate Division OP11	2	7
<b>Total</b>	<b>106</b>	<b>216</b>

Le tableau 4.2 illustre la classification des séquences/clones par rapport à l'origine des séquences dans les banques de données auxquelles celles-ci étaient le plus rapprochées. Plus de la moitié des clones (122) ont été associés à des séquences provenant de systèmes effectuant la déphosphatation biologique. La même quantité de clones (123) ont été apparentés à des séquences d'organismes requérant des successions de phases anaérobie et aérobie. Une très grande majorité des clones (181) ont été associés à des séquences provenant de systèmes en boue activée, alors qu'à peine 13% (27) des clones ont été observés en biofilm. Trente des 216 clones ont été associés à des séquences provenant de milieux à salinité élevée.

Tous les clones provenant des Alphaprotéobactéries ont été associés à des systèmes à boue activée, dont 13 liés à des systèmes permettant une alternance entre les phases anaérobie et aérobie.

Parmi les 77 clones associés aux Bétaprotéobactéries, une large portion (44) a été associée aux systèmes EBPR. Une portion similaire (46) a aussi été associée à divers systèmes alternant les phases anaérobie et aérobie. Une grande majorité (61) de ces clones avait des affinités avec des clones retrouvés dans des systèmes en boues activées. Les autres catégories ont aussi des représentants parmi les Bétaprotéobactéries, mais leur quantité suggère que leurs importances dans ces aspects de la biomasse sont secondaires.

Pour ce qui est des clones associés aux Deltaprotéobactéries (6), ceux-ci ont été en majeure partie associés à des systèmes en boues activées et à des biofilms. Les clones appartenant aux Gammaprotéobactéries (76) ont été pour la plupart associés à la déphosphatation biologique et à des systèmes alternant les phases anaérobie et aérobie (63 pour les deux catégories). Aussi, la vaste majorité (69) des clones de Gammaprotéobactéries étaient liés à des systèmes en boues activées. Pour ce qui est des clones appartenant au groupe des Chloroflexi (8), seules les catégories des systèmes en boues activées (4) et d'anaérobie stricte (4) sont dignes de mention.

Les sept séquences de 16S ribosomales appartenant au groupe des Acidobacteria ont été associées à des espèces anaérobies préférant une salinité élevée et ayant la capacité de former des biofilms. Finalement, les séquences des bactéries non cultivables classées dans le groupe OP11 (7) sont également toutes liées à des systèmes en boues activées de même qu'à des salinités élevées. Les clones du Groupe OP11 ont aussi tous été associés à des séquences de bactéries capables d'ANAMMOX (ANAerobic AMMonium OXidation).

Tableau 4.2: Nombre de clones associés aux divisions bactériennes et avec l'origine de séquences affiliées les plus rapprochées dans les banques de données.

	EBPR	Boue activée	Dénitification / Nitrification	Eau à salinité élevée	Eau douce	ANAMMOX	Anaérobie stricte	Aérobie stricte	Anaérobie et aérobie	Biofilm	Nombre de clones pour chaque groupe bactérien
Alphaprotéobactéries	13	35	2	2	10	0	6	4	13	2	35
Betaprotéobactéries	44	61	5	3	2	3	6	1	46	10	77
Deltaprotéobactéries	1	5	1	0	4	0	0	0	1	5	6
Gammaprotéobactéries	63	69	2	11	0	0	0	0	63	2	76
Chloroflexi	1	4	0	0	0	1	4	1	0	1	8
Acidobacteria	0	0	0	7	0	0	7	0	0	7	7
OP11	0	7	0	7	0	7	ND	ND	ND	ND	7
<b>Total</b>	<b>122</b>	<b>181</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>23</b>	<b>6</b>	<b>123</b>	<b>27</b>	<b>216</b>

#### 4.7 Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques ont été effectuées avec les 216 clones séquencés, dont 106 séquences étaient différentes, et provenaient de trois génothèques de clones. Les clones issus de l'Expérience II (eau douce, non optimisée) ont été nommés par les lettres SBxx (xx étant un ou deux chiffres). Les clones provenant de l'Expérience III (eau douce, optimisé) ont été nommés par les lettres SBB2.xx (xx étant un ou deux chiffres). Les clones provenant de l'Expérience IV (pisciculture) ont été nommés par les lettres SBLxxx (xxx étant un à trois chiffres). Les différentes analyses phylogéniques ont été faites par lignées bactériennes : les alphaprotéobactéries, les bêtaprotéobactéries, les deltaprotéobactéries, les gammaprotéobactéries, les chloroflexi, les acidobactéries et les non cultivables OP11.

Parmi les clones appartenant aux Alphaprotéobactéries, plusieurs ordres sont représentés tels les Caulobactérales, les Rhizobiales, les Rhodobactérales et les Rhodospirales (Fig. 4.19). Sept clones se distribuent dans l'ordre des Caulobactérales réparties dans deux séquences différentes. Pour ce qui est des Rhizobiales, seules deux séquences sont représentées, mais cette fois trois clones ont été retrouvés dans ce sous-groupe. Les Rhodobactérales sont les plus importants en nombre de clones et de séquences avec huit clones et six séquences. On retrouve sept clones dans les Rhodospirales se distribuant dans trois séquences. Finalement, neuf clones ont été retrouvés dans des ordres où les représentants n'étaient pas en nombre suffisant pour représenter les ordres dans la colonne de droite de l'arbre. Ces derniers se distribuent dans sept séquences différentes.

Dans l'arbre des alphaprotéobactéries, deux regroupements de clones ont été retrouvés. Les séquences SBL4, SBL8, SBL63, SBL79, SBL92, SBL103 et SB12 ont été associés aux

Rhodospirales. De plus, ces séquences sont toutes associées à des bactéries provenant de systèmes de déphosphatation et, plus particulièrement, à des bactéries ressemblant à *Defluviicoccus vanus*, une espèce de coque formant des tétrades (Ahn *et al.*, 2007). Les analyses de FISH ont montré ce genre de formations en grande quantité dans l'Expérience IV (Figures 4.17 et 4.18).

Pour les Bétaprotéobactéries (Fig. 4.20 a et b), la plupart des clones (71) et des séquences (43) différents se distribuent dans deux ordres : les Rhodocyclales et les Burkholderiales. L'ordre des Rhodocyclales est le plus important avec 41 clones et 26 séquences différentes. Les Burkholderiales arrivent en deuxième avec 30 clones et 17 séquences. Aussi, il est important de constater que des représentants des trois systèmes de déphosphatation biologique étudiés dans le cadre de cette étude sont représentés dans cet ordre. C'est en effet parmi les Rhodocyclales qu'on retrouve les OAP. Les résultats de l'étude métagénomique sur *Candidatus Accumulibacter phosphatis* sont présentés en vert (Fig. 4.20). Bien qu'aucune séquence ne soit totalement alignée avec cette dernière, les séquences SB21, SB25, SB69 et SB82 sont proches phylogénétiquement (similaires à plus de 98 % d'identité). Aussi, les clones SBL65 et SB27 appartiennent à la même fourche (98% d'identité). Il faut aussi noter la présence de beaucoup de séquences provenant de systèmes EBPR, mais pour la plupart il s'agit de traitement des eaux usées par boues activées. Parmi les espèces obtenues, *Dechloromonas* sp., qui est surtout présente dans des milieux riches en chlorates à cause de sa capacité à les réduire, demeure fréquente dans les systèmes de déphosphatation. Pour sa part, *Quadricoccus australiensis* est une espèce bactérienne ayant été identifiée comme étant un OAP (Maszenan *et al.*, 2002). Donc, le clone SBB2.63 demeure un candidat sérieux pour expliquer l'activité déphosphatante observée dans le cadre de cette étude. Pour sa part, *Azospira restricta* est une bactérie associée à la fixation de l'azote et au stockage de PHA. Les clones associés à *A. restricta* (SB5, SB9, SBB2.39, SBL55, SBL68, SBL 82), bien

qu'ils soient plus proches des bactéries non cultivables issues de systèmes de déphosphatation, pourraient être considérés pour le stockage des PHA.

Pour ce qui est du regroupement des Burkholderiales, les espèces retrouvées dans l'arbre phylogénétique sont également pertinentes. En effet, certaines bactéries du genre *Acidovorax* auraient la capacité d'accumuler des PHA (Hiraishi *et al.*, 2003). La même chose aurait été observée pour les certaines bactéries appartenant aux genres *Hydrogenophaga* (Young-Ok *et al.*, 2000) et *Methylibium* (Rohwerder *et al.*, 2010). Le genre *Thiobacter* est connu pour sa capacité à oxyder les sulfures (Hirayama *et al.*, 2005). Pour ce qui est de *Rubrivivax gelatinosus*, il est intéressant de savoir qu'elle aurait des capacités photosynthétiques, donc des pigments photosynthétiques pouvant potentiellement autofluorescer (Steunou *et al.*, 2004). Les autres espèces appartenant aux Burkholderiales sont des bactéries ayant été retrouvées dans des systèmes de traitement des eaux.

La plupart des clones appartenant aux Deltaprotéobactéries sont relativement proches des bactéries non cultivables (Fig. 4.21). Ils s'apparentent soit à *Haliangium tepidum* de l'ordre des Myxococcales, soit à *Bdellovibrio bacteriovorus* de l'ordre des Bdellovibrionales. Le genre *Bdellovibrio* compte des espèces de petite taille ayant la particularité de parasiter d'autres bactéries.

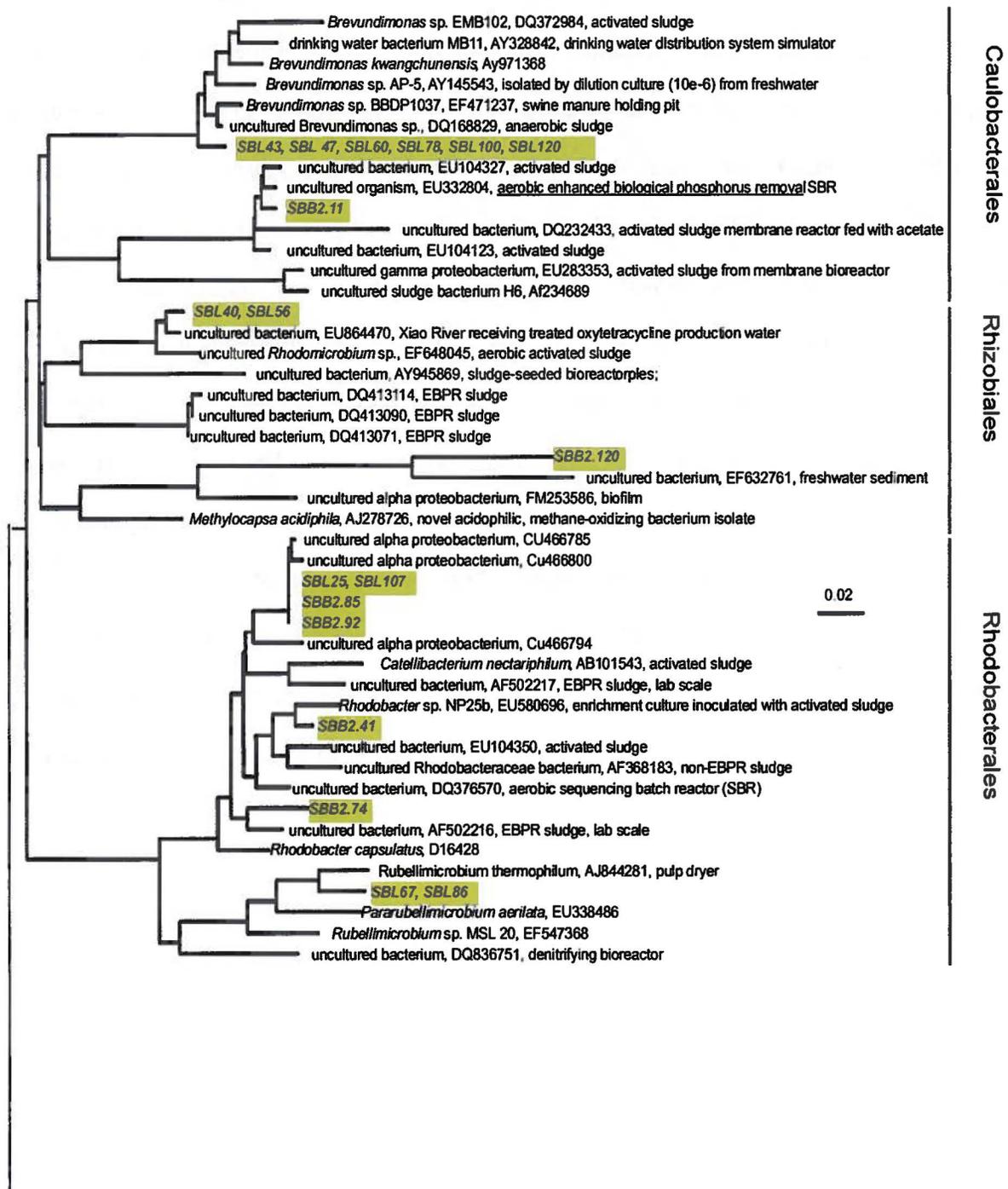
Un arbre phylogénétique a aussi été construit pour les clones associés aux Chloroflexi. Les huit clones de Chloroflexi ne représentaient en réalité que six séquences (Fig. 4.22). Deux de ces clones semblent avoir une certaine similitude avec l'ordre des Planctomycetales (SBL113, SBL26). Les autres clones ont été associés à des Chloroflexi non cultivables retrouvés dans divers milieux et conditions.

L'arbre des Gammaprotéobactéries est le second en importance tant au nombre de clones (76) qu'à la quantité des séquences différentes (21) qu'on y retrouve. La particularité des clones

de ce regroupement est que 41 du total des clones présentent de grandes similitudes (plus de 98 %) avec les séquences de *Candidatus Competibacter phosphatis* (Fig. 4.23). Hormis ces 41 clones, 11 clones représentant sept séquences différentes ont également été associés avec cet OAG. Les 24 autres clones (13 séquences) ont été associés à des genres de l'ordre des Xanthomonadales. Neuf clones présentent des homologies avec le genre *Pseudoxanthomonas*, alors que deux autres ressemblent davantage au genre *Aquimonas*. Plusieurs séquences se divisaient entre deux regroupements de cinq (SBL39, SB41, SBB2.86, SBB2.33 et SBL41) et six (SB5, SBL62, SBL80, SBL87, SBL90, SBB2.28) clones. SBL119 ressemblait davantage au genre *Xanthomonas* (environ 85 % d'homologie). Un peu comme leur cousin *Pseudomonas*, les genres *Pseudoxanthomonas* et *Xanthomonas* sont constitués causant parfois des infections ou produisant des biosurfactants. À l'instar de *Pseudomonas* également, ces bactéries sont ubiquitaires, à cause de leur facilité d'adaptation aux conditions auxquelles elles sont soumises.

