

Université du Québec
INRS- Institut Armand-Frappier

**CARACTÉRISATION DE LA COMMUNAUTÉ MICROBIENNE
PRÉSENTE DANS DES BIORÉACTEURS À OPÉRATION SÉQUENTIELLE
TRAITANT LE LISIER DE PORC EN ANAÉROBIE**

Par
Annie Verville

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Richard Villemur
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Richard Hogue
Institut de recherche et de développement
en agroenvironnement

Directeur de recherche

Jean-Guy Bisailon
INRS- Institut Armand-Frappier

Codirecteurs de recherche

Pierre Juteau
INRS-Institut Armand-Frappier

Daniel I. Massé
Centre de recherche et de développement sur
le bovin laitier et le porc
Agriculture et Agroalimentaire Canada

RÉSUMÉ


Le lisier de porc est une source de pollution importante au niveau de l'eau, de l'air et du sol. L'odeur qui s'en dégage représente un important problème de nuisance pour les communautés environnantes. Divers traitements ont été mis au point dans le but de rendre le lisier plus stable et facilement acceptable par la communauté. De tous les traitements disponibles, certains sont plus performants que d'autres ou mieux adaptés aux conditions climatiques du Québec. Une des façons de traiter le lisier est par la dégradation de la matière organique dans des conditions anaérobies par un consortium bactérien. Dans un tel traitement les produits finaux sont du biogaz composé de méthane et de dioxyde de carbone et du lisier stabilisé. Agriculture et Agro-alimentaire Canada a mis au point un procédé de traitement anaérobie du lisier de porc où la dégradation de la matière organique se fait à 20 °C en condition d'opération standard dans des bioréacteurs opérés en mode séquentiel. Bien que le traitement soit performant et stable, la microflore de ces réacteurs n'a jamais été caractérisée.

Le but de cette recherche est d'analyser la microflore présente dans les réacteurs et d'identifier les micro-organismes dominants dans la biomasse. La technique de l'électrophorèse sur gel à gradient de dénaturant («denaturing gradient gel electrophoresis», DGGE) a été utilisée comme technique d'empreinte génétique pour visualiser l'évolution de la microflore pendant le traitement du lisier. Pour identifier les bactéries présentes, les gènes codant l'ARNr 16S ont d'abord été amplifiés à partir de l'ADN génomique total extrait d'échantillons sélectionnés. Ces gènes ont ensuite été clonés, criblés, séquencés et comparés aux banques de données internationales. La microflore a été étudiée sur deux séries de réacteurs soit lors de l'étape de démarrage et sous des conditions normales de traitement. De plus, deux domaines bactériens ont été étudiés soit *Eubacteria* et *Archaea*.

Pour le domaine *Eubacteria*, les résultats ont démontré que les populations bactériennes varient dans les bioréacteurs en période de démarrage. D'autre part, elles sont stables lorsque les réacteurs fonctionnent en conditions normales de traitement lors d'un cycle de 50 jours. Quant à l'identification des communautés microbiennes majeures

lors du traitement, les 54 clones étudiés ont été rassemblés sous 20 groupes différents. Suite à l'analyse d'une séquence appartenant à chaque groupe, certains des genres dominants ont pu être identifiés, alors que d'autres n'ont pu l'être. Les affiliations les plus rapprochées ont été faites avec les genres *Bacteroides*, *Spirochete/Treponema*, *Acholeplasma*, *Caloramator* et avec le super groupe des *Clostridium*.

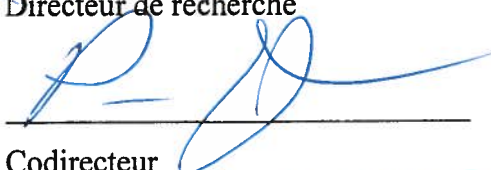
Pour le domaine des *Archaea*, il n'existe pas d'amorces qui soient universelles à ce domaine, il a donc fallu utiliser deux stratégies d'amplification avec deux paires d'amorces différentes. Pour la première stratégie, les profils des populations démontraient que ces dernières apparaissent vers la fin de la période de démarrage tandis que, pour la deuxième stratégie, les profils démontraient que les populations sont présentes tout au long de cette même période. Cependant, lorsque les réacteurs fonctionnaient en conditions normales de traitement, les profils des populations étaient très stables et cela pour les deux stratégies d'amplification. Le clonage des ADNr 16S appartenant au domaine des *Archaea* a démontré une diversité beaucoup moins élevée par rapport au domaine des *Eubacteria*. Pour ce qui est de la première génothèque de clones provenant des réacteurs en période de démarrage, les 43 clones étudiés ont été rassemblés sous 14 groupes différents avec comme genre dominant *Methanoculleus*. Il y a également les genres *Methanocorpusculum*, *Methanogenium* et *Methanosarcina* qui sont représentés. Quant à la deuxième stratégie d'amplification, les 44 clones étudiés ont été rassemblés dans 17 groupes différents sous les genres *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanobacterium* et *Methanosaeta*.



Étudiante



Directeur de recherche



Codirecteur



Codirecteur

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de maîtrise, Dr Jean-Guy Bisailon, qui m'a accueillie dans son laboratoire, ainsi que mon codirecteur de maîtrise, Dr Pierre Juteau, pour les conseils très judicieux et toujours appropriés. Je voudrais également remercier le Dr Daniel I. Massé qui m'a permis de faire deux stages dans son laboratoire au Centre de recherche sur le bovin laitier et le porc à Lennoxville et qui, par la suite, m'a offert ce projet de maîtrise. Merci également à toute l'équipe du groupe de Microbiologie de l'Environnement, plus spécialement au Dr Richard Villemur pour tout ce qui concerne la phylogénie.

Merci à Jacinthe, Roxane et Anne-Sophie pour l'année passée dans l'Association générale des étudiants(es) de l'Institut Armand-Frappier. Ces heures passées dans le local pour préparer les activités ne seront jamais oubliées.

Merci à toute ma famille qui m'a toujours encouragée dans mes études et un merci tout particulier à celui qui partage ma vie de tous les jours.

1.4. Identification des communautés microbiennes présentes dans des réacteurs anaérobies	27
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	30
2.1. Bioréacteurs à opération séquentielle (BOS)	31
2.2. Échantillonnage	33
2.3. Extraction de l'ADN génomique	34
2.3.1. Description des conditions testées	34
2.3.2. Visualisation de l'ADN	35
2.3.3. Protocole d'extraction retenu	35
2.3.4. Purification de l'ADN	35
2.3.5. Quantification de l'ADN	36
2.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	37
2.4.1. Solutions	37
2.4.2. Amorces	37
2.4.3. Conditions d'amplification	39
2.5. Électrophorèse sur gel à gradient linéaire de dénaturant (DGGE)	40
2.6. Génothèque de clones	41
2.6.1. Amplification des ADNr 16S	41
2.6.2. Formation des clones	42
2.6.3. Criblage des clones	44
2.6.3.1. DGGE	44
2.6.3.2. RFLP	44
2.7. Séquençage	45
3. RÉSULTATS	47
3.1. Analyse des acides gras volatils totaux dans les liqueurs mixtes	48
3.2. Lyse cellulaire	48
3.3. Domaine des <i>Eubacteria</i>	53
3.3.1. Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en période de démarrage	53
3.3.2. Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en conditions normales de traitement	57

3.3.3.	Criblage des clones	59
3.3.4.	Affiliations des groupes de clones	60
3.4.	Domaine des <i>Archaea</i>	70
3.4.1.	Utilisation de la première stratégie d'amplification	70
3.4.1.1.	Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en période de démarrage	70
3.4.1.2.	Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en conditions normales de traitement	74
3.4.1.3.	Criblage des clones	76
3.4.1.4.	Affiliations des groupes de clones	78
3.4.2.	Utilisation de la deuxième stratégie d'amplification	79
3.4.2.1.	Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en période de démarrage	79
3.4.2.2.	Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en conditions normales de traitement	84
3.4.2.3.	Criblage des clones	84
3.4.2.4.	Affiliations des groupes de clones	87
4.	DISCUSSION	89
4.1.	Lyse cellulaire	90
4.2.	Domaine des <i>Eubacteria</i>	90
4.2.1.	Choix des amorces	91
4.2.2.	Criblage de la génothèque de clones	91
4.2.3.	Analyse des arbres phylogéniques	92
4.2.4.	Analyse des profils	96
4.2.5.	Analyse des acides gras volatils	98
4.3.	Domaine des <i>Archaea</i>	99
4.3.1.	Choix des amorces	99
4.3.2.	Première stratégie d'amplification	100
4.3.2.1.	Criblage de la génothèque de clones	100
4.3.2.2.	Analyse de l'arbre phylogénique	101
4.3.2.3.	Analyse des profils	103

4.3.2.4. Analyse des acides gras volatils	104
4.3.3. Deuxième stratégie d'amplification	105
4.3.3.1. Criblage de la génothèque de clones	105
4.3.3.2. Analyse de l'arbre phylogénique	106
4.3.3.3. Analyse des profils	108
4.3.3.4. Analyse des acides gras volatils	108
4.4. Perspectives de recherche	109
CONCLUSION	111
APPENDICE A	114
APPENDICE B	117
APPENDICE C	120
APPENDICE D	123
APPENDICE E	126
APPENDICE F	129
APPENDICE G	132
APPENDICE H	135
RÉFÉRENCES	138