Les sept clones appartenant aux Acidobactéria forment un regroupement (Fig. 4.24). Les similitudes entre les clones ou avec les séquences d'espèces connues sont faibles. Les sept clones associés aux Candidates Division OP11 forment également un regroupement, mais les similitudes entre eux sont fortes (Fig. 4.25). Ces clones sont associés à la séquence d'une bactérie provenant du traitement des eaux usées faisant de l'ANAMMOX, qui est l'oxydation de l'ammonium en anaérobie.

Figure 4.19 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Alphaprotéobactéries. Les clones provenant des réacteurs du Biodôme sont identifiés par SBXX et SBB2.XX et ceux du réacteur au LARSA SBLXX. Les séquences des banques de données avec leur numéro d'accèsion (GenBank) ainsi que des informations sur leur origine proviennent des analyses faites avec ARB.



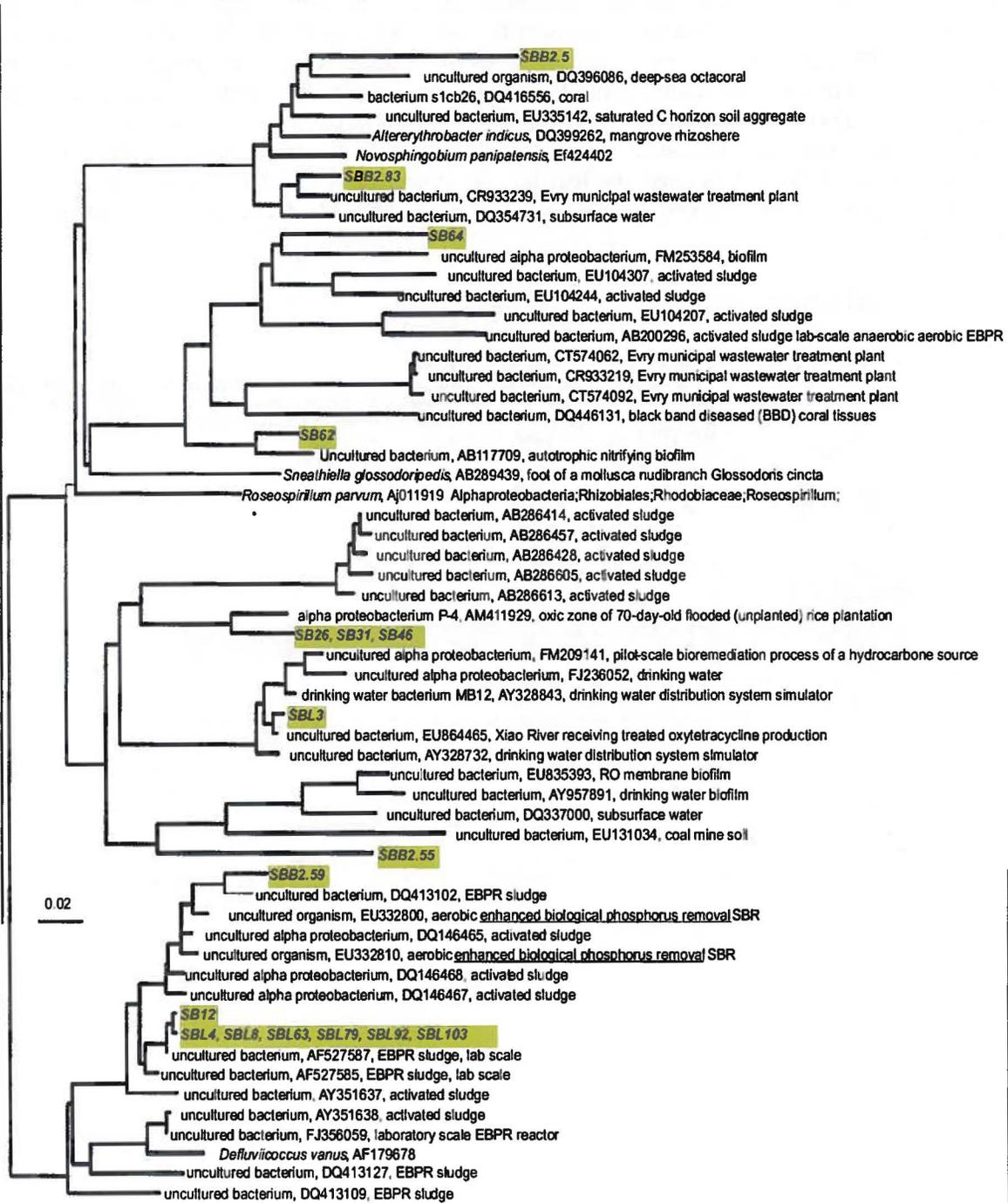
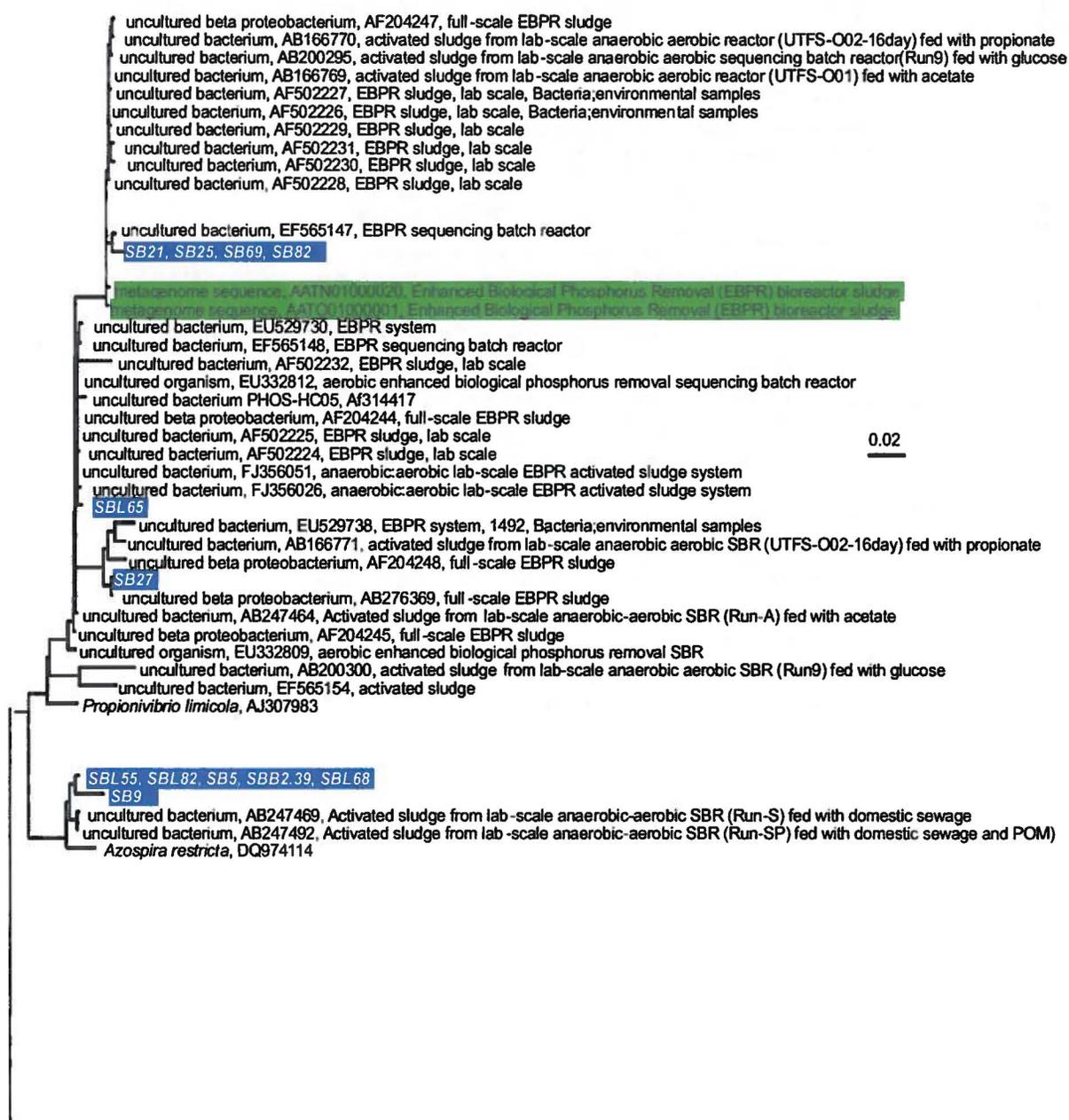
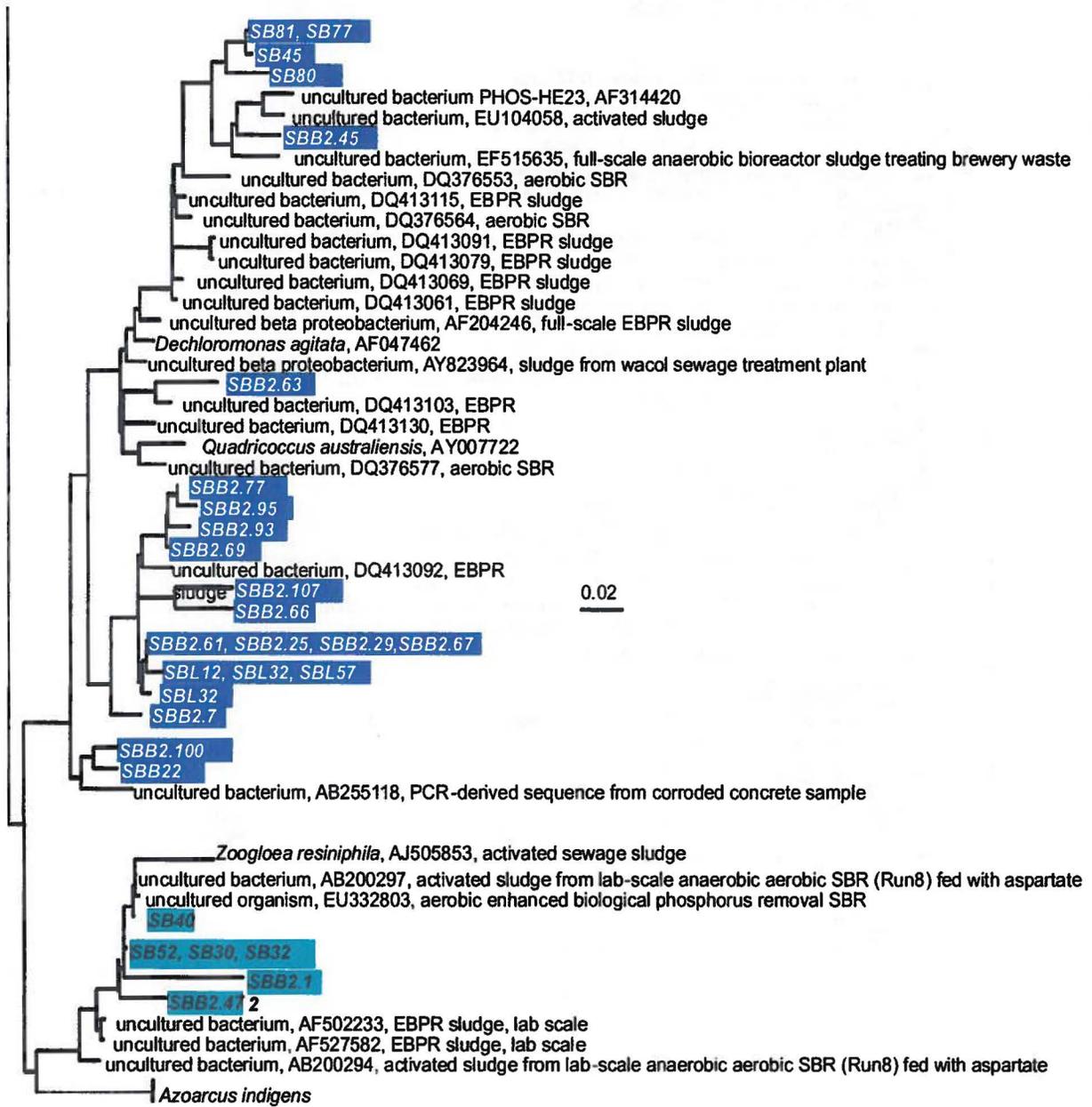


Figure 4.20 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Betaprotéobactéries. Les clones provenant des réacteurs du Biodôme sont identifiés par SBXX et SBB2.XX et ceux du réacteur au LARSA SBLXX. Les séquences des banques de données avec leur numéro d'accension (GenBank) ainsi que des informations sur leur origine proviennent des analyses faites avec ARB. L'arbre est divisé en deux sections : la section a) des Rhodocyclades et la section b) incluant les Burkholderiales ainsi que le restant des Betaprotéopactéries. Certaines espèces identifiées et séquences y sont représentées ainsi que leur numéro d'accension sur Genbank et leurs origines. Les séquences identifiées en vert correspondent à la séquence de *Candidatus Accumulibacter phosphatis*.