LISTE DES FIGURES

	PAGE
Figure 1 : Le processus de méthanogenèse.	16
Figure 2 : Bioréacteur à opération séquentielle (BOS) à l'échelle laboratoire d'un volume de 42 L.	31
Figure 3 : Suivi des acides gras volatils totaux des réacteurs en période de démarrage.	49
Figure 4 : Suivi des acides gras volatils totaux des réacteurs en conditions normales de traitement à une échelle laboratoire.	50
Figure 5 : Effet de l'EDTA sur la qualité de l'ADN extrait d'un échantillon de liqueur mixte.	50
Figure 6 : Effet de l'EDTA ajouté aux échantillons avant ou après leur congélation.	51
Figure 7 : Effet du temps de lyse sur des échantillons de liqueur mixte.	51
Figure 8 : Effet de la quantité de billes de verre et du ratio entre la solution d'extraction et la quantité d'échantillon dans la lyse cellulaire.	52
Figure 9 : Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 21, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage.	54
Figure 10 : Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 19, à l'échelle de 12 m ³ , pendant la période de démarrage.	55
Figure 11 : Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 24, à l'échelle de 160 m ³ , pendant la période de démarrage.	56
Figure 12 : Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 3, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement.	58
Figure 13 : Profil des <i>Eubacteria</i> des réacteurs # 3, # 4, # 5 et # 6, à l'échelle de 42 L, après 0, 24 et 50 jours en conditions normales de traitement.	59
Figure 14 : Profil de l'échantillon du réacteur # 3 au jour 24 et d'un représentant de chaque groupe de clones.	60
Figure 15 : Courbe de raréfaction de la génothèque de clones du domaine <i>Eubacteria</i> .	61
Figure 16 : Arbre phylogénique du groupe <i>Bacteroides</i> .	62

Figure 17 : Arbre phylogénique du groupe <i>Spirochete/Treponema</i> .	63
Figure 18 : Arbre phylogénique du groupe <i>Acholeplasma</i> .	64
Figure 19 : Arbre phylogénique du groupe <i>Caloramator</i> .	65
Figure 20 : Arbre phylogénique du groupe <i>Clostridium</i> .	66
Figure 21 : Arbre phylogénique du groupe P.	67
Figure 22 : Arbre phylogénique du groupe R.	68
Figure 23 : Arbre phylogénique du groupe K.	69
Figure 24 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 21, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage.	71
Figure 25 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 19, à l'échelle de 12 m ³ , pendant la période de démarrage.	72
Figure 26 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 24, à l'échelle de 160 m ³ , pendant la période de démarrage.	73
Figure 27 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 3, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement.	75
Figure 28 : Patrons des digestions des fragments des clones # 1 de la génothèque de clones Arch D et Arch G.	76
Figure 29 : Profil de l'échantillon du réacteur # 21 au jour 164 et d'un représentant de chaque groupe de clones obtenus avec la paire d'amorces Arch D et Arch G.	77
Figure 30 : Courbe de raréfaction de la génothèque de clones formée avec la paire d'amorces Arch D et Arch G.	78
Figure 31 : Arbre phylogénique de la génothèque de clones <i>Archaea</i> formée avec la paire d'amorces Arch D et Arch G.	80
Figure 32 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 21, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage.	81

Figure 33 :	Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 19, à l'échelle de 12 m ³ , pendant la période de démarrage.	82
Figure 34 :	Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 24, à l'échelle de 160 m ³ , pendant la période de démarrage.	83
Figure 35 :	Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 3, à l'échelle de 42 L, au cours du cycle en conditions normales de traitement.	85
Figure 36 :	Patrons des digestions des fragments du clones # 102 de la génothèque de clones Arch 69f et Arch 958r.	85
Figure 37 :	Profil de l'échantillon du réacteur # 21 au jour 164 et d'un représentant de chaque groupe de clones obtenus avec la paire d'amorces Arch 69f et Arch 958r.	86
Figure 38 :	Courbe de raréfaction de la génothèque de clones formée avec les amorces Arch 69f et Arch 958r.	87
Figure 39 :	Arbre phylogénique de la génothèque de clone <i>Archaea</i> formée avec la paire d'amorces Arch 69f et Arch 958r.	88
Figure A-1 :	Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 22, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage.	115
Figure A-2 :	Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 17, à l'échelle de 8 m ³ , pendant la période de démarrage.	115
Figure A-3 :	Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 18, à l'échelle de 2,5 m ³ , pendant la période de démarrage.	116
Figure A-4 :	Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 25, à l'échelle de 160 m ³ , pendant la période de démarrage.	116
Figure B-1 :	Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 4, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement.	118
Figure B-2 :	Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 5, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement.	118
Figure B-3 :	Profil des <i>Eubacteria</i> du réacteur # 6, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement.	119

Figure C-1 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 22, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage.	121
Figure C-2 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 17, à l'échelle de 8 m ³ , pendant la période de démarrage.	121
Figure C-3 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 18, à l'échelle de 2,5 m ³ , pendant la période de démarrage.	122
Figure C-4 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 25, à l'échelle de 160 m ³ , pendant la période de démarrage.	122
Figure D-1 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 4, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement.	124
Figure D-2 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 5, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement.	124
Figure D-3 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 6, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement.	125
Figure F-1 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 22, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage.	130
Figure F-2 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 17, à l'échelle de 8 m ³ , pendant la période de démarrage.	130
Figure F-3 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 18, à l'échelle de 2,5 m ³ , pendant la période de démarrage.	131
Figure F-4 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 25, à l'échelle de 160 m ³ , pendant la période de démarrage.	131
Figure G-1 : Profil des <i>Archaea</i> , ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 4, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement.	133

- Figure G-2 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 5, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. 133
- Figure G-3 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 6, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. 134

LISTE DES TABLEAUX

	PAGE
Tableau 1 : Amorces utilisées au cours de l'étude.	38
Tableau 2 : Quantité de billes de verre et ratio entre la solution d'extraction et le volume d'échantillon testés pour la lyse cellulaire.	52
Tableau E-1 : Groupes de clones formés pour la génothèque de clones Arch D-Arch G suite aux combinaisons des profils de digestion.	127
Tableau H-1 : Groupes de clones formés pour la génothèque de clones Arch 69f-Arch 958r suite aux combinaisons des profils de digestion.	136

LISTE DES ABRÉVIATIONS

# :	numéro
% A + T :	pourcentage en adénine et thymine
% G + C :	pourcentage en guanine et cytosine
% :	pour-cent
µg :	microgramme
µL :	microlitre
µm :	micromètre
µM :	micromolaire
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNr :	acide désoxyribonucléique ribosomale
ARN :	acide ribonucléique
ARNr :	acide ribonucléique ribosomal
BOS :	bioréacteurs à opération séquentielle
BSA :	bovin serum albumine (albumine de sérum de bovin)
CH ₄ :	méthane
cm :	centimètre
CO ₂ :	dioxyde de carbone
DCO :	demande chimique en oxygène
DCOS :	demande chimique en oxygène soluble
DCOT :	demande chimique en oxygène totale
DGGE :	denaturing gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel à gradient dénaturant)
EDTA :	éthylène-diaminetétra-acétate
<i>et al</i> :	<i>et alii</i>
f :	forward (direction 5' → 3')
g :	gramme
H ₂ :	hydrogène gazeux
HCl :	acide chloridrique
IPTG :	isopropythio-galactosidase

KCl :	chlorure de potassium
L :	litre
M :	molaire
m ³ :	mètre cube
mg :	milligramme
MgCl ₂ :	chlorure de magnésium
mL :	millilitre
mm :	millimètre
mM :	millimolaire
N ₂ O :	protoxyde d'azote
NaCl :	chlorure de sodium
NaOH :	hydroxyde de sodium
ng :	nanogramme
NH ₃ :	ammoniaque
NO ₃ :	nitrate
O ₃ :	ozone
° C :	degrès Celcius
p :	poids
pb :	paires de base
PBS :	phosphate buffer saline (tampon phosphate salin)
PCR :	polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
pmol :	picomol
r :	reverse (direction 3' → 5')
RFLP :	restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de taille de fragments de restriction)
rpm :	rotation par minute
SDS :	sodium dodecyl sulfate (sulfate de dodécyle de sodium)
SSCP :	single-strand-conformation polymorphism (polymorphisme de conformation des simples brins d'ADN)
SV :	solides volatils
TAE :	Tris-HCl + acétate + EDTA

Taq :	<i>Thermus aquaticus</i>
TE :	Tris + EDTA
Tm :	température de dissociation
TSA :	tryptic soy agar (agar tryptique de soya)
U :	Unités
U.V. :	ultra violet
UFC :	unités formatrice de colonies
v :	volume
V :	Volts
X-Gal :	X-galactosidase
λ :	lambda

INTRODUCTION

La production porcine est en pleine expansion partout dans le monde. En 1999, la production globale était estimée à 926 millions de porcs (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999), alors qu'au Québec, en 2001, la production a atteint 6,9 millions de porcs (FPPQ, 2002). L'expansion de l'industrie porcine génère donc un volume de lisier de plus en plus important puisque chaque porc produit en moyenne une demie-tonne de lisier. En 1998, la quantité de lisier produit au Canada était estimée à plus de 24,4 millions de tonnes par année (Gouvernement du Canada, 1998). Or, le lisier, lorsque mal géré, peut être une source de polluants extrêmement importante causant de nombreux problèmes environnementaux.