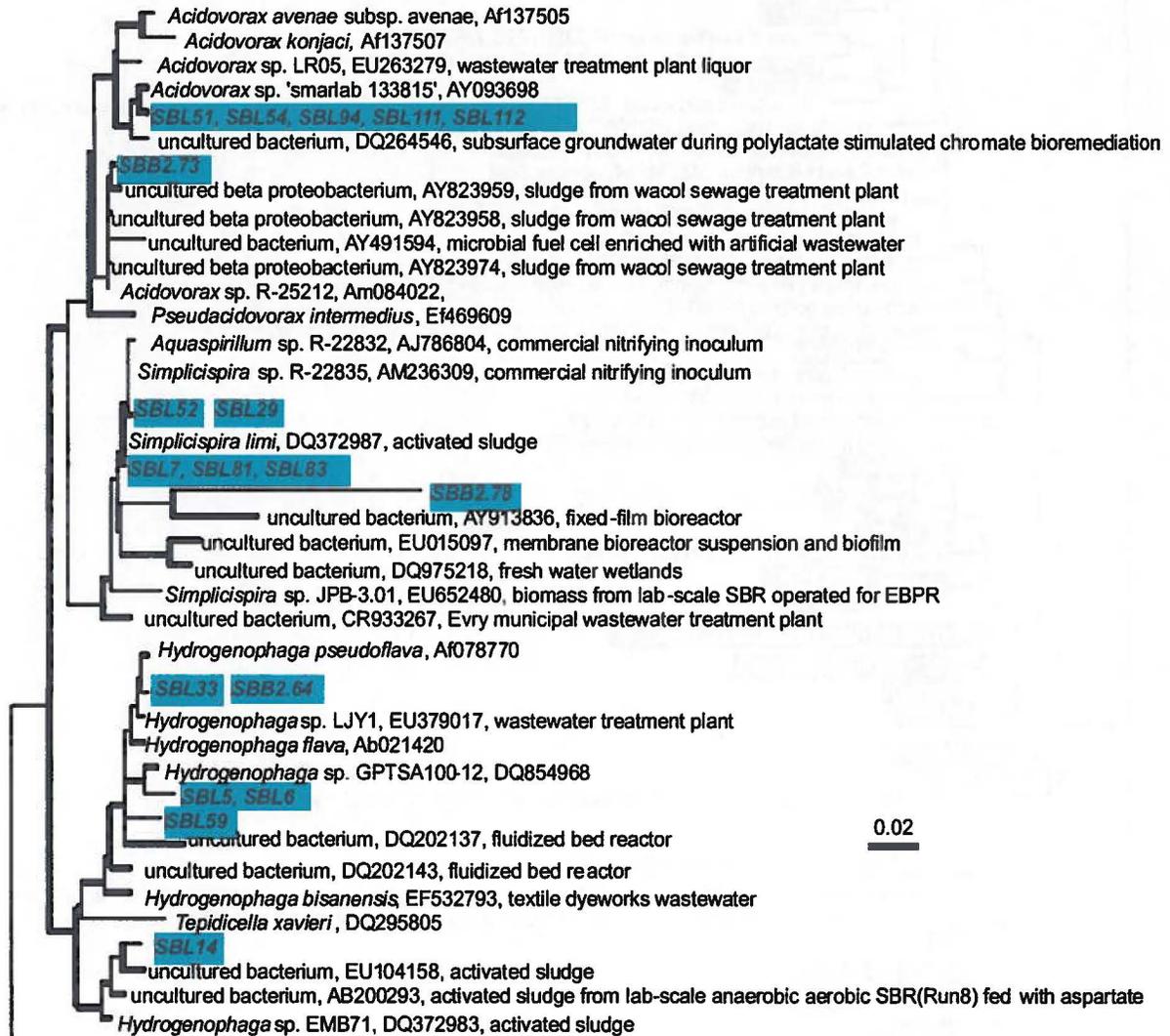
### a) Rhodocyclales

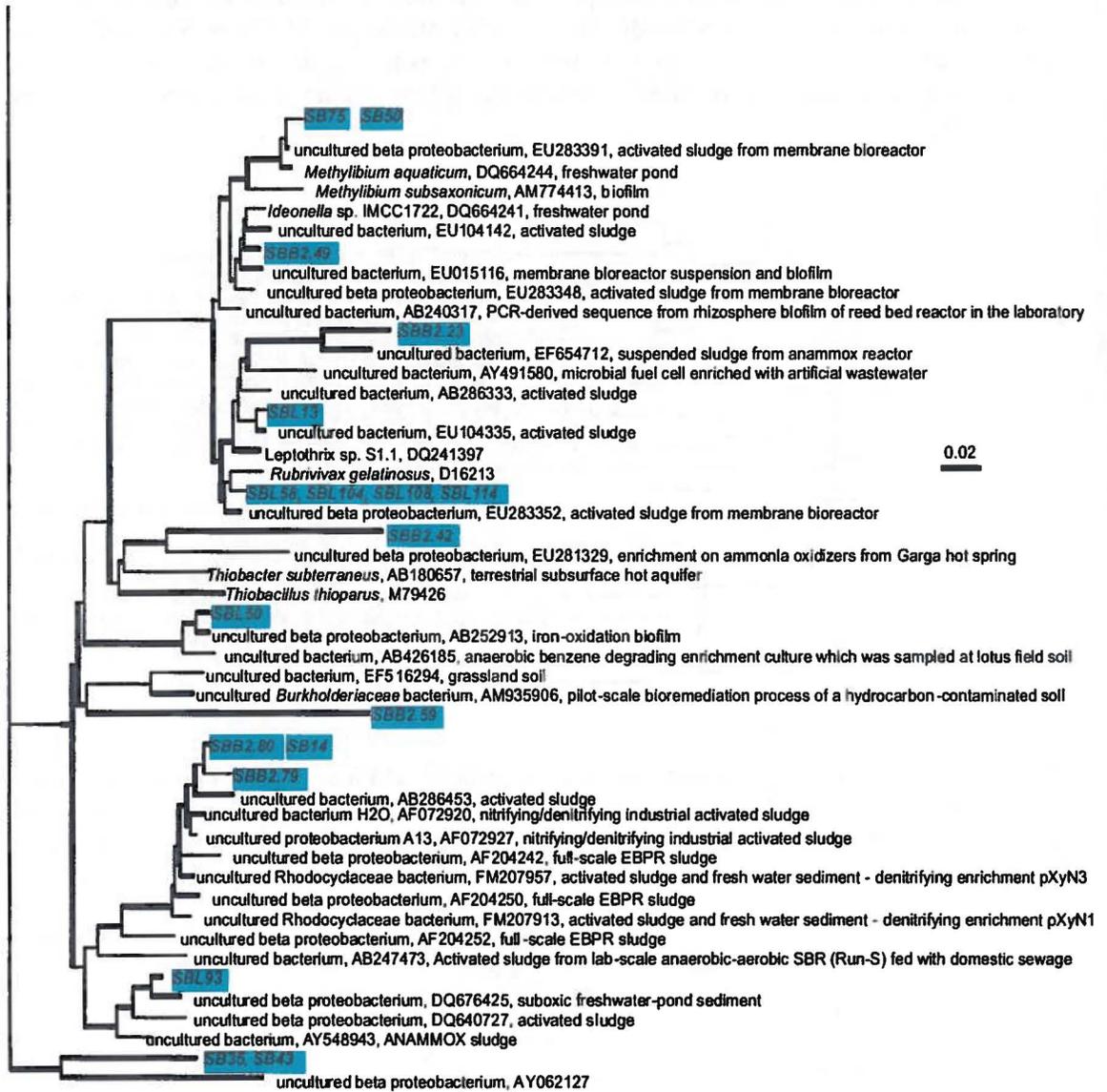


## a) Rhodocyclales



## b) Burkholderiales





Burkholderiales

Figure 4.21 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Deltaprotéobactéries. Les clones provenant des réacteurs du Biodôme sont identifiés par SBXX et SBB2.XX et ceux du réacteur au LARSA SBLXX. Les séquences des banques de données avec leur numéro d'accèsion (GenBank) ainsi que des informations sur leur origine proviennent des analyses faites avec ARB.

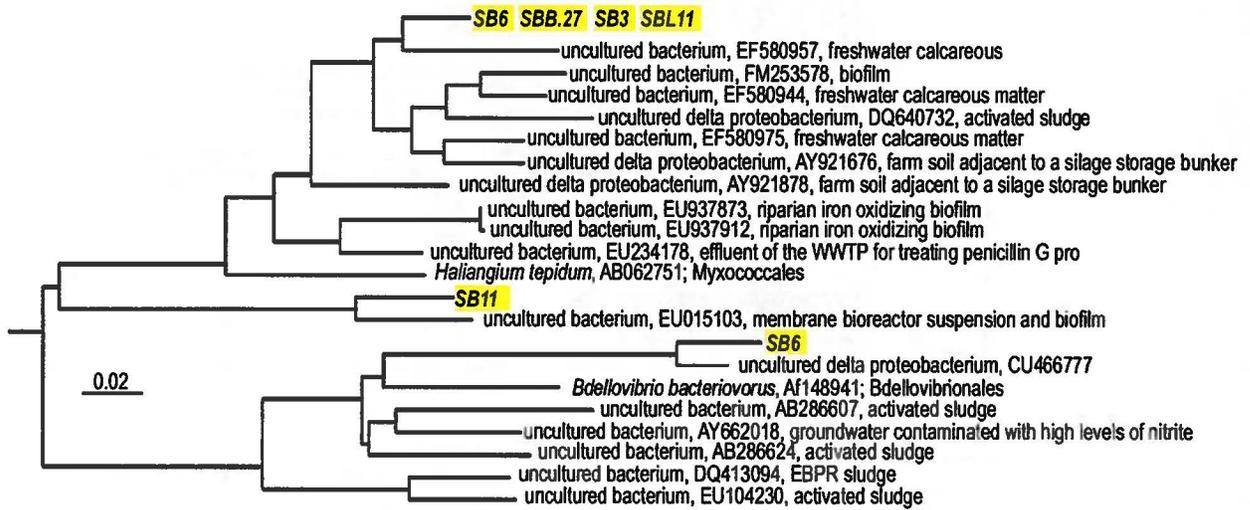
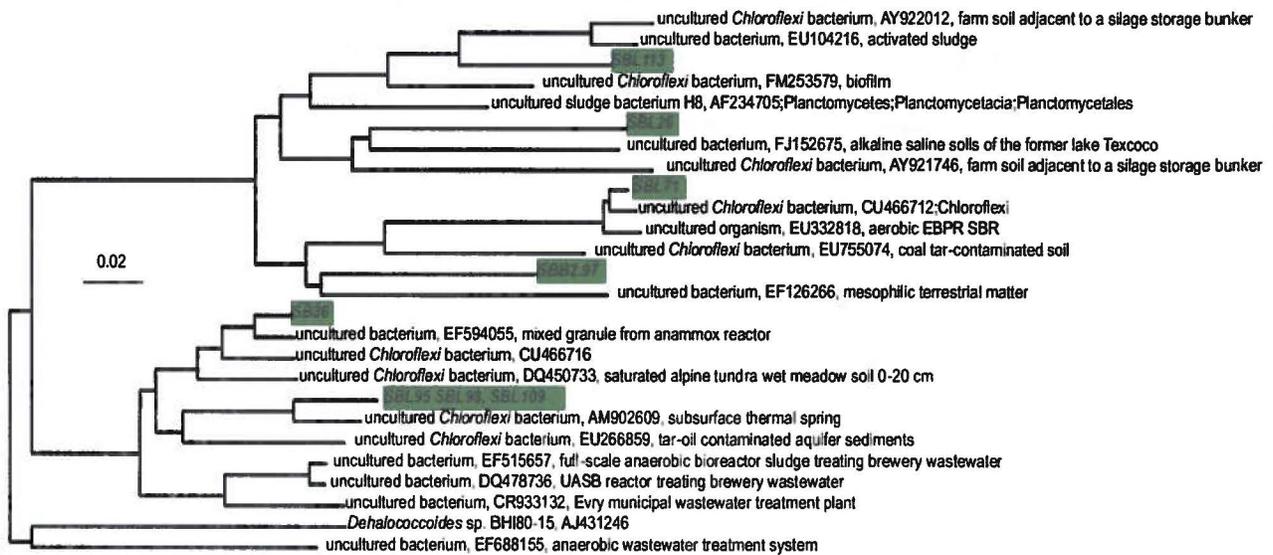
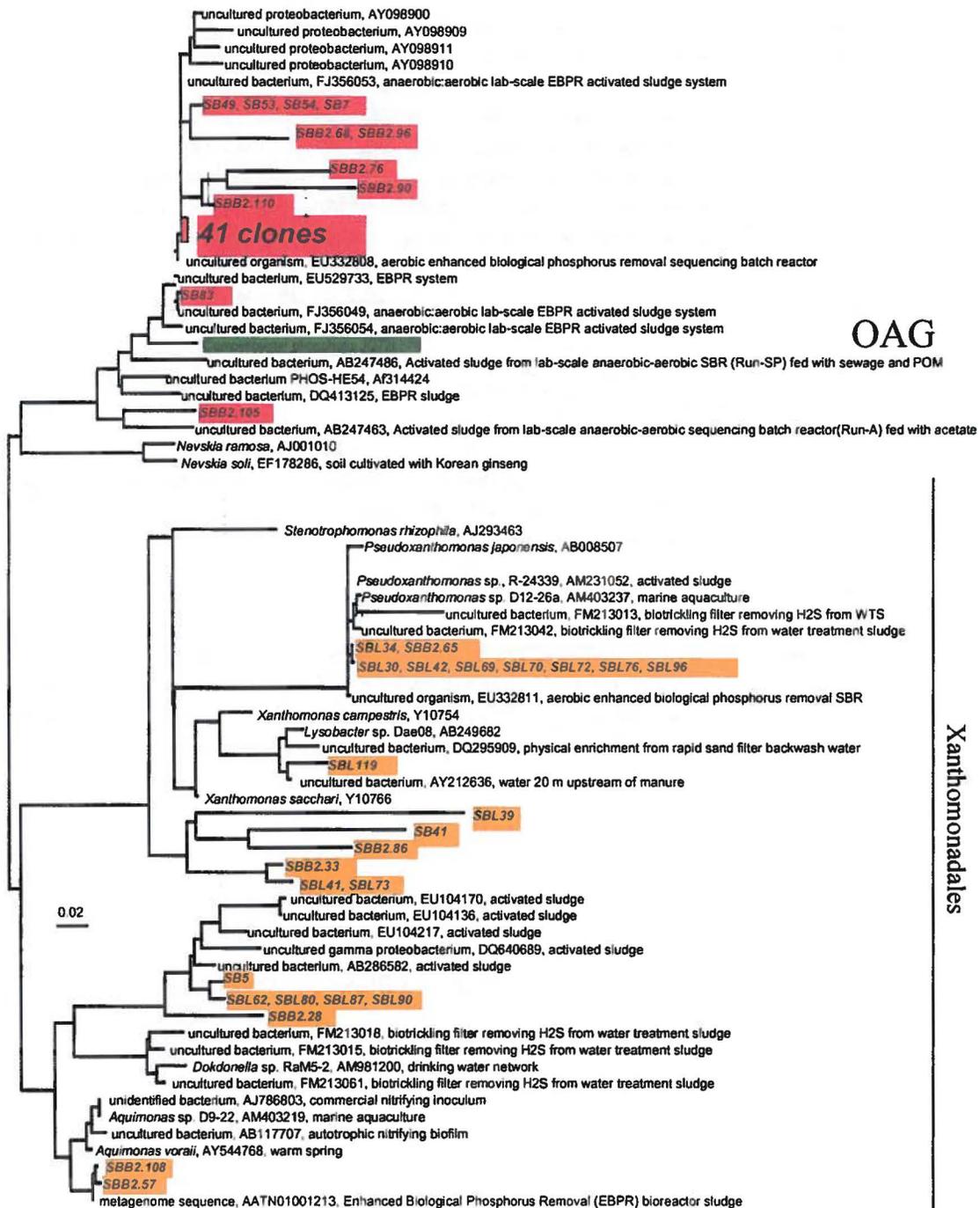


Figure 4.22 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Chloroflexi. Les clones provenant des réacteurs du Biodôme sont identifiés par SBXX et SBB2.XX et ceux du réacteur au LARSA SBLXX. Les séquences des banques de données avec leur numéro d'accèsion (GenBank) ainsi que des informations sur leur origine proviennent des analyses faites avec ARB.





Gammaprotéobactérie

Xanthomonadales

Figure 4.23 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Gammaprotéobactéries. Les clones provenant des réacteurs du Biodôme sont identifiés par SBXX et SBB2.XX et ceux du réacteur au LARSA SBLXX. Les séquences des banques de données avec leur numéro d'accèsion (GenBank) ainsi que des informations sur leur origine proviennent des analyses faites avec ARB.

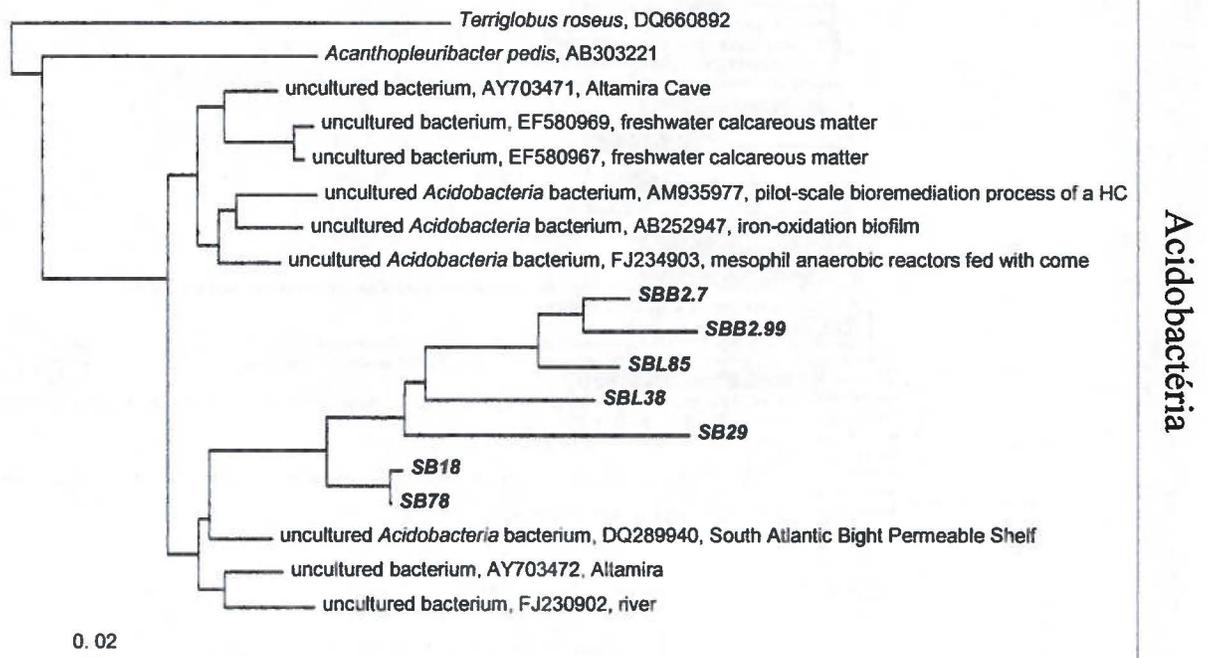


Figure 4.24 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Acidobactéria. Les clones provenant des réacteurs du Biodôme sont identifiés par SBXX et SBB2.XX et ceux du réacteur au LARSA SBLXX. Les séquences des banques de données avec leur numéro d'accèsion (GenBank) ainsi que des informations sur leur origine proviennent des analyses faites avec ARB.

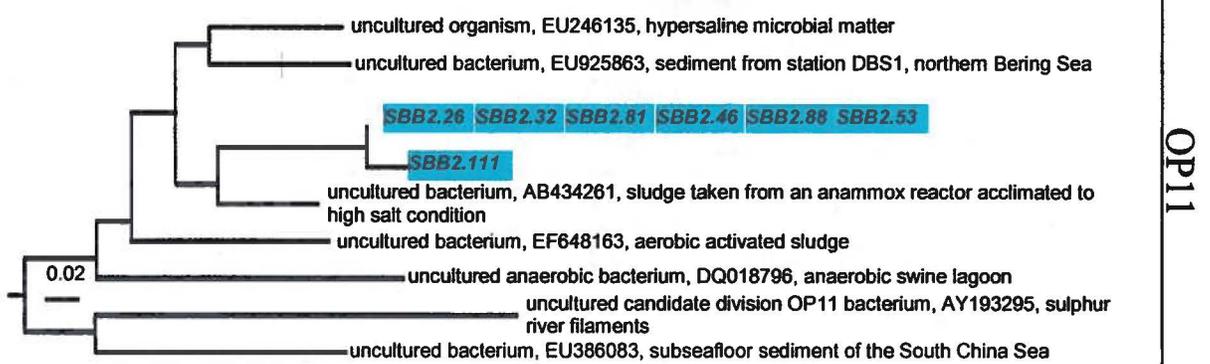


Figure 4.25 : Analyse phylogénique des séquences affiliées aux Candidates OP11. Les clones provenant des réacteurs du Biodôme sont identifiés par SBXX et SBB2.XX et ceux du réacteur au LARSA SBLXX. Les séquences des banques de données avec leur numéro d'accèsion (GenBank) ainsi que des informations sur leur origine proviennent des analyses faites avec ARB.

## CHAPITRE V

### 5 Discussion

#### 5.1 Importance des résultats pour l'avancer des connaissances sur la déphosphatation

Bien que le phénomène d'enlèvement du phosphate ait été observé depuis les années 70, la déphosphatation biologique en biofilm est un sujet encore peu connu. Cette étude se voulait une exploration de ce sujet. En plus de l'étude des biofilms, l'utilisation de lits mobiles amène un volet novateur à cette étude. En effet, la littérature porte principalement sur la déphosphatation biologique dans des systèmes de boues activées qui ont su se montrer efficaces au point vue de la déphosphatation, mais également en ce qui a trait à l'amélioration de la croissance de *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (van Loosdrecht et al. 1997).

Bien que ces systèmes présentent comme principal avantage leur relative facilité d'utilisation, ils demeurent beaucoup moins efficaces pour des systèmes contenant de faibles quantités de matière organique. En effet, les systèmes en boues activées requièrent la présence en excès de matière organique afin de ne pas limiter la croissance des OAP. Cette façon de procéder fait en sorte que beaucoup d'éléments demeurent inconnues quant aux éléments essentiels à la croissance des OAP.

Aussi, la favorisation de la croissance des OAP est perçue comme un avantage d'un point de vue de traitement des eaux usées où la quantité de matière organique demeure sans doute constante. Cependant, dans une situation de traitement des eaux d'aquaculture, les paramètres physicochimiques de l'eau ainsi que la microflore de l'eau peuvent varier au cours des mois. Dans cette situation, si seule la croissance de *C. Accumulibacter phosphatis* a été favorisée, des changements dans les conditions pourraient être néfastes pour la culture du biofilm. D'ailleurs, des systèmes de déphosphatation ont déjà été entièrement arrêtés à cause d'une contamination ou

d'un changement de conditions (Liu et al., 2000). Une microflore complexe et diversifiée aurait pour avantage de multiplier les niches écologiques disponibles pour la croissance de ces OAP et possiblement favoriser des OAP non répertoriés. Au cours de la présente étude, la microflore s'étant développée dans les réacteurs illustre que les espèces capables d'accumuler ou du moins de survivre à des changements drastiques dans les conditions du milieu sont nombreuses.

## 5.2 Présentations des résultats

Les résultats ont été présentés par affiches et oralement lors de plusieurs congrès ou symposiums. Au cours des premières années de mon doctorat, une affiche méthodologique a été présentée au congrès Biofilm dans le cadre des conférences de l'American Society for Microbiology (ASM) qui avait lieu à Québec en 2007. Une méthode de préservation de la biomasse ayant poussé sur des lames de microscopes dans le bioréacteur a alors été décrite. La méthode consistait à lyophiliser la biomasse directement sur les lames afin de préserver le longtemps plus possible les biofilms sans traitement chimique. La méthode est particulièrement intéressante dans les situations où les analyses de biofilm doivent être faites plusieurs jours après l'échantillonnage.

Dans un congrès de la Société canadienne de microbiologie (SCM) qui a eu lieu à Montréal en 2009, des résultats préliminaires d'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes sur des biofilms poussant dans les conditions de la déphosphatation ont été présentés. Ces résultats montraient la présence de *C. Accumulibacter phosphatis* dans les biofilms déphosphatants du Biodôme de Montréal.

Lors du congrès de l' *International Symposium of Microbiological Environment (ISME)* qui s'est tenu à Cairns en Australie en août 2008, des résultats des expériences I et II ont été présentés

durant une session d'affiches. Ces résultats faisaient état que le tiers de la composition des biofilms effectuant de la déphosphatation biologique en condition dénitrifiante appartenait au genre *Candidatus Accumulibacter phosphatis*. Bien que l'enrichissement à cet organisme a déjà été effectué dans des proportions plus importantes de 95 à 98 % (Garcia-Martin *et al.* 2009), jamais auparavant le système n'avait été opéré de manière à favoriser les eaux moins riches en matière organique. Aussi, les résultats préliminaires de la diversité bactérienne des biofilms ont été présentés lors de cet important symposium de même que lors du congrès Armand-Frappier de novembre 2007 où la caractérisation de la diversité des réacteurs n'était qu'à ses débuts.

Les résultats globaux de la phylogénie des réacteurs ont été présentés à deux reprises soient dans un premier temps lors de la rencontre annuelle du Réseau Aquaculture Québec (RAQ) en novembre 2008 sous forme de présentation orale ainsi que lors de la 59<sup>e</sup> conférence annuelle de la Société canadienne de microbiologie (SCM) qui avait lieu à Montréal en juin 2009. Les résultats montraient alors une grande diversité dans les réacteurs qui étaient dominés principalement par les betaprotéobactéries, les gammaprotéobactéries et les alphaprotéobactéries en ordre d'importance. Ces résultats montraient également une forte présence des OAP, mais également des OAG ce qui pouvait partiellement expliquer les performances d'enlèvement de phosphates des Expériences II, III et IV.

Finalement, l'inhibition de l'enlèvement du phosphate dans les réacteurs du Biodôme a fait l'objet d'un article publié en 2009 (Vallet *et al.*, 2009). Il était fait mention que la présence en grandes quantités de cations tels le  $Mg^{2+}$  et le  $Ca^{2+}$  pouvait fortement diminuer la capacité des ions de phosphate à redevenir biodisponibles pour les échanges transmembranaires de  $PO_3^-$  pour permettre la déphosphatation biologique. Le suivi de la présence des *C. Accumulibacter phosphatis* ainsi que la présence de granules de polyP en aérobie et de PHA en anaérobie faisait partie de résultats présentés dans cette thèse pour l'Expérience I.

### **5.3 Généralités**

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont permis de mieux comprendre la déphosphatation biologique dans le cadre d'une utilisation en milieu piscicole. En effet, la caractérisation de la flore permet d'affirmer qu'avec le système original utilisé dans le cadre de cette étude, la présence des OAP a pu être observée pour les Expériences II, III et IV. De plus, les génothèques ont permis de constater qu'une grande diversité spécifique existait dans les réacteurs et ce, malgré, la source de carbone unique. Ce résultat semble contraire à ce qu'on retrouve dans la littérature (Seviour et al., 2003), mais pourrait en partie au moins être expliqué par le mode opérationnel ce EBPR. En effet, le fait de fonctionner avec un bac de concentrat dans lequel de la biomasse finissait par croître et que dans les changements d'eau, des volumes morts existent dans la tuyauterie, il est possible que la présence de cette biomasse excédentaire subissant des conditions différentes de celles dans les réacteurs soit la source de la grande diversité. En effet, ces deux milieux présentaient des eaux plus stagnantes riches en carbone et souvent anoxiques.

Il n'en demeure pas moins que la présence des OAG possiblement en quantité importante demeure un des éléments pouvant le mieux expliquer les performances en deçà des attentes.

### **5.4 Expérience I**

L'Expérience qui utilisait l'eau salée du mésocosme du Saint-Laurent marin au Biodôme de Montréal comme affluent pour la déphosphatation en eau salée s'est avérée être un échec. C'est par cette expérience que les travaux de l'équipe de recherche (les laboratoires de Yves Comeau, Grant Vandenberg, Pierre Juteau et Richard Villemur) ont débuté. Après près d'un an d'expérimentation infructueuse, le traitement de l'eau salée a dû être abandonné et il a fallu se

concentrer sur le traitement en eaux douces. Selon ce que la littérature suggérait au moment de l'Expérience IV, l'utilisation des OAP en eau salée n'avait pas de précédent répertorié. L'idée d'utiliser un affluent riche en sels était donc d'une grande originalité. Cependant, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  présents dans cette eau riche en sels semblent avoir réagi avec les ions  $\text{PO}_4^-$  pour créer des précipités de  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$  et de  $\text{Mg}(\text{PO}_4)_2$  et avoir inhibé le transport des phosphates à travers la membrane cellulaire. En effet, la précipitation des sels de phosphates aurait pu séquestrer le phosphate libre sous forme d'orthophosphates et ainsi empêcher le développement d'un biofilm capable de déphosphatation biologique.

Par contre, les colorations des granules de PHA et de polyP ont semblé montrer la présence d'OAP (Fig. 4.13). Cependant, les expériences subséquentes ont révélé que lesdits granules tendaient à être de moins en moins présents dans les échantillons de biomasse prélevés au fil des semaines. Aussi, le fait que les PCR ciblant spécifiquement le gène codant pour le gène de l'unité ribosomale 16S des OAP n'ont pas montré d'amplification pour ces échantillons pourrait être attribuable à une absence totale ou presque d'OAP lors de l'analyse.

Aucune analyse avec le FISH ou de phylogénie n'ont été tentées avec les échantillons de biomasse de l'Expérience I puisque le système n'a jamais été vraiment opérationnel et que la quantité de la biomasse diminuait constamment (Vallet, 2007).

## **Expérience II**

La biomasse de l'Expérience II contenait certes des OAP (présence confirmée par les analyses de PCR spécifiques (Fig. 4.4) et de FISH (Fig. 4.15)), mais elle contenait aussi des bactéries hétérotrophes non déphosphatantes. Ainsi, les résultats de l'Expérience II, laquelle se déroulait avec un affluent artificiel d'eau douce, ont montré une biomasse capable de

déphosphatation biologique (Fig. 2.8). Cependant, les performances sont toujours demeurées plutôt basses. Les faibles quantités de PHA retrouvées dans la biomasse de même que l'absence de variation pour ces mêmes PHA entre les phases anaérobie et aérobie/anoxie suggèrent que la majorité des organismes composant la biomasse utilisaient peu ou pas leur réserve de PHA (Fig. 4.1). Cette réserve de PHA aurait dû être plus élevée à la fin de la phase anaérobie et plus basse à la fin de la phase aérobie. Pour la même raison, les niveaux de phosphore total dans la biomasse étaient sensiblement les mêmes à la fin de la phase anaérobie et à la fin de la phase aérobie/anoxie, au lieu d'être très faibles à la fin de la phase anaérobie et très élevés à la fin de la phase aérobie (Fig. 4.1).

Les niveaux intracellulaires de glucose sont apparus inversés par rapport à ce qui était attendu pour un système de déphosphatation biologique (Fig. 4.1). En effet, le niveau de glucose en fin de la phase anaérobie s'est avéré élevé alors que celui à la fin de la phase aérobie s'est avéré moins important. Ces résultats pourraient s'expliquer par la relative faible proportion des OAP par rapport aux autres bactéries présentes. Les conditions restrictives dans lesquelles la biomasse a crû n'auraient pas dû favoriser la croissance des bactéries hétérotrophes non déphosphatantes. Plusieurs raisons pourraient expliquer au moins en partie la présence abondante de bactéries hétérotrophes non déphosphatantes : 1) l'inoculum initial contenait majoritairement des hétérotrophes, 2) le biofilm sur les médias avait une certaine épaisseur, protégeant ainsi certains organismes qui n'auraient pas résisté autrement, et 3) le principe des changements de l'eau entraînait la présence, certes faible, mais notable, d'une source de carbone dans la phase aérobie.