La pratique agricole usuelle concernant la gestion du lisier est de l'utiliser comme agent fertilisant sur les terres agricoles. Cependant, puisqu'il est produit en trop grande quantité dans certaines régions et que certains producteurs l'épandent en totalité sur leurs terres agricoles, celles-ci sont surfertilisées. Le surplus risque de se retrouver dans l'environnement causant des problèmes majeurs après l'épandage dus à la forte odeur qui s'en dégage, à la concentration élevée de la matière organique, de l'azote et du phosphore et à la présence des pathogènes. La matière organique et les éléments fertilisants entraînent l'eutrophisation des eaux de surface, tandis que la présence des pathogènes représente un risque pour la santé des animaux et des humains. Pour diminuer les effets néfastes du lisier sur l'environnement, il est possible de rendre celui-ci moins polluant. Pour ce faire, des traitements ont été mis au point. Les buts des traitements sont, entre autres, de réduire les odeurs, la concentration de la matière organique et des pathogènes, ainsi que de concentrer les éléments fertilisants présents dans le lisier. Les traitements disponibles peuvent être d'ordre physique, chimique ou biologique. Plusieurs études ont porté sur ces différents traitements. Pour notre part, nous avons étudié le traitement biologique en conditions anaérobies. Le traitement biologique anaérobie est basé sur la méthanogenèse qui consiste en la dégradation de la matière organique en biogaz, soit un mélange composé en majorité de méthane et de dioxyde de carbone. En se basant sur ce processus, Massé *et al.* (1996) ont mis au point des bioréacteurs opérés en mode

séquentiel dégradant le lisier de porc dans des conditions anaérobies où la température est maintenue à 20 °C. La performance et la stabilité de ces réacteurs ont été étudiées et sont maintenant documentées. Par contre, la microflore impliquée dans ce procédé n'a pas été analysée.

Le sujet de cette recherche portait sur l'étude de la communauté microbienne présente dans les bioréacteurs à opération séquentielle (BOS) mis au point par Massé *et al.* (1996) pour la dégradation du lisier de porc en anaérobie. D'autres chercheurs ont étudié les micro-organismes dans des réacteurs qui dégradent le lisier de porc en anaérobie. Par contre, les températures de fonctionnement de ces réacteurs étaient à 30 °C ou plus. Or, ce paramètre influence nécessairement la composition de la biomasse. Nous supposons alors que la communauté microbienne présente dans les BOS serait différente de la microflore présente dans les systèmes fonctionnant à des températures plus élevées. Les objectifs généraux de la recherche étaient donc d'analyser l'évolution de la microflore présente dans les réacteurs lors du traitement du lisier et d'identifier les micro-organismes dominants présents dans la biomasse.

Pour ce faire, deux tactiques d'analyses ont été utilisées. La première consistait en l'analyse de la microflore, prélevée à différents moments lors du traitement du lisier, au moyen d'une méthode d'empreinte génétique. La deuxième façon était le séquençage de l'ADN des gènes codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S) clonés à partir d'échantillons sélectionnés sur la base des analyses par empreinte génétique. La microflore a été étudiée sur deux séries de réacteurs. Une série était en période de démarrage avec des températures de fonctionnement de 27-28 °C et dont la particularité était les différentes échelles, soit laboratoire, semi-industrielle et commerciale. L'autre série fonctionnait en conditions normales de traitement à 20 °C à l'échelle laboratoire avec une microflore adaptée à la dégradation du lisier de porc. De plus, dans la communauté microbienne des réacteurs, il y avait deux domaines bactériens présents soit les *Eubacteria* et les *Archaea*. Ces deux domaines ont été étudiés selon les deux stratégies d'études (empreinte génétique et clones) et pour chaque série de réacteurs.

L'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant («denaturing gradient gel electrophoresis», DGGE) a été la méthode d'empreinte génétique retenue. Cette méthode permettait de voir sur gel de polyacrylamide la diversité et l'évolution de la microflore pendant le traitement. En effet, les changements dans les patrons des bandes, chaque bande représente en théorie une population, indiquaient que la microflore était en changement. À partir de cette information, nous pouvions déduire que certaines populations pouvaient être plus ou moins importantes dans le traitement. Quant à la stratégie de séquençage, il a fallu produire des génothèques de clones pour les deux domaines bactériens présents dans la biomasse. Chaque clone potentiellement différent a été isolé et son ADNr 16S a été séquencé. Les informations obtenues suite au séquençage permettaient de déterminer à quel groupe bactérien appartenaient les clones. De plus, une analyse phylogénique a permis d'établir des liens entre les bactéries dominantes présentes dans la microflore des BOS et les micro-organismes connus.

L'étude de l'évolution de la microflore permet de joindre de nouvelles informations à celles déjà disponibles sur les BOS. Elle ouvre également la porte à l'élaboration de nouveaux outils de suivi des traitements, par exemple l'élaboration de sondes spécifiques à certaines populations d'intérêt. De tels outils pourraient être utilisés pour faire des diagnostics éclairés lors d'expérience visant à raccourcir la période de démarrage. Les connaissances acquises au cours du présent travail pourront ainsi servir à l'amélioration du procédé de traitement du lisier de porc.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Le lisier

1.1.1. Pratique agricole

Les pratiques agricoles concernant la gestion du lisier au Canada sont très variables d'une province à l'autre. À l'heure actuelle au Québec, les producteurs entreposent le lisier durant la saison hivernale et l'utilisent au printemps pour enrichir leurs terres. Cette méthode comporte deux problèmes majeurs. Premièrement, les éléments fertilisants ne sont pas balancés par rapport au besoin des cultures. Ces dernières se retrouvent avec un surplus en phosphore lors de l'application du lisier sur les terres agricoles (Donham, 2000; Massé, 1998). Selon un document d'Agriculture et Agro-alimentaire Canada (Gouvernement du Canada, 1998), des études ont démontré des pertes en phosphore par le ruissellement, même si les taux d'épandage recommandés étaient respectés. Toujours selon ce document, des bassins hydrographiques de régions à concentration élevée de fermes porcines se retrouvent avec un surplus de phosphore. Les sédiments de ces bassins sont saturés, puisque le seuil d'absorption du phosphore, qui est de 0,03 mg/L, est dépassé. Le retour à des concentrations normales de phosphore dans le sol peut être très long.

Le deuxième problème vient du fait que certains producteurs n'ont pas assez de superficies pour épandre la totalité du lisier produit par leurs porcs. Suite à une étude, il a été estimé qu'environ 3 000 fermes au Québec n'ont pas assez de superficies pour épandre le lisier produit (Gouvernement du Canada, 1998). Certaines terres sont disponibles, mais celles-ci sont souvent éloignées ce qui les rend inintéressantes compte tenu des coûts élevés pour le transport du lisier. De plus, l'épandage ne peut pas se faire de n'importe quelle façon. En effet, les producteurs doivent respecter des règlements établis par le Ministère de l'Environnement du Québec à propos de l'épandage des déjections animales. D'ailleurs, un règlement sur les déjections animales a été promulgué par le Gouvernement du Québec le 12 juin 2002 pour limiter le rejet du lisier aux cours d'eau et ainsi essayer de réduire les problèmes qui y sont reliés (Gouvernement du Québec, 2002). En bref, le *Règlement sur les exploitations agricoles* assure la protection

de l'environnement (eau, sol) contre la pollution causée par certaines activités agricoles. Le règlement se concentre d'abord sur les normes de gestion des déjections animales en ce qui a trait à leur entreposage, leur épandage et leur traitement. L'épandage des déjections animales est permis seulement pour fertiliser le sol d'une parcelle en culture et doit être fait en conformité avec un plan agroenvironnemental de fertilisation. Ce plan est établi en fonction de la capacité du sol et du type de culture de la parcelle en question. De plus, tout exploitant de lieu d'élevage doit faire un bilan de phosphore en établissant le volume annuel de production de phosphore du cheptel combiné à celui de toute autre matière fertilisante utilisée de même que le volume qui peut être épandu sur les terres disponibles. Un exploitant dont le lieu d'élevage est reconnu excédentaire en phosphore doit prendre des mesures nécessaires pour réduire ce dépassement en disposant des surfaces requises pour 100 % de la charge en phosphore à compter du 1^{er} avril 2010. Enfin, un moratoire de deux ans a été décrété sur 281 municipalités du Québec où toute nouvelle exploitation porcine est interdite. Pour ce qui est des autres municipalités, aucune autorisation de nouveaux lieux d'élevage porcin ne sera donnée, à moins que le lisier subisse un traitement complet. Par ailleurs, tout exploitant ne respectant pas le règlement se verra recevoir une amende allant de 2 000 à 500 000 \$ pour un manquement à une des dispositions environnementales.

1.1.2. Composition, propriétés et problématique du lisier

Le lisier est un mélange liquide, non homogène, composé d'urine, de fèces et d'eau provenant des abreuvoirs et des résidus alimentaires (Massé, 1998). Sa teneur en matière sèche est inférieure à 10 % (p/v). La composition du lisier est affectée par plusieurs facteurs tels que l'âge de l'animal, son alimentation, sa consommation en eau, l'ambiance à l'intérieur du bâtiment et le climat. Après l'excrétion, la composition du lisier est grandement affectée par le mode de manutention, le type d'entreposage et l'activité biologique des micro-organismes présents dans le lisier (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999). D'une ferme à l'autre, le lisier ne possède pas la même composition.

Une des propriétés du lisier est sa concentration élevée en matière organique. Exprimée en demande chimique en oxygène (DCO), elle varie entre 70 000 et 200 000 mg/L (Massé, 1998). La grande quantité de matière organique présente dans le lisier cause des problèmes environnementaux importants. La matière organique soluble est acheminée dans les eaux de surface par ruissellement ce qui contribue à l'augmentation de la concentration de la matière organique dans l'eau. Lorsqu'elle est dégradée par les micro-organismes anaérobies, il y a formation de composés malodorants tel le sulfure d'hydrogène, l'ammoniac, les acides gras volatils, etc. (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999). De plus, la teneur en oxygène dans l'eau est réduite, puisque les micro-organismes utilisent l'oxygène dissout pour décomposer la matière organique. Il s'ensuit une chaîne d'événements qui modifie le plan d'eau et accélère son vieillissement (Massé, 1998). La couleur, la turbidité et le goût de l'eau sont modifiés en plus de causer la mort des organismes vivants dans l'eau. La dégradation en conditions anaérobies de la matière organique cause non seulement l'eutrophisation des eaux de surface, mais également l'émission de gaz à effet de serre, plus particulièrement le méthane (CH₄) (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999; Donham 2000; Massé, 1998). En effet, toutes les déjections animales, y compris le lisier de porc, contribuent à 5 % de l'émission globale de CH₄ (Kaharabata, Schuepp et Desjardins, 1998). En ce qui concerne le lisier, le phénomène se passe lorsqu'il est entreposé dans les caniveaux et les structures. À ce moment, il y a une légère dégradation anaérobie, ce qui résulte en une faible production de biogaz comprenant environ 20 % de CH₄. De plus, ce gaz a un potentiel de réchauffement 23 fois plus élevé que le dioxyde de carbone (CO₂) (Houghton *et al.*, 2001).