Pour ce qui est du PCR-DGGE, chaque bande a été considérée comme une espèce. Cependant, ces profils ne se veulent que qualitatifs et approximatifs. De même s'il appert que des amplicons ayant des séquences différentes soient parfois retrouvés à la même hauteur sur le gel, il

n'en demeure pas moins que les amplicons vont être comparables dans le temps en faisant migrer en parallèle les échantillons. En effet, à moins que les apparitions et disparitions d'espèces (donc de bandes) se soient produites parmi les espèces ayant exactement la même migration, ce qui est peu commun, les changements dans la population pourront être observés par PCR-DGGE. Également, il est possible qu'ils y aient des variations au sein d'une même espèce pour ces amplicons.

Les analyses de FISH (Fig. 4.15), les PCR ciblées (Fig. 4.6) et les colorations des granules de PHA et de polyP (Fig. 4.4) ont montré la présence d'OAP parmi les betaprotéobactéries apparentées à *Candidatus A. phosphatis*, principal agent connu de la déphosphatation biologique. Environ le tiers des aires occupées par des bactéries l'a été par des OAP et des espèces appartenant au type *Candidatus A. phosphatis*. Le fait que 33% des bactéries semblent associées à des OAP et que les performances d'enlèvement de phosphate au cours de cette expérience soient toujours demeurées relativement basses (autour de 20%) pourrait s'expliquer par les rapports Ca/P, K/P et Mg/P. Comeau *et al.* (1986) et Rickard *et al.* (1992) ont établi que les rapports optimaux établis étaient de 0,06 Ca/P, 0,2 K/P et 0,3 Mg/P. Or, les rapports mesurés au cours de l'Expérience II ont été de 11,4 Ca/P; 12,3 K/P et de 61,8 Mg/P. Ces rapports élevés suggèrent que les ions de phosphates ont pu potentiellement être liés trop fortement à un ou plusieurs ces cations. En effet, ces liaisons peuvent causer une précipitation des ions phosphates qui doivent, dans un système EBPR, traverser la membrane des OAP à la phase anaérobie, pour former des granules de polyP, et à la phase aérobie, pour retourner sous forme de phosphate. On pourrait ainsi déduire que malgré la présence des OAP, la déphosphatation biologique ne pouvait s'effectuer en raison de la stabilisation chimique des ions phosphates par les cations. Vallet (2007) a prouvé que les cations de calcium étaient les principaux responsables de précipités retrouvés dans le réacteur.

#### 5.4 Expérience III

Nos résultats obtenus par FISH (Fig. 4.16), par PCR spécifiques (Fig. 4.10) et par séquençage (Fig. 4.20) ont permis de confirmer la présence d'OAP lors de l'Expérience III. Un phénomène différent de l'Expérience II a été observé pour l'Expérience III, au cours de laquelle les performances en déphosphatation biologique d'un affluent d'eau douce artificiel ont été optimisées (Fig. 2.10). En effet, les performances d'enlèvement du phosphate ont atteint des niveaux supérieurs à ceux obtenus lors de l'Expérience II (Fig. 2.11). De la même façon, la présence des granules de polyP et de glycogène était plus importante à la fin de la phase aérobie qu'à la fin de la phase anaérobie (Fig. 4.8). Aussi, les granules de PHA étaient plus abondants à la fin de la phase anaérobie qu'à la fin de la phase aérobie. La présence des OAP a également été confirmée par l'amplification d'une partie du gène codant pour l'ARNr 16S ciblant spécifiquement ces organismes (Fig. 4.10). Les PHA et le glucose ont suivi les profils attendus pour les phases anaérobie et aérobie (Fig. 4.9). Par contre, les niveaux de phosphore total n'ont semblé suivre aucun profil. Les barres d'erreur appliquées à ces données sont assez importantes (Fig. 4.9). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les échantillons venaient de médias où les biofilms ne croissaient pas de façon homogène. Des biobilles neuves ont été mises dans le réacteur pour remplacer celles échantillonnées. Ainsi, bien que des précautions à cet effet aient été prises, l'âge du biofilm d'un média à l'autre pouvait différer ce qui a pu entraîner des variations plus importantes d'un échantillonnage à l'autre. Aussi, des précipités blancs étaient parfois visibles sur le biofilm prélevé sur les biobilles. Ce précipité, s'il n'a pas été dissous complètement lors des lavages, a certainement influencé la quantité de phosphate totale. Finalement, la plupart des études ont porté sur des systèmes de boues activées dans lesquels la biomasse était retirée. Or, notre système est novateur par sa façon d'enlever le phosphate en

laissant le biofilm dans le réacteur et en alternant plutôt une eau à traiter aérobie avec une eau anaérobie d'accumulation des phosphates. Il est donc possible que certains paramètres soient plus difficiles à établir. Il se peut également que des traces de cette eau à haute teneur en phosphate aient pu persister malgré les rinçages ce qui aurait alors influencé la mesure de phosphore total.

### 5.5 Expérience IV

Lors de l'expérience utilisant l'affluent d'un bassin d'élevage de salmonidés, les performances de déphosphatation observées ont été supérieures à toutes les autres Expériences de cette étude (Fig. 2.13). Aussi, les résultats obtenus ont montré la présence d'OAP dans cette biomasse déphosphatante performante. En effet, à la fin des phases anaérobie et aérobie/anoxie, les PHA et le phosphore total intracellulaires étaient aux niveaux prévus par la déphosphatation biologique (Fig. 4.11). Ainsi, les niveaux de PHA étaient plus importants à la fin de la phase anaérobie qu'à la fin de la phase aérobie/anoxie ce qui correspond à ce qui est décrit dans la littérature (Mino *et al.*, 1998). En effet, la capacité des OAP à assimiler la source de carbone environnante en absence d'accepteurs d'électrons demeure une faculté peu répandue dans l'environnement. Seuls les niveaux de glucose (= glycogène) ne semblent pas avoir suivi le modèle. Ces variations dans les niveaux de glucose pourraient s'expliquer par la présence d'OAG qui aurait influencé le glycogène à suivre la tendance décrite pour les OAP et les OAG sans affecter le phosphate.

Considérant que les solides volatils totaux étaient plus importants dans l'Expérience II (environ 1200 mg/L) que dans à l'Expérience IV (environ 900 mg/L), les performances d'enlèvements de phosphates observés au cours de l'Expérience IV ont démontré que la biomasse était constituée de manière plus importante d'OAP. Ainsi, les niveaux de phosphates à la fin de la

phase aérobie étaient significativement plus élevés pour la biomasse alimentée par un affluent piscicole (Fig. 4.11). Aussi, les PCR ciblant spécifiquement *Candidatus A. phosphatis* ont montré la présence de ces derniers (Fig. 4.14). Les résultats obtenus avec le FISH ont aussi montré que des OAP étaient présents, et ce, bien que des problèmes d'autofluorescence soient apparus dans l'analyse (Fig. 4.17). Les analyses phylogénétiques ont également montré la présence de plusieurs séquences associées aux OAP (Fig. 4.20).

Par contre, le système a dû être alimenté en source de carbone de manière importante (jusqu'à 600 mg DCO/L) pour obtenir ce rendement (Restrepo *et al.*, 2009). Aussi, parce que l'affluent provenant des bassins de pisciculture qui produisaient une trop faible concentration en phosphate pour alimenter et surtout maintenir la biomasse déphosphatante, du phosphore sous la forme de sels de phosphate a dû être ajouté durant les phases aérobies. Ainsi, la combinaison de cet ajout de phosphate avec celui de la source de carbone a permis le développement d'une biomasse ayant une grande capacité d'enlèvement des phosphates. Par contre, considérant qu'il a fallu ajouter ces deux produits pour assurer des performances intéressantes du système, on peut douter de l'efficacité d'un tel procédé pour déphosphater un effluent piscicole commercial.

Pour ce qui est des résultats des analyses avec le FISH, un phénomène d'autofluorescence est apparu dans les échantillons. Les principales bactéries affectées par cette autofluorescence étaient des coques disposées en tétrades. La formation de tétrades a été remarquée dans d'autres études de déphosphatation biologique et représentait une forme de OAG (Ahn *et al.*, 2002). En effet, *Defluviicoccus vanus*, une espèce formant des tétrades de coques, est une espèce reconnue pour être présente dans les systèmes de déphosphatation biologique. Une section sur les organismes autofluorescents a été élaborée afin d'approfondir le sujet.

#### **5.4 Hybridations in situ avec sondes fluorescentes**

Les résultats de l'hybridation *in situ* ont montré la présence de *Candidatus A. phosphatis* dans les échantillons provenant des Expériences II, III et IV. Dans ces Expériences, le signal émis par les sondes hybridées à *A. phosphatis* a représenté le tiers de la quantité de signal émis par la biomasse. Ces résultats ont pu expliquer que lors de ces trois expériences, du phosphate était retiré des systèmes (Fig. 4.15, 4.16 et 4.17). Par contre, la présence confirmée d'OAG explique également pourquoi les performances atteintes ont été en deçà des performances attendues (Fig. 4.16).

Les analyses avec le FISH se sont avérées difficiles à interpréter à cause d'un phénomène d'autofluorescence imprévu dont la cause demeure encore inconnue. Des contrôles ont exclu des artefacts liés au procédé tels la paraffine, les coupes minces et les sondes (synthétisées plusieurs fois). Une hypothèse plausible serait que certains organismes présents dans le biofilm contenaient des pigments fluorescents, tels des pigments photosynthétiques présents chez les cyanobactéries. La visualisation du biofilm par microscopie n'a pas démontré la présence de cellules eucaryotes fluorescentes. La section qui suit fait un survol du phénomène.

#### **5.5 Organismes autofluorescents**

La fluorescence induite naturellement est commune dans le vivant. Cependant, puisque cette fluorescence sert surtout les organismes utilisant des pigments pour effectuer de la photosynthèse, elle demeure marginale chez les bactéries. Il existe tout de même quelques espèces capables d'autofluorescence.

### 5.5.1 Bactéries

Plusieurs organismes ont une fluorescence dite naturelle ou autofluorescence. Parmi ceux-ci, quelques groupes de bactéries ont été identifiés. Les bactéries capables de photosynthèse ont été divisées en plusieurs groupes à partir de leur phylogénie et leur couleur. En effet, selon Achenbach et collaborateurs (2001), il y a les bactéries sulfureuses vertes, les non sulfureuses vertes (*Chloroflexus*), les membres d'*Helicobacteriaceae* et les bactéries pourpres (sulfureuses et non sulfureuses) (Achenbach *et al.*, 2001). Contrairement aux cyanobactéries, ces bactéries sont capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie en anoxie sans toutefois produire de l'oxygène. Elles utilisent donc le soufre ou un autre élément comme donneur d'électrons dans la photosynthèse. D'autre part, les bactéries non sulfureuses et les *Helicobacteriaceae* ont une importance biochimique et écologique importante puisqu'elles sont fréquemment associées à la fixation de l'azote gazeux (Madigan, 1995).

Par contre, des réactions PCR avec des amorces ciblant le gène codant pour l'unité ribosomale 16S des bactéries sulfureuses vertes, les non sulfureuses vertes, les membres d'*Helicobacteriaceae* et les bactéries pourpres (sulfureuses et non sulfureuses) n'ont donné aucun résultat positif, et ce, malgré de multiples conditions appliquées. Cette absence de résultat positif pourrait être attribuable à une trop faible représentation des groupes d'espèces visés par rapport au reste de la biomasse ou une trop grande spécificité des amorces.

Cependant, les analyses phylogénétiques ont montré la présence de bactéries du genre *Chloroflexus* ainsi que des séquences associées à *Rubrivivax gelatinosus*. Alors que les *Chloroflexi* appartiendraient aux bactéries vertes non sulfureuses, l'espèce *R. gelatinosus* est une betaprotéobactérie appartenant au *Burkholderiales* et serait une bactérie pourpre. Ces deux groupes de séquences, dont plusieurs avaient été trouvées durant l'Expérience IV, pourraient être

les responsables de l'autofluorescence trouvée au cours de l'analyse de FISH de l'Expérience IV (Fig. 4.24). Puisque les PCR spécifiques n'ont pas été concluantes, cette hypothèse ne peut être affirmée hors de tout doute.

#### 5.4.3 *Cyanobactéries*

Pour leur part, les cyanobactéries possèdent des systèmes photosynthétiques complets avec les photosystèmes I (PS1) et II (PS2) (Vermaas *et al.*, 1986). Contrairement aux plantes, les cyanobactéries ont, outre la chlorophylle, un second pigment photosynthétique absorbant la lumière nommé phycobiline. De plus, les cyanobactéries sont capables d'activité photosynthétique efficace en présence et en absence d'oxygène. Encore une fois, des PCR avec des amorces ciblant le gène codant pour l'unité ribosomale 16S des cyanobactéries n'a pas permis d'en révéler la présence.

#### 5.5.2 *Archaeobactéries*

La présence d'Archaeobactéries a également été vérifiée, car plusieurs espèces d'Archeae sont capables ont des capacités photosynthétiques importantes. En effet, certaines Archaeobactéries (e.g. genres *Methanococcus* et *Pyrococcus*) ont développé des capacités photoautotrophes leur permettant de fixer le CO<sub>2</sub> de l'air par photosynthèse à l'aide de la bactériochlorophylle (Koning, 1994). Encore une fois, la présence d'Archaeobactéries n'a pas été détectée par PCR.

Il est raisonnable de croire que le problème de l'autofluorescence observée dans les échantillons de l'Expérience IV pourrait donc être attribuable, au moins en partie, aux bactéries appartenant au genre *Chloroflexus* et aux bactéries associées à *R. gelatinosus*. Cependant, aucune confirmation n'a pu être faite à cet effet.

### **5.6 Composition de la flore bactérienne**

L'Expérience I a montré que les deux réacteurs ont eu des biomasses similaires au départ, mais qu'à la fin des différences sont survenues bien que l'interprétation soit plus complexe à cause de la courbe dans le gel (Fig. 4.1). Une évolution a eu lieu au niveau des espèces présentes dans la biomasse. En effet, certaines bandes ont complètement disparu par rapport aux échantillons initiaux alors que d'autres ont fait leur apparition. Cette situation pourrait être attribuable au fait que l'inoculum provenait d'une usine de traitement des eaux usées où le contenu en sel était relativement faible alors que l'Expérience I se faisait en condition nettement salée.

Les résultats des DGGE pour les quatre expériences ont montré une diversité bactérienne importante pour le système de déphosphatation par biofilm. Ce phénomène a déjà été observé dans d'autres systèmes EBPR, mais est habituellement associé à des sources de carbone complexe, comme des eaux usées riches en matière organique (Seviour et al., 2003). Le suivi de la diversité par DGGE dans l'Expérience II a montré une stabilité entre les moments d'échantillonnage (Fig. 4.5). Ceci suggère que même si la biomasse augmentait (épaississement du biofilm sur les médias), les espèces principales représentées dans cette biomasse sont demeurées les mêmes, et ce, dans des proportions relatives semblables.

Les profils de diversité de l'Expérience III ont montré une stabilité encore plus remarquable (Fig. 4.7). En effet, mis à part, une bande dans le bas qui semble disparaître puis revenir, presque toutes les autres bandes sont restées présentes tout au long de l'expérience. Ceci suggère également que les espèces qui y sont établies au début y sont restées.

Finalement, pour ce qui est de l'Expérience IV, bien que la présence de la plupart des bandes puisse être observée pour les trois échantillons (21, 84 et 140 jours), les intensités ont semblé varier ce qui pourrait suggérer que les proportions des différentes espèces se sont ajustées aux conditions ambiantes au cours de l'expérience (Fig. 4.12). Cependant, la nature même du PCR-DGGE où les quantités initiales d'ADN au début de l'amplification a des conséquences énormes sur la quantité de produits qui migre ce qui influence grandement l'intensité des bandes sur le gel. L'apparition de certaines bandes avec un affluent provenant d'une eau de pisciculture peut être attribuable à la flore cutanée et digestive des poissons dans les bassins.

### 5.6.1 Analyses phylogénétiques

Les résultats phylogénétiques obtenus au cours de cette thèse montrent la présence d'OAP dans les Expériences II et IV (Fig. 4.20). Ainsi, les performances d'enlèvement de phosphate de ces deux systèmes peuvent s'expliquer par la présence de *Candidatus Accumulibacter phosphatis*. D'autre part, la présence de OAG, principaux compétiteurs des OAP a pu être observée pour les expériences II, III et IV (Fig. 4.23). Les analyses phylogénétiques ont montré que les flores bactériennes des Expériences II, III et IV étaient beaucoup plus diversifiées que prévu et comprenaient des espèces apparentées à plusieurs familles, principalement des Alpha-, des Beta-, des Gamma- et des Delta- protéobactéries. Bien que des études utilisant seulement l'acétate comme source de carbone ont montré une diversité plus faible que les expériences

utilisant des sources de carbone complexes (Seviour et al., 2003), les systèmes EBPR ont habituellement une grande diversité d'espèces (Jenkins et Tandoi, 1991). En effet, les systèmes n'ayant que l'acétate comme source de carbone sont habituellement dominés par des Betaprotéobactéries et des Actinobactéries, tandis que les systèmes ayant une source de carbone complexe ont également une plus importante diversité. Considérant que la biomasse des réacteurs déphosphatants était soumise à des conditions extrêmement rigoureuses à ce qui a trait à la présence de la source de carbone en absence d'oxygène et vice versa, nous nous attendions à obtenir seulement quelques espèces telles des OAP et des OAG. Il est possible que la configuration de notre système ait favorisé la présence de plusieurs bactéries non déphosphatantes. En effet, le biofilm a pu favoriser la croissance de ces bactéries par l'utilisation comme sources de carbone 1) les métabolites générés par les OAP, 2) les exopolysaccharides très abondants en général dans un biofilm, ou 3) les débris cellulaires des cellules mortes. Les systèmes EBPR sont réputés pour favoriser la diversité de la flore déphosphatante comme pour la flore non déphosphatante (Seviour et al., 2003). De plus, il est possible que la concentration en oxygène dans les volumes morts des réacteurs en présence de la source de carbone n'ait pas été négligeable ce qui aurait alors favorisé la croissance de bactéries non déphosphatantes.

Les analyses phylogénétiques ont montré que seulement sept séquences étaient associées aux OAP, alors qu'un des résultats de FISH montraient des proportions de 33 %. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la confection d'une génothèque ne peut être considérée comme quantitative. En effet, alors que les sondes d'hybridation vont trouver leurs lieux pour s'hybrider relativement facilement dans un biofilm convenablement fixé, les séquences de 16S d'OAP devront subir plusieurs manipulations avant de se trouver à l'intérieur d'une colonie de cellules compétentes. Aussi, il est possible que l'ADN d'autres bactéries soit favorisé dans ce processus. Le hasard de la sélection des colonies au final pourrait également jouer sur ces proportions.

Même si ces études ont été faites dans des systèmes de boue activée et certains opéraient des réacteurs en batch séquentielle, comme notre système (Revue par Serior et al., 2003), tous les systèmes étudiés au cours de la présente thèse avaient comme seule source de carbone l'acétate, mais les expériences I et IV ont été opérées avec des affluents naturels dans lesquels des poissons vivaient.

La plupart des séquences dérivées des trois expériences ont pu être associées à des séquences ou à des bactéries fréquemment retrouvées dans l'un des systèmes suivant : soit le traitement des eaux usées présentant une alternance de conditions aérobie/anaérobie, soit les systèmes de « dénitrification /nitrification », soit les systèmes ANAMMOX ou encore les systèmes de déphosphatation biologique de type EBPR. Le fait que plusieurs séquences de notre étude étaient associées à d'autres appartenant ou se rapprochant de l'une ou l'autre des systèmes cités précédemment suggère que les expériences menées dans le cadre de ce projet ont atteint l'objectif d'enrichir une biomasse capable de traiter une eau riche en nutriment, plus particulièrement le phosphate. Par contre, le fait que les séquences de 16S trouvées s'associent à celles d'espèces capables d'ANAMMOX, par exemple, suggère qu'il existait sans doute des zones qui demeuraient anoxiques de façon permanente (Fig. 4.22).

Tel que mentionné dans la section traitant de l'autofluorescence, les clones SBL58, SBL104, SBL108 et SBL114 ont tous été associés à *Rubrivivax gelatinosus*, une espèce de bactérie pourpre dont les capacités photosynthétiques en absence d'oxygène sont connues (Steunou *et al.*, 2004). En effet, lorsque cette bactérie est mise en absence d'oxygène, un régulateur (PpsR) agit sur deux opérons, *pucBA* et *crtI*. Lorsque l'oxygène est en baisse, la production de PpsR augmente, ce qui a pour conséquence d'augmenter la production de pigments photosynthétiques tels les caroténoïdes et la bactériochlorophylle (Steunou *et al.*, 2004). Or, en

déphosphatation biologique, les périodes d'absence d'oxygène sont fréquentes et prolongées ce qui aurait pu contribuer à la croissance de bactéries ayant des caractéristiques similaires à *R. gelatinosus*.

Aussi, les clones SBL26, SBL71, SBL95, SBL98, SBL109, SBL113, SBB2.97 et SB36 étaient associés au genre *Chloroflexus*, reconnu pour ses capacités photosynthétiques. Cependant, ces bactéries se retrouvent sous forme de bactéries filamenteuses ce qui ne correspond pas aux images de bactéries autofluorescentes observées (coques disposées en tétrades (Fig. 4.22)).

Chez les Alphaprotéobactéries, les clones associés à *Rhodobacter capsulatus*, une bactérie pourpre non sulfureuse capable de photosynthèse pourrait également être responsable de l'autofluorescence (4.19).

Outre les trois exemples précédents, aucune bactérie ne semble de prime abord prédisposée à effectuer de la photosynthèse lorsqu'on considère la distribution des clones dans les analyses phylogénétiques. Cependant, encore une fois, la majorité des séquences trouvées ont été associées avec des séquences provenant d'espèces non cultivables en laboratoire. Il est donc difficile de savoir si les séquences associées proviennent d'espèces autofluorescentes ou non, surtout que très souvent les informations sur les séquences publiées sont très incomplètes pour ne pas dire inexistantes. Cependant, la forme de coque en tétrade observée pour les bactéries autofluorescentes rappelle davantage *Defluvicoccus vanus* (Ahn *et al.*, 2007) ou l'OAP *Quadricoccus australiensis* (Maszenan *et al.*, 2002), deux espèces ne produisant pas de fluorescence constitutivement.

Une grande quantité des clones (52) du groupe des Gammaprotéobactéries s'associait à une espèce d'OAG, *Candidatus C. phosphatis*. Cette observation corrobore les résultats

d'enlèvement de phosphate parfois en deçà des attentes, surtout si on considère les espèces associées à *Dechloromonas* (Betaproteobactérie) et *Dechloromonas* (Alphaproteobactérie) comme étant également des OAG (Ahn *et al.*, 2007).

### **5.7 La déphosphatation biologique en eau salée**

Bien qu'il s'agisse d'un procédé d'intérêt pour le projet, c'est également un des procédés en traitement des eaux qui est le plus complexe à mettre au point, ne serait-ce que pour l'établissement de la biomasse. En effet, le fait de remplacer la phase anaérobie par une phase aérobie jusqu'à ce que tout l'oxygène soit retiré du système et puis en anoxie utilisant les nitrates comme accepteurs d'électrons requiert un mode d'opération plus complexe à établir.

Cependant, il existe un danger de se trouver en présence de nitrates lors de la phase anaérobie. En effet, l'anaérobiose serait ainsi annulée par la présence d'un accepteur d'électrons ce qui nuirait à la transformation de l'acétate en PHA par les OAP et favoriserait la croissance des bactéries anaérobies. De plus, en milieu saumâtre, l'importante quantité de sulfates dans l'eau peut également causer un problème en anaérobie puisque la croissance de bactéries sulfato-réductrices peut s'avérer favorisée (Vallero *et al.*, 2003) par rapport aux OAP. Dans ces deux situations, l'acétate ajouté dans le système pourrait servir de source de carbone et les nitrates d'accepteurs d'électron dans la chaîne de transport d'électron, ce qui favoriserait la croissance de ces bactéries anaérobies.

Finalement, l'importante quantité d'ion calcium peut également affecter le transport des ions phosphate à travers la membrane cellulaire. En effet, en fonction de la concentration et du pH, les ions de  $\text{PO}_4^-$  ont tendance à précipiter lorsque la concentration du calcium est élevée dans

l'eau (Barat *et al.*, 2006, Barat *et al.*, 2012). Cette présence de sel en excès favoriserait les OAG (Bassin *et al.*, 2012).

### **5.8 La dénitrification en eau douce en milieu piscicole**

Par contre, pour ce qui est des piscicultures, il est probable de retrouver surtout de l'ammoniac si les effluents de ces dernières se déversent directement dans les eaux de surface avoisinantes étant donné qu'il s'agit du principal rejet physiologique de la faune ichthyologique. L'ammoniac est rapidement transformé en nitrates par les bactéries nitrifiantes comme premier traitement en pisciculture. Suit alors la dénitrification au cours de laquelle les  $\text{NO}_2^-$  et les  $\text{NO}_3^-$  se transforment en  $\text{N}_2$ . Durant la dénitrification, une des étapes intermédiaires est la production de NO et en  $\text{N}_2\text{O}$  deux gaz considérés nocifs et contribuant à la destruction de l'ozone atmosphérique. Parce que la problématique du réchauffement planétaire est une préoccupation importante présentement, il est important que la dénitrification se fasse entièrement c'est-à-dire jusqu'à la réduction totale de l'azote  $\text{N}_2$ , car les collaborateurs sur ce projet espèrent ne pas transférer le problème des eaux usées au niveau de la pollution atmosphérique.

La dénitrification biologique sert dans le traitement de plusieurs types d'eaux usées. Les municipalités ainsi que plusieurs industries emploient ce procédé qui pourrait s'avérer intéressant pour l'industrie aquicole. En ajoutant le procédé de dénitrification, on s'aperçoit que la charge en azote inorganique est grandement diminuée ce qui réduit les risques d'eutrophisation des cours d'eau avoisinants. La solubilité des nitrates en fait une menace constante pour les réserves d'eau potable (APHA *et al.*, 2003) et l'on reconnaît en la dénitrification biologique un moyen économique de retirer ce polluant des eaux contaminées (Glass *et al.*, 1999).

La dénitrification pourrait s'avérer possible pour les piscicultures à cause des coûts raisonnables et de la biomasse relativement stable. Cependant, les normes moins restrictives pour ce qui est des rejets en nitrate et en nitrite font en sorte que la perspective d'implanter des systèmes de dénitrification dans toutes les petites piscicultures pourrait s'avérer moins pertinente. Pour les aquariums et les jardins zoologiques ayant des bassins fonctionnant en circuit fermé, la dénitrification de leur eau durant la filtration s'avérerait primordiale.

### **5.9 La déphosphatation biologique en milieu piscicole**

Jusqu'à présent, très peu d'études ont tenté de lier l'industrie piscicole avec la déphosphatation biologique. En effet, mis à part l'enlèvement des phosphates d'un bassin de pisciculture par des bassins de rétention d'eau dans lesquels des plantes poussaient, la déphosphatation biologique a été surtout étudiée dans un contexte de traitement des eaux usées avec un système de boues activées. L'apport en phosphate déversé dans l'environnement provenant des eaux des piscicultures n'est pas aussi important que celui venant des élevages bovin ou porcin, mais elle demeure considérable. Il faut également comprendre que le phosphate est la principale source d'eutrophisation des plans d'eau ce qui oblige les réglementations à être plus sévères.

La présente étude a toutefois soulevé d'importants points qui devront être considérés afin que la déphosphatation biologique soit effectuée dans des piscicultures. En effet, la déphosphatation biologique d'un affluent piscicole semble demeurée un projet posant des problèmes logistiques importants. Les coûts liés à l'alimentation importante en source de carbone ainsi que la formation de la main-d'œuvre spécialisée requise pour le fonctionnement du système

sans compter les nombreuses analyses de routine font que la faisabilité de la déphosphatation biologique en milieu piscicole serait complexe et coûteuse à implanter.

Ce procédé n'est pas approprié pour une pisciculture, mais pourrait avoir son intérêt dans une industrie générant beaucoup de phosphates et installé dans une zone très sensible à la pollution par le phosphore et l'azote. À l'instar de la dénitrification, les aquariums publics ou les jardins zoologiques, désirant réduire leur consommation d'eau tout en maintenant les conditions des bassins acceptables pour la faune hébergée, pourraient décider d'opérer en circuit fermé à utiliser un système à biofilms pour réduire les quantités de phosphates et de nitrates. Plusieurs utilisent déjà un procédé utilisant un lit de Cyanobactéries (*Algar Turf Scrubber*) qui retire différents nutriments, dont le phosphate, de l'eau. Par contre, les organismes de ce bioprocédé ne survivent pas dans une eau froide, contrairement aux OAP. Les aquariums publics opérant en eau froide pourraient alors se permettre d'engager ou de former de la main-d'œuvre compétente et assurer ainsi le suivi de la qualité de leur eau par des analyses fréquentes.

Finalement, l'observation générale des arbres phylogénétiques nous permet de constater que la très grande majorité des séquences analysées dans le cadre de cette thèse s'associait très bien avec des bactéries dites non cultivables. En effet, on retrouve la majorité des séquences entourées de séquences provenant de bactéries qui n'ont jamais pu être isolées en culture pure. Puisque proportionnellement, la majorité des bactéries n'ont pas pu être isolées selon les méthodes classiques de microbiologie, il n'est pas surprenant que dans un système opérant d'une manière si novatrice où la croissance en biofilm est favorisée, on retrouve une flore bactérienne diversifiée et peu connue. Cette étude se veut une première étape d'exploration de la diversité dans ce type de réacteurs.