Les teneurs élevées des éléments fertilisants présents dans le lisier, tels que l'azote, le phosphore et le potassium, sont la cause de nombreux problèmes reliés à l'environnement. Les concentrations de ces éléments varient d'une industrie porcine à l'autre allant de 4 à 9,5 g/L pour l'azote total et de 1 à 3 g/L pour le phosphore (D.I. Massé, Agriculture et Agro-Alimentaire Canada, communication personnelle). L'azote total présent dans les fèces provient des protéines non digérées des aliments, de l'animal lui-même et des micro-organismes présents dans les intestins (Jongbloed et Lenis, 1998). Ce sont toutes ces formes d'azote qui causent des dommages

environnementaux (Jongbloed et Lenis, 1998; Massé, 1998). L'urée, présente dans l'urine, est rapidement convertit en ammoniacque (NH_3). Sous cette forme, l'azote est très volatil. D'ailleurs, une étude en Colombie-Britannique a estimé que 40 % de l'azote excrété par les porcs était perdu dans l'atmosphère sous cette forme (Gouvernement du Canada, 1998). Ce relâchement du NH_3 dans l'atmosphère contribue au phénomène des gaz à effet de serre et sous sa forme oxydée, aux pluies acides (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999). De plus, le NH_3 est toxique dans les eaux de surface, puisqu'une concentration aussi basse que 0,08 mg/L peut tuer les poissons. En plus de causer des problèmes environnementaux, le NH_3 contribue à des problèmes de santé pour les producteurs de porcs et pour les animaux tels que des irritations des yeux, des problèmes respiratoires et des maladies chroniques (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999). Quant au nitrate (NO_3), présent dans le sol suite à la nitrification du NH_3 , il représente un risque pour la faune aquatique, car sa valeur tolérée dans l'eau de 50 mg/L est souvent dépassée (Jongbloed et Lenis, 1998). L'eau devient alors impropre et non recommandable pour la consommation humaine. L'excès de NO_3 dans l'eau causera deux effets majeurs pour la santé humaine, soit la méthémoglobinémie et des risques de cancer (Donham, 2000). La présence simultanée du NH_3 et du NO_3 dans les eaux de surface causera la croissance des algues et des plantes aquatiques qui utiliseront en partie l'oxygène présent. De plus, la décomposition des algues et des plantes amènera des conditions anaérobies ce qui causera la mort des poissons et de toute autre vie aquatique (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999). À long terme, ces conditions causeront l'eutrophisation des eaux de surface. La combinaison du NH_3 et du NO_3 dans l'atmosphère a également un impact direct sur la santé humaine. Cette combinaison apporte une formation de particules de nitrate d'ammonium qui contribuent au smog, donc à des problèmes respiratoires (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999). L'azote peut également être présente sous forme de protoxyde d'azote (N_2O). Le N_2O est un gaz à effet de serre important, puisque son potentiel de réchauffement de la planète est de 296 fois supérieure à celui du CO_2 (Houghton *et al.*, 2001).

Quant au phosphore, il provoque principalement l'eutrophisation des eaux de surface. Son application en trop grande quantité sur les terres amène son ruissellement

vers les eaux de surface. Le phosphore cause alors une prolifération des algues dans l'eau. Leur croissance accrue empêche la croissance des autres organismes et une diminution de la teneur en oxygène, ce qui entraîne la perte du cours d'eau (Jongbloed et Lenis, 1998; Massé, 1998).

L'effet du potassium se fait surtout ressentir sur les cultures de fourrages puisqu'il déplace le magnésium et le calcium présents dans le sol. Ainsi, les cultures de fourrage n'ont plus ces éléments essentiels pour leur croissance. Cette carence en magnésium et calcium affecte la santé des bovins laitiers (Massé, 1998).

La propriété la plus caractéristique du lisier est l'odeur qui s'en dégage. Elle est due à de nombreux composés de nature complexe. Il existerait entre 70 et 150 composés qui causeraient la mauvaise odeur du lisier (Gouvernement du Canada, 1998; Louhelainen *et al.*, 2001). La majorité des composés proviendrait de la dégradation de la fraction organique des fèces et de l'urine lorsque le lisier est entreposé dans les fosses sous des conditions anaérobies (Gouvernement du Canada, 1998; Zhu, 2000). Les composés responsables des odeurs sont, entre autres, les acides gras volatils, les indoles, le phénol, l'ammoniac, les alcools, les aldéhydes, les carbonyles, les esters, les composés amines et soufrés volatils (Donham, 2000; Zhu, 2000). Des études ont démontré que les principaux groupes de micro-organismes présents dans le lisier et responsables de sa fermentation sont des coques à Gram-positif, des *Eubacterium*, des *Lactobacillus*, des bâtonnets Gram-négatifs, des *Clostridium*, des *Propionibacterium* et des *Bacteroides* (Zhu, 2000). La présence de l'odeur est un problème majeur. En effet, c'est une odeur forte qui se répand rapidement et loin de la porcherie, surtout après l'épandage du lisier. D'ailleurs cet aspect de la production porcine est responsable de plus de 90 % des plaintes par le voisinage des fermes porcines (Gouvernement du Canada, 1998). L'intensité des odeurs est très variable. Elle dépend du type d'installation de production et de son importance, des méthodes de production, de l'emplacement de l'unité et la topographie locale, de la saison et du climat, du moment de la journée, de la direction et la force du vent et finalement de la turbulence de l'air (Gouvernement du Canada, 1998). De plus, la présence de poussières dans les installations agricoles augmente la perception des odeurs puisqu'elles

sont plus concentrées sur une fine particule. Il a été démontré que les odeurs du lisier ne sont pas seulement une nuisance mais peuvent également être une cause de certains problèmes chez les humains tels que des irritations des yeux, du nez, des nausées, des maux de tête, des troubles de sommeil, des dérangements d'estomac, des pertes d'appétit et même des dépressions (Donham 2000; Gouvernement du Canada 1998). Les torts causés chez les producteurs porcins sont des maladies pulmonaires comme la bronchite chronique, l'asthme et même des lésions aux poumons.

Une problématique importante concernant le lisier est la présence des pathogènes. Ce sont soit des bactéries, des virus ou des protozoaires (Pagilla, Kim et Cheunbarn, 2000). Les principales bactéries pathogènes retrouvées dans le lisier sont *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Listeria* et *Helicobacter* (Bicudo, Goyal et Zhu, 2000; Donham, 2000). Quant aux protozoaires, ce sont *Cryptosporidium* et *Giardia*. Ce n'est pas seulement le pathogène qui est dangereux, les endotoxines et les glucanes, sous formes d'aérosols, peuvent également causer des problèmes de santé (Donham, 2000). Certains pathogènes peuvent persister longtemps dans le lisier dépendant des conditions tels que la teneur en solide, la température de l'entreposage et le type de pathogènes. Expérimentalement, lorsqu'il y a réduction de la température et augmentation des solides, la survie des pathogènes est plus élevée (Bicudo, Goyal et Zhu, 2000). Par contre, la dessiccation, les rayons du soleil, un pH bas, un haut taux d'osmolarité et une haute concentration de NH_3 entraînent une mort rapide de certains pathogènes (Donham, 2000). Les pathogènes présents dans le lisier peuvent causer différentes maladies importantes chez l'homme tels que la diarrhée chronique, la salmonellose, la cryptosporidiose et la giardiose (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999). L'homme s'infecte suite à un contact avec de l'eau elle-même contaminée. Cette contamination provient du ruissellement des pathogènes des terres agricoles vers les sources d'eau potable. Les mouvements des bactéries et des virus sont influencés par plusieurs facteurs environnementaux tels que la température, la pression osmotique, la pression hydrostatique, le pH et le potentiel redox (Bicudo, Goyal et Zhu, 2000).

Finalement, l'épandage du lisier brut amène une accumulation de cuivre et de zinc dans le sol. Ces deux éléments sont ajoutés dans la nourriture des animaux en plus grande quantité que ces derniers sont capables de métaboliser. Il y a donc un rejet important de cuivre et de zinc dans les fèces. Lorsque le lisier est appliqué de façon excessive sur les terres, ces éléments se retrouvent en surplus dans l'environnement. Le cuivre et le zinc engendrent des problèmes pour la croissance des plantes, pour l'écosystème des sols et un risque potentiel pour la santé des animaux et des hommes (Donham 2000; Jongbloed et Lenis, 1998). De façon générale, l'accumulation de ces éléments dans l'environnement signifie une contamination dans la chaîne alimentaire. Tous les organismes vivants sont affectés par cette accumulation.

1.2. Traitements existants

Puisque le lisier de porc est une source de pollution très importante, différents procédés ont été mis au point dans le but de le traiter. Cependant, il n'existe pas à ce jour un traitement qui soit standard pour toutes les porcheries, mais il en existe plusieurs en développement. D'ailleurs plusieurs promoteurs du Québec ont développé des systèmes pour le traitement du lisier. Un groupe de travail a évalué ces différents traitements en tenant compte de différents critères liés à l'environnement, à la santé des animaux et des travailleurs, aux conditions sociales et des aspects agronomiques, techniques et économiques (Groupe de travail «Transfert technologique», 2001). Par exemple, l'évaluation tient compte des émissions des gaz à effet de serre, des émissions d'ammoniac, des odeurs et aussi de la valeur agronomique des résidus de traitement. Les traitements doivent s'adapter au climat du Québec, tout en étant le plus économique possible et ayant une longue vie utile. Il faut noter cependant que le comité n'a pas évalué tous les traitements existants. D'autres sont disponibles autant au Québec qu'ailleurs dans le monde. Les traitements disponibles sur le marché se séparent en trois catégories : physique, chimique et biologique.

1.2.1. Traitements physiques

Une solution simple au traitement du lisier est de séparer les solides des liquides. Suite à la séparation, les deux fractions peuvent alors être utilisées séparément. La fraction liquide, qui contient plus d'azote mais moins de phosphore, peut être épandue sur les terres. La fraction solide, qui au contraire est concentrée en phosphore, peut être compostée et transportée sur de grandes distances. Il existe des séparateurs naturels (bassin de sédimentation) et mécaniques (tamis, presse rotative, vis sans fin, rouleau) (Gouvernement du Canada, 1997; Massé, 1998). La filtration est également reconnue pour séparer les solides des liquides. Cependant, le lisier de porc est un composé où la grande quantité de matière organique ne favorise pas la filtration dû aux risques de colmatage (Gouvernement du Canada, 1997). Cependant, il est possible d'utiliser une ultrafiltration sur la partie liquide du lisier. L'ultrafiltration consiste à retenir la majorité des matières en suspension à l'intérieur d'un liquide concentré (Groupe de travail «Transfert technologique», 2001). La partie filtrée est moins concentrée et contient les matières dissoutes. Ces dernières peuvent être concentrées par une unité d'osmose inverse. Quant à l'oligolyse, c'est un traitement qui consiste à générer des ions métalliques par l'électricité. Ces ions détruisent les micro-organismes responsables de la formation des composés malodorants comme le soufre (Duval, 1992). Ce moyen est donc efficace seulement pour éliminer certaines odeurs. Il est également possible d'utiliser des moyens tels que l'entreposage du lisier dans des fosses qui peuvent être recouvertes. Ces moyens ne sont pas des traitements, mais ils permettent de mieux faire accepter l'industrie porcine par les voisins.

1.2.2. Traitements chimiques

Le but des procédés chimiques est de modifier la nature chimique du lisier pour en diminuer les odeurs. Ces procédés se font de différentes façons. D'abord en oxydant le lisier, c'est-à-dire en faisant perdre des électrons aux molécules organiques. Il est possible d'utiliser des peroxydes, des permanganates et des persulfates, produits qui sont cependant eux-mêmes dangereux pour l'environnement puisqu'ils génèrent des gaz

toxiques (Duval, 1992; Gouvernement du Canada, 1997). L'ajout de ces agents chimiques pourrait également réduire les pathogènes présents dans le lisier (Bicudo, Goyal et Zhu, 2000). Il est également possible d'utiliser de l'ozone (O₃) qui désinfecte le liquide en réagissant avec les autres composés (Gouvernement du Canada, 1997). Les modifications de pH sont également possibles dans le but de créer des conditions défavorables à l'activité de certains micro-organismes. Ces modifications se font soit avec de la chaux pour augmenter le pH ou des acidificateurs tels que de l'acide sulfurique ou phosphorique pour le diminuer (Duval, 1992). Le problème avec l'ajout de la chaux, c'est qu'elle entraîne une grande perte d'azote sous forme d'ammoniaque. Des huiles aromatiques sont parfois utilisées pour camoufler les odeurs (Duval, 1992). Cependant, l'utilisation de ces huiles est dispendieuse et les composés formant les odeurs ne sont pas éliminés pour autant.

1.2.3. Traitements biologiques

Puisque les traitements physiques et chimiques ne permettent pas pour la plupart une stabilisation complète du lisier brut, c'est-à-dire un lisier où les odeurs, la charge organique et les pathogènes sont diminués ou éliminés, des traitements basés sur la dégradation biologique du lisier ont été mis au point. Il existe différents types de traitements biologiques où toutes les réactions sont catalysées par des micro-organismes.

1.2.3.1. Élevage sur litière et compostage

L'élevage sur litière utilise des planchers recouverts de sciure de bois, de paille ou de toutes substances augmentant la teneur en matière sèche du lisier (Massé, 1998). À cette matière sont ajoutés des enzymes, des protéines, des vitamines et des minéraux dans le but d'augmenter l'activité biologique des bactéries naturellement présentes et ainsi favoriser la dégradation partielle du lisier (Gouvernement du Québec, 2001). La litière peut être profonde, accumulée ou mince. Le principe de base reste toujours le même, c'est l'épaisseur de la litière qui est différente ainsi que les manœuvres dans la porcherie. Pour une dégradation complète de la matière organique, il doit y avoir compostage de la

litière. La température joue un rôle important dans le compostage, car si les réactions de dégradation se font naturellement, les températures doivent atteindre entre 30 et 50 °C. Pour obtenir une bonne dégradation, il faut tenir compte de certains facteurs tels qu'une aération adéquate, un taux d'humidité entre 50 et 70 % (si le taux est trop élevé, il y aura des zones d'anaérobies, par contre si le taux est trop bas, il y aura une baisse de l'activité bactérienne), un pH approprié et un brassage constant du mélange. L'élevage sur litière représente cependant moins de 1 % de la production porcine au Québec (CDPQ, 1999). Il est aussi possible d'utiliser des technologies de compostage pour le lisier des élevages standards (sur plancher de ciment ou latté), mais le même type de matière absorbante (sciure de bois, paille, etc.) doit alors être ajouté.

1.2.3.2. Traitements aérobies

Le traitement aérobie classique, nommé boues activées, a comme but principal l'oxydation de la matière organique. La matière organique est transformée en CO₂ et en eau. Le lisier traité est stable et ne dégage plus d'odeur. Les traitements se font à température ambiante. Le bassin est aéré par l'injection d'air ou par un brassage mécanique (Atlas et Bartha, 1998). L'activité microbienne est maintenue à des hauts niveaux de dégradation par la réintroduction d'une partie de la boue sédimentée dans le bassin aéré. Durant la période de maintenance, il y a un développement vigoureux de micro-organismes hétérotrophes dans le bassin aéré qui prend place. Durant cette période, une portion de la matière organique sera minéralisée, tandis qu'une autre portion est convertie en biomasse microbienne. Les boues seront séparées par sédimentation, dû à la formation de floccs. Le principal inconvénient d'utiliser un tel procédé est la formation en grande quantité de boue qui doit être disposée soit par incinération, par traitement anaérobie ou par compostage.

Il y a également la biofiltration qui consiste à utiliser un filtre fabriqué de matériaux poreux où les micro-organismes dégradeurs y forment un biofilm (Atlas et Bartha, 1998). Une technologie appelée Biosor^{md} (Groupe de travail «Transfert technologiques», 2001) utilise la biofiltration pour traiter le lisier de porc. La partie

liquide du lisier coule par lixiviation sur le biofilm et les micro-organismes dégradent la matière. L'effluent traité est recueilli et peut être rejeté dans un champ d'épuration ou entreposé et valorisé. Différents biofiltres peuvent être utilisés, par exemple un pour le traitement et un autre pour le polissage. Le principal inconvénient de ce système se constate lorsqu'il y a une surcharge en nutriments ou une forte charge en matière insoluble. En effet, cela apporte un excès de micro-organismes sur le support, ce qui amène une réduction de l'aération et de la percolation de l'affluent. Un renouvellement du support est alors nécessaire.

Un autre bioprocédé aérobie est le traitement thermophile, qui se fait à haute température. Il offre plusieurs avantages dont celui d'obtenir un haut taux d'oxydation, ce qui implique que des réacteurs de plus petit volume peuvent être suffisants, de détruire rapidement les principales bactéries pathogènes, les virus, les parasites et également de détruire les graines de mauvaises herbes (Beaudet *et al.*, 1990; Bicudo, Goyal et Zhu, 2000). Dans ce type de traitement, les réactions biochimiques sont exothermiques, donc la température à l'intérieur du réacteur reste élevée, même si la température à l'extérieur est basse. Il n'est donc pas nécessaire de fournir d'énergie externe pour maintenir la température interne. De plus, ce type de traitement est résistant aux différences de charges organiques qui peuvent survenir (Rozich et Colvin, 1997). Le principal problème rencontré dans ce type de traitement est la difficulté à séparer les solides du liquide (Lapara et Alleman, 1998). Si une telle séparation est souhaitée, il faut généralement utiliser une séparation mécanique, par exemple une ultrafiltration ou une centrifugation, pour réussir à séparer les deux composantes.

1.2.3.3. Traitements anaérobies

Il est possible de dégrader le lisier de porc dans des conditions anaérobies, donc sans oxygène. Dans ce type de traitement la matière organique est dégradée en CH₄ et en CO₂ (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999; Dague, Habben, et Pidaparti, 1992; Massé *et al.*, 1996; Massé, 1999; Nozhevnikova, Kotsyurbenko et Parshina, 1999; Zhang, *et al.*, 1997). Cette dégradation comprend quatre étapes principales (Figure 1) soit l'hydrolyse,

la fermentation, l'acétogenèse et la méthanogénèse. Les étapes sont catalysées par des bactéries hydrolytiques et fermentaires, des acétogènes et des méthanogènes (Garcia, Patel et Olivier, 2000; Massé et Droste, 2000).