## CHAPITRE VI

### 6 Conclusion

Au cours de cette étude, il a été démontré que la déphosphatation biologique demeure un procédé complexe à réaliser qui requiert des investissements importants en termes de formation et d'analyse. Bien que les performances n'aient pas été à la hauteur des attentes lors des quatre expériences, les résultats générés autant par l'équipe d'ingénieurs de la Polytechnique de Montréal que les membres de l'équipe de l'INRS-Institut Armand-Frappier ont éclairci un concept sur lequel la littérature ne foisonne pas.

L'hypothèse initiale selon laquelle le système novateur mis en place par l'équipe d'ingénieurs, qui consistait à utiliser le biofilm à lit mobile pour alterner entre l'eau à traiter (phase aérobie) et l'eau du concentrat (phase anaérobie) afin de concentrer le phosphate dans le bac à concentrat, a démontré la présence d'OAP dans notre système. En effet, par les performances de déphosphatation au moins partielles des réacteurs, mais surtout par les expériences réalisées pour la présente étude soit celles de biologie moléculaire, de FISH et d'analyses phylogénétiques, nous avons pu nous assurer que malgré les contraintes imposées par ce nouveau système, la croissance des OAP était observée.

La seconde hypothèse était que les performances obtenues lors des différentes expériences allaient pouvoir être partiellement expliquées par les résultats de la présente étude. Cette étude a, en effet, mis en lumière la présence d'OAG dans les systèmes où les performances étaient en-deçà des attentes. Nous avons également pu démontrer une grande diversité des biomasses obtenues lors des expériences II, III et IV, ce qui pourrait également expliquer les performances moins importantes qu'escomptées. En effet, la biomasse hétérotrophe importante mobilisait les ressources limitées en carbone et en accepteurs d'électron de notre système. Aussi, les différentes

colorations Neisser, DAPI et PHA ont permis d'estimer la progression des OAP dans les biomasses, alors que les dosages des principales substances impliquées dans la biochimie des OAP ont permis de compléter le portrait de la situation déjà décrite par les autres collaborateurs du projet.

La dernière hypothèse visait la comparaison entre la biomasse obtenue en eau douce avec celle obtenue en eau salée. Malheureusement, des embûches importantes comme la précipitation du phosphate au cours de l'Expérience I, en eau salée, nous a contraints à abandonner cet objectif. En effet, nous avons constaté que la déphosphatation biologique en eau salée s'avère quasi impossible, surtout dans les contraintes imposées par le système novateur utilisé pour les quatre expériences de cette étude. En effet, le système basait son enlèvement du phosphate par la concentration de ce dernier dans une eau ne retournant pas au bassin. Or, la présence d'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'eau de mer pourrait être la cause telle que rapportée précédemment (Barat *et al.*, 2006, Barat *et al.*, 2012), car cet ion empêchait la solubilisation des ions  $\text{PO}_4^-$  rendant ce dernier non disponible pour les échanges transmembranaires cruciaux à la déphosphatation biologique.

Bien qu'il y ait eu des effets néfastes pour le FISH, pour la première fois, des bactéries autofluorescentes ont été retrouvées dans un système de déphosphatation biologique. Les coques en tétrades rappelaient *Defluviococcus vanus* (Ahn *et al.*, 2007) ou l'OAP *Quadricoccus australiensis* (Maszenan *et al.*, 2002), deux espèces fréquemment retrouvées dans des systèmes effectuant la déphosphatation biologique. Cependant, aucune de ces deux bactéries ne semble être en mesure de faire de l'autofluorescence. Comme candidates possibles, il y a le genre *Chloroflexus* qui est capable de photosynthèse grâce à des pigments photosynthétiques, mais ces dernières sont des bactéries filamenteuses et non des coques. Autrement, *Rhodocyclus gelatinosus* et *Rhodobacter capsulatus* ont été identifiées comme des bactéries pourpres ayant une capacité photosynthétique. Il est possible qu'elles se soient retrouvées dans le système sans

toutefois être suffisamment nombreuses pour être amplifiées par PCR ciblant ce regroupement de bactéries.

Bien que certaines réponses soient restées avec seulement des pistes de solution (autofluorescence), le projet a été rigoureusement mené par l'équipe de collaborateurs. La preuve que des OAP ont pu croître dans les contraintes imposées par le système novateur demeure une percée majeure de cette étude. Cependant, les performances en deçà des attentes, l'expertise requise et le coût d'exploitation (analyse et main d'œuvre) rendent la déphosphatation biologique en aquaculture chez un entrepreneur piscicole quasi impossible à implanter. En effet, des contrôles quotidiens de quantité de phosphate et de carbone dans l'eau, en plus d'un suivi serré pour les cycles d'opération, en font un projet trop ambitieux pour une petite entreprise d'aquaculture. La déphosphatation biologique demeure un concept intéressant pour des entreprises aux prises avec des rejets en phosphates plus importants comme les usines de traitement des eaux usées. Seuls les aquariums publics et les parcs zoologiques ayant d'importants bassins que l'on veut utiliser en circuit fermé seraient des candidats intéressants pour utiliser un système comme celui-ci. En effet, la capacité d'analyse et de formation de main-d'œuvre qualifiée permettrait la mise sur pied et le suivi d'un système de cette complexité.

La grande diversité des séquences nouvelles mises en évidence dans cette étude démontre la faible quantité de connaissances que nous avons sur ces systèmes en particulier, mais d'espèces microbiennes environnementales en général. Des études comme celle-ci mettent en lumière l'importance de poursuivre les recherches dans le domaine. En effet, une meilleure connaissance de ses systèmes permettrait sans doute d'approfondir davantage l'analyse des séquences obtenues et ainsi mieux comprendre les réactions du système au cours des différentes expériences.

Finalement, la concentration du phosphate sous forme d'orthophosphates dans l'eau du bac de concentrat est un produit que l'on gagnerait à revaloriser. En effet, cette eau contenait une

grande quantité de phosphates après une semaine de roulement à 4,6 cycles par jour. Bien qu'au cours des expériences, cette eau fut rejetée dans les égouts, elle aurait pu être distribuée comme engrais liquide pour les champs. Mis à part une augmentation des frais de transport attribuables au poids de l'eau du concentrat par rapport à un engrais solide, l'engrais liquide présenterait l'avantage d'être plus facile à épandre et plus facilement assimilable par les plantes que sous forme solide.

Des expériences préliminaires utilisant les scories d'aciéries ont également été tenté. Malgré le fait que ce résidu de fabrication de l'acier réussissait à assimiler une partie du phosphate de l'eau, deux problèmes survenaient avec ce procédé. D'abord, la quantité de phosphate retirée était infime par rapport aux poids des scories, rendant les coûts d'opération important. Ensuite, aucune réutilisation du phosphate contenu par les scories n'était envisable à cause du caractère environnementalement toxique de celles-ci.

Sinon, il est possible que l'industrie agricole voit d'un mauvais œil l'utilisation d'engrais contenant des bactéries d'une grande variété d'espèces. Même si l'épandage en fumier apporte énormément de micro-organismes dans les sols cultivés, les différents Ministères se montreraient sans doute prudents avant d'approuver l'utilisation des déchets de bioréacteurs comme engrais. Des études portant sur l'élimination des pathogènes lors d'un traitement de déphosphatation biologique aideraient à obtenir assentiment des autorités en la matière. Ceci dit, les déchets de la déphosphatation biologique formés de boues activées ou d'une solution riche en phosphates pourraient difficilement être plus dangereux lorsqu'on l'utilise comme engrais, qu'un produit non traité comme le fumier de l'industrie bovine ou le lisier de l'industrie porcine.

## Références

Achenbach, Carey and Madigan (2001). "Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments." Appl Environ Microbiol **67**(7): 2922-2926.

Ahn, Daidou, Tsuneda and Hirata (2002). "Transformation of phosphorus and relevant intracellular compounds by a phosphorus-accumulating enrichment culture in the presence of both the electron acceptor and electron donor." Biotechnol Bioeng **79**(1): 83-93.

Ahn, Schroeder, Beer, McIlroy, Bayly, May, Vasiliadis and Seviour (2007). "Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor." Applied and Environmental Microbiology **73**(7): 2257-2270.

Albrecht, Ottow, Benckiser, Sich and Russow (1997) "Incomplete denitrification (NO and N<sub>2</sub>O) from nitrate by *Streptomyces violaceoruber* and *S. nitrosporeus* revealed by acetylene inhibition and 15N gas chromatography-quadrupole mass spectrometry analyses." Naturwissenschaften **84** (4): 145-147.

Amann, Binder, Olson, Chisholm, Devereux and Stahl (1990). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations." Appl Environ Microbiol **56**(6): 1919-1925.

APHA, AWWA and WEF, Eds. (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Washington, DC.

Barak and van Rijn (2000). "Atypical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans*." Applied and Environmental Microbiology **66**(3): 1209-1212.

Barat, Montoya, Borrás, Seco and Ferrer (2006). "Calcium effect on enhanced biological phosphorus removal." Water Sci Technol **53**(12): 29-37.

Barat, Montoya, Seco and Ferrer (2011). "Modelling biological and chemically induced precipitation of calcium phosphate in enhanced biological phosphorus removal systems." Water Res **45**(12): 3744-3752.

Barker and Dold (1996). "Denitrification behaviour in biological excess phosphorus removal activated sludge systems (Review paper)." Wat. Res. **30**(4): 769-780.

Barnard (1974). "Cut P and N without chemicals." Water wastes engenering **11**: 33-36 et 41-44.

Barnard (1975). "Biological nutrient removal without the addition of chemicals." Water Res **9**: 485-490.

Bassin, Pronk, Muyzer, Kleerebezem, Dezotti, van Loosdrecht (2011). "Effect of elevated salt concentrations on the aerobic granular sludge process: linking microbial activity with microbial community structure." Appl Environ Microbiol **77**(22): 7942-7953.

Beer, Kong and Seviour (2004). "Are some putative glycogen accumulating organisms (GAO) in anaerobic : aerobic activated sludge systems members of the alpha-Proteobacteria?" Microbiology **150**(Pt 7): 2267-2275.

Blackall, Crocetti, Saunders and Bond (2002). "A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **81**(1-4): 681-691.

Bond, Erhart, Wagner, Keller and Blackall (1999). "Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems." Appl Environ Microbiol **65**: 4077-4084.

Bond, Hugenholtz, Keller and Blackall (1995). "Bacterial Community Structures of Phosphate-Removing and Non-Phosphate-Removing Activated Sludges from Sequencing Batch Reactors." Applied and Environmental Microbiology **61**(5): 1910-1916.

Bruce KD, Hiorns WD, Hobman JL, Osborn AM, Strike P, Ritchie DA. (1992). "Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction". Appl Environ Microbiol **58**: 3413–3416.

Characklis and Cooksey (1983). "Biofilms and microbial fouling." Advances in applied microbiology **29**: 93-138.

Clesceri, Eaton, Greenberg et Franson (1996). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19<sup>e</sup> Édition. Washington, D.C.: American Public Health Association.

Comeau (1990). "La déphosphatation biologique métabolisme microbien." Sciences et techniques de l'eau **23**(1): 47-60.

Comeau, Hall, Hancock and Oldham (1986). "Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal." Water Res **20**: 1511-1521.

Comeau, Rabinowitz, Hall and Oldham (1987). "Phosphorus release and uptake in enhanced biological phosphorus removal from wastewater." J Water Pollution Control Fed. **59**: 707-715.

Cooksey (1992). Extracellular polymers in biofilms. In Biofilms - Science and Technology. M. F. B. C. T. R. B. L. F. Melo, Dordrecht: Publishers: pp. 137-147.

Costerton, Cheng, Geesey, Ladd, Nickel, Dasgupta and Marrie (1987). "Bacterial Biofilms in Nature and Disease." Annu Rev Microbiol **41**: 435-464.

Costerton, Lewandowski, Caldwell, Korber and Lappin-Scott (1995). "Microbial biofilms." Annu Rev Microbiol **49**: 711-745.

Crocetti, Banfield, Keller, Bond and Blackall (2002). "Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes." Microbiology-Sgm 148: 3353-3364.

Crocetti, Hugenholtz, Bond, Schuler, Keller, Jenkins and Blackall (2000). "Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation." Appl Environ Microbiol 66(3): 1175-1182.

Davey and O'Toole G (2000). "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics." Microbiol Mol Biol Rev 64(4): 847-867.

DeLong, Wickham and Pace (1989). "Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells." Science 243(4896): 1360-1363.

Dewanti and Wong (1995). "Influence of culture conditions on biofilm formation by Escherichia coli O157:H7." Int J Food Microbiol 26(2): 147-164.

Dupla, Comeau, Parent, Villemur and Jolicoeur (2006). "Design optimization of a self-cleaning moving-bed bioreactor for seawater denitrification." Water Res 40(2): 249-258.

Eberl (1999). "N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria." Syst Appl Microbiol 22(4): 493-506.

Eddy (2003). Suspended growth biological treatment processes. Wastewater Engineering, Treatment and Reuse McGraw-Hill. New York: pp.659-886.

Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. & Bottger, E. C. (1989). "Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA." Nucleic Acids Res 17, 7843-7853.

Filipe, Daigger and Grady (2001). "Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms." Water Environment Research 73(2): 213-222.

Filipe, Daigger and Grady (2001). "pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms." Water Environ Res 73(2): 223-232.

Filipe, Daigger and Grady (2001). "Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs." Biotechnol Bioeng 76(1): 32-43.

Fuhs and Chen (1975). "Microbiology basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater." Microbial Ecology 2: 119-138.

Garcia Martin, Ivanova, Kunin, Warnecke, Barry, McHardy, Yeates, He, Salamov, Szeto, Dalin, Putnam, Shapiro, Pangilinan, Rigoutsos, Kyrpides, Blackall, McMahon and Hugenholtz (2006). "Metagenomic analysis of phosphorus removing sludge communities." Nat Biotech 24: 1263-1269.

Glass and Silverstein (1999). "Denitrification of High Nitrate, High-Salinity Wastewater." Wat. Res. 33(1): 223-229.

Gottschalk (1986). Bacterial metabolism, 2nd ed. New York.

Hamilton (1987). Biofilms: microbial interactions and metabolic activities. Ecology of Microbial Communities 42st Symp Soc Gen Microbiol, Cambridge Univ. Press.

Helness, Melin, Ulgenes, Jarvinen, Rasmussen and Odegaard (2005). "High-rate wastewater treatment combining a moving bed biofilm reactor and enhanced particle separation." Water Sci Technol 52(10-11): 117-127.

Helness and Odegaard (1999). "Biological phosphorus removal in a sequencing batch moving bed biofilm reactor." Water Sci Technol 40(4-5): 161-168.

Helness and Odegaard (2001). "Biological phosphorus and nitrogen removal in a sequencing batch moving bed biofilm reactor." Water Sci Technol 43(1): 233-240.

Hiraishi and Khan (2003). "Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment." Appl Microbiol Biotechnol 61(2): 103-109.

Hirayama, Takai, Inagaki, Neilson and Horikoshi (2005). "Thiobacter subterraneus gen. nov., sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic, thermophilic, sulfur-oxidizing bacterium from a subsurface hot aquifer." Int J Syst Evol Microbiol 55(Pt 1): 467-472.