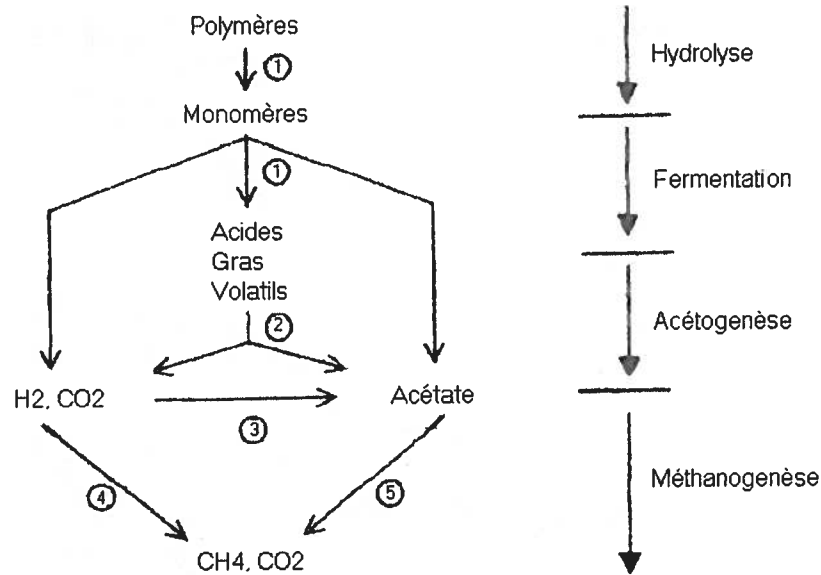


Figure 1 : Le processus de méthanogénèse. Modifié de Schink, 1997. Légende :
 1) bactéries fermentaires et hydrolytiques. 2) acétogènes productrices H₂.
 3) acétogènes consommatrices H₂. 4) méthanogènes hydrogénotrophes.
 5) méthanogènes acétotrophes.

Simultanément, les micro-organismes hydrolytiques et fermentaires hydrolysent les polymères complexes pour former des sucres, des acides aminés, des alcools et des acides gras volatils dont les acides acétique, propionique, butyrique, valérique et caproïque. Lors de cette étape, il y a également production d'hydrogène gazeux (H₂), de CO₂ et d'acétate. Cependant, c'est la formation des acides gras volatils qui prédomine. Lors de l'acétogenèse, les acétogènes productrices de H₂ utiliseront les acides gras volatils, ayant un poids moléculaire plus élevé que l'acide acétique, pour former d'une part du H₂, du CO₂ et d'autre part de l'acétate. Toujours lors de l'acétogenèse, un deuxième groupe d'acétogènes, les acétogènes consommatrices de H₂, convertira le H₂ et le CO₂ en acétate. L'utilisation des acides gras volatils par les acétogènes empêche la

diminution du pH dans le milieu, puisqu'un pH acide entraînerait un ralentissement de certaines fermentations essentielles à la dégradation de la matière. La méthanogenèse se réalise avec l'aide de deux groupes de méthanogènes. Premièrement, les méthanogènes hydrogénotrophes convertissent le H₂ et le CO₂ en CH₄. Enfin, les méthanogènes acétotrophes convertissent l'acétate en CH₄. Il est à noter qu'il existe une relation syntrophe entre les acétogènes productrices de H₂ et les méthanogènes hydrogénotrophes. La réaction de formation de l'acétate et du H₂ est thermodynamiquement défavorable pour les acétogènes. Cependant, puisque les méthanogènes utilisent le H₂ pour former le CH₄, la somme des deux réactions devient favorable énergétiquement. La proximité des bactéries dans les agrégats aide au transfert du H₂ entre les espèces. Pour une dégradation complète de la matière, toutes les étapes doivent être effectuées. Ce type de dégradation doit se faire en absence totale d'oxygène, puisque les micro-organismes catalysant les réactions biochimiques sont très sensibles à l'oxygène, en particulier les méthanogènes. Dans ce consortium, deux domaines microbiens sont présents soit le domaine des *Eubacteria* (bactéries hydrolytiques, fermentaires et acétogènes) et le domaine des *Archaea* (méthanogènes).

Il existe plusieurs avantages à utiliser un système en anaérobie pour dégrader le lisier de porc. Premièrement, il y a réduction de l'émission des mauvaises odeurs. En effet, les composés volatils responsables des mauvaises odeurs dans le lisier sont convertis en biogaz, duquel le CH₄ peut être récupéré. Deuxièmement, le lisier devient stable dû à une dégradation de la matière organique facilement dégradable. Ainsi, son potentiel de pollution est plus faible pour les eaux de surface et souterraine suite à son épandage. Troisièmement, il y a moins de boues générées comparativement à un traitement aérobie. Enfin, la qualité agronomique du lisier suite au traitement est augmentée puisque l'azote et le phosphore présents sont minéralisés pour devenir plus accessible aux cultures de fourrages (Massé *et al.*, 1996).

Les traitements anaérobies ont été testés sous différentes températures soit thermophile, mésophile et psychophile. Chaque température offre des avantages et des inconvénients (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999). À une température thermophile (de

50 à 60 °C), la taille du réacteur peut être plus petite et les pathogènes sont tous détruits pendant le processus de dégradation. Cependant, beaucoup d'énergie est dépensée pour assurer la stabilité de la température. À une température inférieure à 10 °C, de très long temps de rétention sont nécessaires et l'inoculum de départ doit être acclimaté à une température basse lors de la période de démarrage. Habituellement, les traitements anaérobies se font à des températures mésophiles (30 à 40 °C). À ces températures, il est plus facile de contrôler les fluctuations, les réacteurs sont plus stables, ils demandent moins d'énergie, mais doivent être plus volumineux que les réacteurs thermophiles. Un groupe de chercheurs (Zhang, Yin et Dague, 1997) ont prouvé l'efficacité du traitement anaérobie de déchets de porcherie à une température de 25 °C. Les résultats ont démontré qu'en trois jours la matière organique était dégradée de façon efficace lorsque le taux de chargement était entre 0,9 et 5,5 g de solides volatils/L/jours. Agriculture et Agro-alimentaire Canada a aussi développé un bioprocédé anaérobie pouvant fonctionner à 20 °C (Massé *et al.*, 1996). Celui-ci sera présenté en détails à la section 1.2.4.

Une particularité des traitements anaérobies est la lenteur à laquelle doit se faire la période de mise en service des réacteurs. En effet, le démarrage en anaérobie s'étend sur plusieurs mois comparativement à quelques semaines en aérobie. Ceci s'explique par le fait qu'il est important de laisser le temps aux acétogènes et aux méthanogènes de bien s'implanter dans les réacteurs. Or, ces micro-organismes ont une croissance beaucoup plus lente que les bactéries fermentaires. De plus, un débalancement dans la population microbienne peut apporter des taux d'acides gras volatils et de H₂ dissout trop élevés dans les réacteurs. Une accumulation de ces produits intermédiaires provoque une diminution du pH et une inhibition de la croissance des méthanogènes (Chynoweth, Wilkie et Owens, 1999; Massé *et al.*, 2001). Par le fait même, les temps de rétention pour un cycle de dégradation complet de la matière organique sont plus longs dans un réacteur anaérobie qu'aérobie. Plusieurs facteurs entrent en jeu lorsqu'on détermine le temps de réaction du lisier dans le réacteur. Il y a entre autres les caractéristiques du lisier (charge organique), les conditions d'opérations (température, volume à traiter) et les objectifs de traitement (réduction de la charge polluante, niveau de désodorisation, stabilité des éléments fertilisants du liquide traité).

De façon générale, les traitements anaérobies mésophiles ne sont pas reconnus pour inactiver les pathogènes (Pagilla, Kim, et Cheunbarn, 2000), tandis que les traitements anaérobies thermophiles peuvent désinfecter le lisier brut (Bicudo, Goyal et Zhu, 2000). C'est la température et le temps qui jouent un rôle important dans la réduction des pathogènes dans les traitements anaérobies. (Bicudo, Goyal et Zhu, 2000). Par contre, une étude de Kearney, Larkin et Levett (1993) a démontré qu'un traitement anaérobie discontinu à 35 °C, dégradant le fumier de bovin, permet la réduction de 90 % de pathogènes tels qu'*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Yersinia enterocolitica* en 0,8, 0,9 et 0,7 jours respectivement, alors que 12,3 jours sont nécessaires à la réduction à 90 % de *Listeria monocytogenes*. Pour ce qui est des virus, il a été démontré en conditions de laboratoire que des enterovirus et des parvovirus bovins sont rapidement inactivés dans des digestions anaérobies thermophiles, mais qu'ils survivent dans des conditions anaérobies mésophiles et cela pendant plus de 13 jours. (Bicudo, Goyal et Zhu, 2000).

1.2.4. Bioréacteurs à opération séquentielle

En utilisant le principe de la méthanogenèse, Massé *et al.* (1996) ont mis au point des bioréacteurs à opération séquentielle (BOS) pour dégrader le lisier de porc à une température de 20 °C lors des conditions d'opérations standard. Les objectifs de départ du projet étaient de réduire les émissions des odeurs du lisier, de diminuer sa charge polluante organique, d'augmenter sa qualité agronomique et de produire de l'énergie récupérable. Également, le processus devrait être réalisé à de faibles coûts, être stable et facile à opérer dans les fonctions normales de la ferme (Massé *et al.*, 1996). L'originalité de ce procédé est la basse température à laquelle les réacteurs étaient exposés. Le fonctionnement des BOS est divisé en quatre étapes principales soit l'alimentation, la réaction, la sédimentation et la vidange (Massé, 1999). La période d'alimentation consiste à l'ajout de lisier dans le bioréacteur. La biomasse, permettant la dégradation de la matière organique, est déjà présente dans le réacteur et acclimatée aux conditions de réactions. Lorsque le lisier est ajouté, la période de réaction peut commencer. La longueur de cette période, doit être suffisante pour rencontrer les objectifs de traitement.