Horwitz, Shen, He, Dittmar, Neef, Chen and Schubart (1997). "The microtubule-destabilizing activity of metablastin (p19) is controlled by phosphorylation." J Biol Chem 272(13): 8129-8132.

Hughes, Hellmann, Ricketts and Bohannon (2001). "Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity." Appl Environ Microbiol 67(10): 4399-4406.

Jenkins, Richard and Daigger (2004). Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming, and other solids separation problems. Boca Raton, Florida, Lewis publishers.

Jreige, Johnny. 2005. L'enlèvement du phosphore d'un effluent piscicole par les scories d'aciéries dans un réacteur à lit fluidisé. M.Sc.A., co-direction Mourad Kharoune.

Kampfer, Erhart, Beimfohr, Bohringer, Wagner and Amann (1996). "Characterization of bacterial communities from activated sludge: Culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes." Microbial Ecology 32(2): 101-121.

Kawaharasakia, Tanakab, Kanagawaa and Nakamura (1999). "In situ identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration " Wat. Res. **22**(3): 434-444.

Kjelleberg and Molin (2002). "Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?" Current Opinion in Microbiology **5**(3): 254-258.

Knowles (1982). "Denitrification." Microbiological reviews **46**: 43-70.

Kong, Beer, Seviour, Lindrea and Rees (2002). "Role of "G-bacteria" in anaerobic substrate uptake in a SBR with no phosphorus removal." Water Sci Technol **46**(1-2): 171-178.

Kong, Ong, Ng and Liu (2002). "Diversity and distribution of a deeply branched novel proteobacterial group found in anaerobic-aerobic activated sludge processes." Environmental Microbiology **4**(11): 753-757.

Kong, Xia, Nielsen and Nielsen (2006). "Ecophysiology of a group of uncultured Gammaproteobacterial glycogen-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal wastewater treatment plants." Environmental Microbiology **8**(3): 479-489.

Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews* **46**:43-70.

Koning (1994). "Kingdom Archaea." Plant Physiology Information Website 12-14-3910. from <http://plantphys.info/organismal/lehtml/archaea.shtml>.

Kuba, van Loosdrecht and Heijnen (1997). "Biological dephosphatation by activated sludge under denitrifying conditions: pH influence and occurrence of denitrifying dephosphatation in a full-scale waste water treatment plant." Water Science and Technology **36**(12): 75-82.

Kuba, Wachtmeister, van Loosdrecht and Heijnen (1994). "Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal systems." Wat. Sci. Tech. **30**(6): 263-269.

Labbé, Juteau, Parent and Villemur (2003). "Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the montreal biodome, Canada." Microb Ecol **46**(1): 12-21.

Labbé, Parent and Villemur (2003). "Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems." Water Res **37**(4): 914-920.

Labelle, Juteau, Jolicoeur, Villemur, Parent and Comeau (2005). "Seawater denitrification in a closed mesocosm by a submerged moving bed biofilm reactor." Water Res **39**(14): 3409-3417.

Lane, Pace, Olsen, Stahl, Sogin and Pace (1985). "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(20): 6955-6959.

Lanthier, Tartakovsky, Villemur, DeLuca and Guiot (2002). "Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1." Appl Environ Microbiol **68**(8): 4035-4043.

Lawrence, Korber and Caldwell (1995). Surface colonization strategies of biofilm-forming bacteria. Advances in microbial ecology. P. Press. New York.

Levantesi, Serafim, Crocetti, Lemos, Rossetti, Blackall, Reis and Tandoi (2002). "Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor." Environmental Microbiology **4**(10): 559-569.

Levin and Shapiro (1965). "Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms." J Water Pollut Control Fed **37**: 800-821.

Li, Xing and Wang (2003). "Characteristics of phosphorus removal from wastewater by biofilm sequencing batch reactor (SBR)." Biochem Engineering J **16**: 279-285.

Ling, Risman, Klement, McGraw and McAllister (1989) "Abortive Initiation by Bacteriophage T3 and T7 RNA Polymerase Under Conditions of Limiting Substrate", Nucleic Acids Research, **17**: 1605-1618.

Liu, Mino, Nakamura and Matsuo (1994). "Role of Glycogen in Acetate Uptake and Polyhydroxyalkanoate Synthesis in Anaerobic-Aerobic Activated-Sludge with a Minimized Polyphosphate Content." Journal of Fermentation and Bioengineering **77(5)**: 535-540.

Liu, Nielsen, Wu, Tsai, Matsuo and Molin (2001). "In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process." Environmental Microbiology **3(2)**: 110-122.

Loy, Arnold, Tischler, Rattei, Wagner and Horn (2008). "probeCheck--a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity." Environ Microbiol **10(10)**: 2894-2898.

Loy, Horn and Wagner (2003). "probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes." Nucleic Acids Res **31(1)**: 514-516.

Lussier (2009) " Suivi, optimisation et opération d'un pilote pour le traitement des eaux usées, Déphosphatation biologique sur biofilm au Biodôme de Montréal", Genie civil. Montréal, Université de Montréal. **Maîtrise**.

Madigan (1995). Microbiology of nitrogen fixation by anoxygenic photosynthetic bacteria. Anoxygeni photosynthetic bacteria. M. T. M. R. E. Blankenship, and C. E. Bauer Dordrecht, Kluwer: 915-928.

Manz, Amann, Ludwig, Wagner and Schleifer (1992). "Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions." Syst. Appl. Microbiol. **15**: 593 - 600.

Maszenan, Seviour, Patel, Rees and McDougall (1997). "Amaricoccus gen. nov., a gram-negative coccus occurring in regular packages or tetrads, isolated from activated sludge biomass, and descriptions of *Amaricoccus veronensis* sp. nov., *Amaricoccus tamworthensis* sp. nov., *Amaricoccus macauensis* sp. nov., and *Amaricoccus kaplicensis* sp. nov." Int J Syst Bacteriol **47**(3): 727-734.

Maszenan, Seviour, Patel and Schumann (2002). "Quadricoccus australiensis gen. nov., sp. nov., a beta-proteobacterium from activated sludge biomass." Int J Syst Evol Microbiol **52**(Pt 1): 223-228.

McMahon, Dojka, Pace, Jenkins and Keasling (2002). "Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal." Applied and Environmental Microbiology **68**(10): 4971-4978.

Meinhold, Filipe, Daigger and Isaacs (1999). "Characterization of the denitrifying fraction of phosphate accumulating organisms in biological phosphate removal. ." Water Sci. Technol. **39**(1): 31-42.

Mino (2000). "Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal." Biochemistry (Mosc) **65**(3): 341-348.

Mino, van Loosdrecht and Heijnen (1998). "Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process." Wat. Res. **32**(11): 3193-3207.

Murray, Doetsch and Robinow (1994). Determinative and cytological microscopy. Methods for General and Molecular Bacteriology. R. G. E. M. P. Gerhardt, W.A. Wood & N.R. Krieg. Washington, DC, American Society for Microbiology: 21-36.

Muyzer, de Waal and Uitterlinden (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." Appl Environ Microbiol **59**(3): 695-700.

Muyzer, Hottentrager, Teske and Wawer (1996), "Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities", A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn, Editors, *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, pp. 3.4.4.1–3.4.4.22.

Nakamura, Hiraishi, Yoshimi, Kawaharasaki, Masuda and Kamagata (1995). "Microlunatus phosphovorus gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge." Int J Syst Bacteriol **45**(1): 17-22.

Neef (1997). Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen, Technische Universität München. **Doctoral thesis.**

Neu (1996). "Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces." Microbiol Rev **60**(1): 151-166.

Neu and Lawrence (1999). "Lectin-binding analysis in biofilm systems." Methods Enzymol **310**: 145-152.

Neu, Swerhone and Lawrence (2001). "Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems." Microbiology **147**(Pt 2): 299-313.

Nielsen, Liu, Filipe, Grady, Molin and Stahl (1999). "Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor." Appl Environ Microbiol **65**: 1251-1258.

Novitsky and Morita (1976). "Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine. *Vibrio*." Applied and Environmental Microbiology **32**: 617-622.

Nubel, Garcia-Pichel and Muyzer (1997). "PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria." Appl Environ Microbiol **63**(8): 3327-3332.

O'Toole, Kaplan and Kolter (2000). "Biofilm formation as microbial development." Annu Rev Microbiol **54**: 49-79.

Oehmen, Keller-Lehmann, Zeng, Yuan and Keller (2005) a. "Optimisation of poly-beta-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems." J Chromatogr A **1070**(1-2): 131-136.

Oehmen, Teresa Vives, Lu, Yuan and Keller (2005) b. "The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms." Water Res **39**(15): 3727-3737.

Oehmen, Yuan, Blackall and Keller (2005). "Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms." Biotechnol Bioeng **91**(2): 162-168.

Paepcke (1983). "Performance and operational aspects of biological phosphate removal plants in South Africa." Water Science and Technology **15**(3-4): 219-232.

Randall and Liu (2002). "Polyhydroxyalkanoates form potentially a key aspect of aerobic phosphorus uptake in enhanced biological phosphorus removal." Water Res **36**: 3473-3478.

Restrepo, Labelle, Parent, Villemur, Juteau and Comeau (2009). "Biological phosphorus removal and denitrification of a fish farm effluent in a sequencing moving bed biofilm reactor." Water Qual. Res. J. Can. **44**(3): 233-242.

Rickard and McClintock (1992). "Potassium and magnesium requirements for enhanced biological phosphorus removal from wastewater." Wat. Sci. Tech. **26**(9-11): 2203-2206.

Rohwerder and Muller (2010). "Biosynthesis of 2-hydroxyisobutyric acid (2-HIBA) from renewable carbon." Microb Cell Fact **9**: 13.

Satoh, Mino and Matsuo (1992). "Uptake of Organic Substrates and Accumulation of Polyhydroxyalkanoates Linked with Glycolysis of Intracellular Carbohydrates under Anaerobic Conditions in the Biological Excess Phosphate Removal Processes." Water Science and Technology **26**(5-6): 933-942.

Schindler (1974). "Eutrophication and recovery in experimental lakes: implications for lake management." Science **184**: 897-899.

Seviour, Mino and Onuki (2003). "The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems." Fems Microbiology Reviews **27**(1): 99-127.

Shintani, Liu, Hanada, Kamagata, Miyaoka, Suzuki and Nakamura (2000). "Micropruina glycogenica gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive glycogen-accumulating bacterium isolated from activated sludge." Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 1**: 201-207.

Smolders, van der Meij, van Loosdrecht and Heijnen (1994) a. "Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence." Biotechnol Bioeng **43**(6): 461-470.

Smolders, van der Meij, van Loosdrecht and Heijnen (1994) b. "Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process." Biotechnol Bioeng **44**(7): 837-848.

Spring, Wagner, Schumann and Kampfer (2005). "Malikia granosa gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of Pseudomonas spinosa as Malikia spinosa comb. nov." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 2): 621-629.

Stante, Cellamare, Malaspina, Bortone and Tilche (1997). "Biological phosphorus removal by pure culture of Lamproedia spp." Water Research **31**(6): 1317-1324.

Steunou, Astier and Ouchane (2004). "Regulation of photosynthesis genes in Rubrivivax gelatinosus: transcription factor PpsR is involved in both negative and positive control." J Bacteriol **186**(10): 3133-3142.

Stoodley, Cargo, Rupp, Wilson and Klapper (2002). "Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena." J Ind Microbiol Biotechnol **29**(6): 361-367.

Sutherland (2001). "The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment." Trends Microbiol **9**(5): 222-227.

Timmermans and Van Haute (1983). "Denitrification with methanol: Fundamental study of the growth and denitrification capacity of Hyphomicrobium sp." Water Research **17**: 1249-1255.

Trepanier, Parent, Comeau and Bouvrette (2002). "Phosphorus budget as a water quality management tool for closed aquatic mesocosms." Water Res **36**(4): 1007-1017.

Vallero, Lens, Bakker and Lettinga (2003). "Sulfidogenic volatile fatty acid degradation in a baffled reactor." Water Sci Technol **48**(3): 81-88.

Vallet (2007). Déphosphatation biologique et dénitrification d'effluents piscicoles marin et dulcicole par réacteur séquentiel à lit mobile avec bac de concentrat. Genie civil. Montréal, Université de Montréal. **Maîtrise**: 78.

Vallet, Labelle, Bigras, Labbé, Parent, Juteau and Comeau (2006). Inhibition de la déphosphatation biologique en milieu marin dans un réacteur séquentiel à lit mobile. 22e Conférence régionale de l'Est sur la qualité de l'eau CAWQ – ACQE, Montréal.

Vallet, Labelle, Rieger, Bigras, Parent, Juteau, Villemur and Comeau (2009). "Inhibition of biological phosphorus removal in a sequencing moving bed biofilm reactor in seawater." Water Sci Technol 59(6): 1101-1110.

van Loosdrecht, Hooijmans, Brdjanovic and Heijnen (1997). "Biological phosphate removal processes." Applied Microbiology and Biotechnology 48(3): 289-296.

van Loosdrecht, Norde and Zehnder (1990). "Physical chemical description of bacterial adhesion." J Biomater Appl 5: 91-106.

vanLoosdrecht, Smolders, Kuba and Heijnen (1997). "Metabolism of micro-organisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater - Use of dynamic enrichment cultures." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 71(1-2): 109-116.

Vermaas, Williams, Rutherford, Mathis and Arntzen (1986). "Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 lacks the photosystem II chlorophyll-binding protein CP-47." Proc Natl Acad Sci U S A 83(24): 9474-9477.

Wagner, Erhart, Manz, Amann, Lemmer, Wedi and Schleifer (1994). "Development of an Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotide Probe Specific for the Genus *Acinetobacter* and Its Application for in-Situ Monitoring in Activated-Sludge." Applied and Environmental Microbiology 60(3): 792-800.

Wentzel, Lotter and Ekama (1991). "Evaluation of biochemical models for biological excess phosphorus removal." Water Sci Technol 23: 567-576.

Wentzel, Lotter, Loewenthal and Marais (1986). "Metabolic behavior of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphate removal - a biochemical model." Water SA 12(4): 209-244.

Wolfaardt, Lawrence, Robarts and Caldwell (1998). "In situ Characterization of Biofilm Exopolymers Involved in the Accumulation of Chlorinated Organics." Microb Ecol 35(3): 213-223.

Wong and Liu (2007). "Ecophysiology of *DeFluviicoccus*-related tetrad-forming organisms in an anaerobic-aerobic activated sludge process." Environ Microbiol 9(6): 1485-1496.

Young-Ok, Nam, Choi, Song and Yoon (2000). "Synthesis of copolymeric PHA by *Hydrogenophaga pseudoflava* and *Ralstonia eutropha* H16 from various lactones and their microstructural studies." San'oeb misaengmul haghoeji 28(2): 71-79.

Zeng, Lemaire, Yuan and Keller (2003). "Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor." Biotechnology and Bioengineering 84(2): 170-178.

Zumft (1997). "Cell biology and molecular basis of denitrification." Microbiol Mol Biol Rev 61(4): 533-616.