Durant la période de sédimentation, aucun mélange n'est effectué dans le réacteur. Finalement, la période de vidange permet de retirer le surnageant tout en conservant la biomasse sédimentée dans le bioréacteur. Une période d'attente est possible entre les cycles de dégradation permettant une flexibilité et une coordination des opérations. L'avantage d'un traitement à une température de 20 °C est qu'il n'est pas nécessaire de dépenser une trop grande quantité d'énergie pour maintenir une température élevée dans les réacteurs. Si un chauffage s'avère essentiel pour les bâtiments, le méthane produit lors de la dégradation pourra fournir l'énergie nécessaire.

Massé *et al.* (1996 et 1999) ont recueilli plusieurs données afin de déterminer si le traitement anaérobie psychrophile est performant, c'est-à-dire si les bactéries impliquées permettent d'atteindre les objectifs visés soit la réduction de la DCO, la désodorisation du lisier, la production du CH₄ et la production d'un lisier stable. Des données ont été recueillies sur différents traitements et l'analyse des résultats a permis de constater que la DCO totale (DCOT) était réduite entre 73 et 85 %, la DCO soluble (DCOS) entre 85 et 96 %, les solides volatils (SV) entre 27 et 74 % et que la production du CH₄ était entre 0,30 et 0,66 L/g de SV (Massé, 1999). La valeur de la réduction de la DCOS est plus élevée, car les particules solubles sont plus facilement utilisées par la biomasse que les particules solides. La variabilité des résultats concernant les DCO ainsi que les SV est principalement due à la variation des échantillons causée par la sédimentation rapide des particules lourdes. De plus, le haut taux de CH₄ produit démontrait que la charge organique est grandement dégradée. Donc, le lisier traité entreposé ne produira pas de CH₄, ce qui signifie une diminution d'émission d'un gaz à effet de serre important. Pour la réduction des odeurs, il n'existe pas de test précis, mais il est facile de constater que le niveau d'odeur était réduit de façon importante.

D'autres groupes de chercheurs ont développé des procédés pour dégrader le lisier de porc en conditions anaérobies dans des réacteurs à opérations séquentielles. L'étude de Dague, Habben et Pidaparti (1992) a démontré une réduction en moyenne des solides volatils de 85 et de 81 % dans des réacteurs où les températures de fonctionnement se situaient à 25 et 35 °C, respectivement. Alors, qu'une étude de Zhang *et al.* (1997) a

démontré une réduction de 55 à 61 % des solides volatils lorsque la température des réacteurs était à 25 °C . La réduction des solides volatils se compare à celle obtenue par Massé *et al.* (1999) malgré le fait que la température de fonctionnement soit à 20 °C. Il y a eu également Ng (1989) dont le substrat était des eaux usées de porcherie. La température de fonctionnement des réacteurs était à 28 °C et les résultats ont démontré une réduction en moyenne des solides volatils de 67 %.

Les études du traitement anaérobie à 20 °C ne s'arrêtent pas à la performance du procédé, mais elles considèrent également la stabilité de la biomasse présente dans les réacteurs. Le consortium bactérien doit pouvoir subir des chocs tels qu'une surcharge organique ou un arrêt de brassage. Pour se faire, Massé *et al.* (1996) ont effectué différents essais dans lesquels des BOS en parallèles fonctionnaient dans les mêmes conditions, mais subissaient des charges organiques différentes. Il a été démontré que la dégradation avait été aussi bonne dans le réacteur ayant subi une surcharge que celui opéré dans des conditions standards. Donc, la biomasse était capable de subir les chocs imposés sans influencer son activité de dégradation.

Un réacteur fonctionnant en anaérobie doit s'acclimater à différentes conditions, mais la présence de certains inhibiteurs tels que l'accumulation des acides gras volatils, un haut taux d'ammoniaque et des composés toxiques peuvent affecter l'activité microbienne (Chynoweth, Wilkie et Owens 1999). De plus, les antibiotiques présents dans la nourriture des porcs pourraient également être un inhibiteur potentiel. Après une étude poussée, Massé *et al.* (2000a) ont démontré que cela n'était pas le cas, puisque la présence d'antibiotiques dans le réacteur psychrophile anaérobie n'a pas affecté le niveau d'utilisation de la DCOS et des acides gras volatils. De plus, la production du méthane était la même.

1.3. Étude des micro-organismes

Dans un procédé de dégradation d'une matière organique, il est important d'étudier les micro-organismes dégradeurs pour ainsi mieux comprendre et maîtriser le phénomène.

Il est possible d'étudier les micro-organismes en utilisant des méthodes traditionnelles ou de biologie moléculaire.

1.3.1. Méthodes traditionnelles

Traditionnellement pour étudier un micro-organisme, il faut l'isoler pour l'obtenir en culture pure puis faire des observations en microscopie. Ensuite, des tests physiologiques et biochimiques sont effectués dans le but de l'identifier (Amann, Ludwig et Schleifer, 1995; Raskin *et al.*, 1994). Mais pour que cette méthode soit applicable, il faut que le micro-organisme soit cultivable en laboratoire. Or, une petite fraction de tous les micro-organismes seraient cultivables (Raskin *et al.*, 1994a). De plus, le processus devient long et fastidieux lorsque les organismes vivent en relation syntrophe ou ont une croissance très lente. Il est donc impossible d'étudier tous les micro-organismes présents dans un site donné en utilisant seulement les méthodes traditionnelles. L'étude des micro-organismes formant un consortium méthanogène devient difficile si seulement les méthodes traditionnelles sont utilisées, car la plupart des bactéries formant ce consortium possèdent des caractéristiques limitantes.

1.3.2. Méthodes de biologie moléculaire

Des techniques de biologie moléculaire ont été mises au point dans le but d'étudier des organismes présents dans un environnement donné, qu'ils soient cultivables ou non. Pour ce faire, les composantes génétiques des organismes, soit l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN), sont étudiées. Les composantes génétiques permettent d'étudier un organisme dans différents niveaux de phylogénie. Par exemple, celles-ci permettent de faire la distinction entre les domaines des *Eubacteria* et des *Archaea*, d'évaluer le nombre de cellules appartenant à un genre ou une espèce en particulier et d'étudier un consortium bactérien dans sa niche sans le détruire (Amann, Ludwig et Schleifer, 1995; Raskin *et al.*, 1994a). La base de ces méthodes est d'utiliser les gènes codant pour la partie 16S du ribosome (ADNr 16S). L'ADNr 16S est utilisé puisqu'il se retrouve chez tous les organismes. En comparant les

séquences d'ADNr 16S entre espèces, des régions très conservées sont retrouvées où s'intercallent des régions variables. Les régions conservées permettent de les amplifier *in vitro* par polymérisation en chaîne («polymerase chain reaction», PCR), tandis que les régions variables permettent de les différencier (Oude Elferink *et al.*, 1998). L'ADNr 16S peut ainsi servir de marqueur d'évolution. Différentes méthodes sont utilisées pour l'identification des micro-organismes non cultivables.

1.3.2.1. Séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage de l'ADNr 16S permet d'apparenter un micro-organisme peu importe son domaine bactérien. Dans le cas où c'est le degré d'apparenter des micro-organismes présents dans un mélange microbien qui doit être déterminé, il faut extraire l'ADN génomique total du mélange. Ensuite, une amplification par PCR des ADNr 16S est effectuée. Le choix des amorces pour le PCR est important puisque ce sont celles-ci qui déterminent quelle partie du gène de l'ADNr 16S sera amplifié et déterminent également la spécificité de la détection (Oude Elferink *et al.*, 1998). Pour former une génothèque de clones, les fragments d'ADN du produit de PCR sont clonés dans un vecteur plasmidique. Ces derniers sont insérés dans des cellules compétentes permettant de multiplier les vecteurs avec leur insert. Le criblage des clones permet de discriminer ceux ayant des inserts semblables. Les plasmides sont ensuite extraits et les inserts d'ADNr 16S séquencés. Les séquences obtenues sont ensuite comparées avec toutes les séquences disponibles dans les banques de données. Le pourcentage de similitude entre les séquences nouvelles et connues permet d'estimer que des micro-organismes apparentés à telles espèces ou tels genres sont présents dans le mélange microbien (Amann, Ludwig et Schleifer, 1995).

1.3.2.2. Hybridation avec des sondes phylogéniques

Les méthodes utilisant l'hybridation du matériel génétique avec des sondes phylogéniques permettent de vérifier la présence de bactéries prédéterminées, puisque les sondes s'hybrident de façon préférentielle avec des séquences précises. Il existe deux

façons générales de faire de l'hybridation, soit de faire une hybridation ADN/ADN ou ADN/ARN *ex situ* sur membrane (avec seulement le matériel génétique précédemment extrait) ou une hybridation ADN/ARN *in situ* (avec la cellule entière fixée sur une lame). En utilisant des sondes appropriées, qui sont complémentaires à des séquences bien spécifiques de la petite sous-unité de l'ARNr 16S, donc à des groupes phylogéniques, l'identification des micro-organismes présents dans l'échantillon peut se faire (DeLong, Wickham et Pace, 1989). Les sondes appropriées peuvent faire la distinction entre les domaines des *Eubacteria*, des *Archaea*, des *Eucaryota* et également entre des organismes fortement apparentés.

1.3.2.3. Empreinte génétique

Les différentes méthodes d'empreinte génétique permettent de mettre en évidence la biodiversité d'une population dans son ensemble.

1.3.2.3.1. Polymorphisme de conformation des simples brins d'ADN

La méthode du polymorphisme de conformation des simples brins d'ADN («single-strand-conformation polymorphism», SSCP) consiste en une électrophorèse sur gel de polyacrylamide des simples brins d'ADNr 16S. La mobilité de ces brins lors de l'électrophorèse est fonction des structures de repliement que le brin adopte. Puisque ces repliements sont eux-mêmes fonction des interactions intramoléculaires et donc de la séquence en nucléotides, des brins ayant la même longueur mais des séquences différentes migreront à des vitesses différentes et seront ainsi séparés (Lee, Zo et Kim, 1996). Cependant, pour un seul ADNr 16S, il peut y avoir jusqu'à trois bandes puisque le double brin d'ADN migre également sur le gel. Plusieurs facteurs peuvent influencer la sensibilité du SSCP comme la matrice du gel, la température, la longueur du fragment et la séquence.

1.3.2.3.2. Électrophorèse sur gel à gradient de dénaturant

La séparation des fragments d'ADN sur une électrophorèse sur gel à gradient de dénaturant («denaturing gradient gel electrophoresis», DGGE) est basée sur les différences dans la séquence en nucléotides de fragments, ayant la même longueur, amplifiés par PCR (Fodde et Losekoot, 1994; Muyzer, Waal et Uitterlinden, 1993; Muyzer et Smalla, 1998; Muyzer, 1999; Myers, Sheffield et Cox, 1989, Sheffield *et al.*, 1989; Top, 1992). Les doubles brins d'ADN sont soumis à un gradient linéaire croissant composé d'agents dénaturants, un mélange d'urée et de formamide, dans un gel de polyacrylamide. Un fragment d'ADN possède des domaines de dissociation, c'est-à-dire des endroits où les doubles brins se dissocieront dû à des conditions environnantes bien précises. Ces domaines de dissociation sont plus ou moins stables selon la séquence en nucléotides du fragment. Lors de la migration de l'ADN, celle-ci rencontre un point où la combinaison de la température de l'électrophorèse (60 °C) et la concentration du mélange des dénaturants est égale à la température de dissociation (T_m) du domaine de dissociation du fragment d'ADN. À ce moment, les deux brins du fragment s'ouvrent, réduisant leur mobilité. Puisque la T_m est spécifique à la séquence en nucléotides, chaque fragment possède sa propre T_m . Ainsi, il sera possible de séparer différents fragments selon leur vitesse de migration dans le gel.

Cependant, pour faire une distinction de deux ADN ayant des séquences différentes, il ne faudrait pas que les deux brins se dissocient complètement. Pour ce faire, lors de l'amplification, une des deux amorces a à son extrémité 5' une pince de guanine et de cytosine (pince GC) d'une longueur approximative de 40 nucléotides. Le rôle de cette pince est de prévenir la dissociation complète du fragment (Wu *et al.*, 1998) et altère les caractéristiques de dissociation du fragment en augmentant la T_m du brin (Sheffield *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1998). Ainsi, les domaines de dissociation sont très stables du côté 5'. Globalement, la pince GC permet de faire augmenter le nombre des variations totales présentes dans le double brin d'ADN. Suite à la révélation du gel, les fragments ayant une séquence avec un pourcentage de guanine et de cytosine (% G + C) élevé migreront plus loin dans le dénaturant puisque leur T_m est plus élevée dû à leur

domaine de dissociation plus stable. Par contre, si la séquence contient un pourcentage d'adénine et de thymine (% A + T) plus élevé, les brins se dissocieront plus rapidement dans le gel ce qui entraînera une migration plus lente.

Pour obtenir une bonne résolution des différents fragments, de bonnes conditions d'expérimentations doivent être établies. Il faut choisir le bon gradient de dénaturant dans le gel de polyacrylamide et les fragments doivent être d'une longueur de moins de 500 paires de base (pb) (Fodde et Losekoot, 1994; Miller *et al.*, 1999; Muyzer et Smalla, 1998; Myers *et al.*, 1985), car à cette longueur les fragments sont plus facilement séparables sur DGGE qu'un fragment plus long. De plus, selon Øvreas *et al.* (1997), l'amplification de fragments courts diminue les risques de formation de chimères lors du PCR. La technique du DGGE offre plusieurs avantages. En premier lieu, le DGGE peut être couplé à l'hybridation sur membrane pour une identification partielle des micro-organismes, puisque chaque ADNr 16S donne en théorie une seule bande. Ainsi, le groupe ou l'espèce des micro-organismes peut être déterminé de même que le nombre de micro-organismes différents présents dans l'échantillon de départ. De plus, l'ADN présent dans le gel peut être excisé, réamplifié et éventuellement séquencé à condition que le fragment soit assez long (environ 500 pb) pour fournir suffisamment d'informations et qu'il n'y a pas de risque de contaminations. Ainsi une population mixte provenant de l'environnement peut être analysée rapidement. Avec le DGGE, il est possible d'utiliser différentes amorces pour amplifier des populations cibles et ainsi faciliter l'identification.

Combiné à l'amplification PCR des gènes de l'ADNr 16S contenu dans un échantillon microbien, le DGGE donne une perspective directe de ce que contient cet échantillon. C'est pour cette raison que cette technique est appropriée pour sonder la distribution temporelle et spatiale des populations bactériennes dans un échantillon complexe comme le sol ou les boues (Muyzer et Smalla, 1998). D'autant plus que cette technique est relativement facile, reproductible, précise et rapide. La théorie du fonctionnement de la technique et le comportement de l'ADN dans le gel sont bien compris et documentés. Le DGGE est utilisé dans le domaine de l'écologie microbienne

puisqu'il permet d'étudier des populations bactériennes dans son ensemble. En effet, il est possible de connaître le profil d'une population complexe en analysant le profil des différentes bandes d'ADN qu'il est possible de retrouver sur le gel. C'est ce que Muyzer *et al.* (1993) ont réussi à faire avec un mélange de bactéries. Ferrari et Hollibaugh (1999) ont utilisé le DGGE pour étudier la distribution des micro-organismes dans le bassin de l'océan Arctique central, tandis que Ferris, Muyzer et Ward (1996) l'ont fait dans les sources d'eaux thermales. Il a également été possible d'étudier une communauté d'actinomycètes (Heuer *et al.*, 1997), des boues activées (Onuki *et al.*, 2000), des bactéries présentes dans un bioréacteur à membrane de séparation (Luxmy, Nakajima et Yamamoto, 2000) et dans des biofilms (Zhang et Fang, 2000). Il est également possible de suivre une succession de micro-organismes dans un milieu donné (Ishii, Fukui et Takii, 2000).

1.4. Identification des communautés microbiennes présentes dans des réacteurs anaérobies

Il n'existe pas d'étude publiée qui porte sur l'identification des micro-organismes dans des bioréacteurs anaérobies lorsque le substrat est du lisier de porc. Par contre, il en existe sur des communautés microbiennes qui produisent, entre autres, du méthane comme produit final en utilisant un autre substrat. Dans la plupart des études, l'identification portait sur les méthanogènes plutôt que sur l'ensemble du consortium, et cela malgré le fait que moins de 10 % des bactéries présentes faisaient partie du domaine des *Archaea* (Griffin *et al.*, 1998). Ceci s'explique par le fait que ce sont les méthanogènes qui contrôlent la cinétique du procédé et sont en plus responsables de la production du méthane.

Dans un réacteur anaérobie les principaux micro-organismes identifiables font partie des acétogènes, des méthanogènes et du groupe des bactéries sulfato-réductrices (Oude Elferink *et al.*, 1998). La méthanogenèse et la réduction du sulfate dépendent des conditions d'opérations du réacteur et des micro-organismes présents dans les boues, puisque ce sont deux étapes compétitrices. Dans le cas d'une dégradation du lisier, ce

sont les méthanogènes qui sont en majorité par rapport aux bactéries sulfato-réductrices dû à l'absence du sulfate (Raskin *et al.*, 1995).

Raskin *et al.* (1995) ont étudié la communauté microbienne de différents réacteurs ayant comme substrat de l'eau usée municipale fonctionnant à des températures se situant entre 34 et 38 °C. Au niveau des méthanogènes, ce sont les ordres des *Methanosarcinales* et des *Methanomicrobiales* qu'il a été possible de retrouver. Il y avait entre autres les genres *Methanosaeta* et *Methanosarcina* qui sont deux méthanogènes acétotrophes (Zheng et Raskin, 2000). *Methanosaeta* utilise seulement l'acétate comme source d'énergie, alors que *Methanosarcina* peut utiliser, autre que l'acétate, le méthanol, les méthylamines, le H₂ et le CO₂. Lorsque la concentration en acétate est basse, c'est le genre *Methanosaeta* qui est le plus abondant. Ce genre a une croissance lente, mais a plus d'affinité avec l'acétate (Zheng et Raskin, 2000). Lorsque la concentration en acétate est élevée, ce sont les *Methanosarcina* qui sont en majorité (Griffin *et al.*, 1998, Raskin *et al.*, 1995). Le genre *Methanosaeta* est présent dans divers environnements anaérobies tels que des réacteurs, des granules, des biofilms anaérobies, des sédiments, des rizières et des aquifères (Zheng et Raskin, 2000). Toujours selon l'étude de Raskin *et al.* (1995), les ordres des *Methanobacteriales* et des *Methanococcales* sont présents dans les réacteurs, mais jouent des rôles relativement mineurs dans la dégradation des eaux usées municipales. D'ailleurs, Seriguchi *et al.* (1999) ont retrouvé les genres *Methanobacterium* et *Methanospirillum* en nombre inférieur par rapport au genre *Methanosaeta* dans des réacteurs mésophiles ayant par contre un substrat artificiel imitant les eaux usées municipales. Cependant, lorsque le réacteur était en condition de thermophilie avec le même substrat, le genre *Methanobacterium* était plus abondant.

Enfin, pour ce qui est des micro-organismes appartenant au domaine *Eubacteria*, une étude de Fang, Zhang et Liu (2002) ont démontré que les acétogènes productrices de H₂ sont un groupe important. Le réacteur fonctionnait à une température mésophile (36 °C) et alimenté avec un milieu artificiel où le composé majoritaire était le glucose. L'activité des méthanogènes était suspendue en maintenant le pH à 5,5. La majorité des clones séquencés, 43,8 %, était affiliée avec une espèce de *Clostridium* soit *C. cellulosi*,

une bactérie thermophile, malgré le fait que les conditions d'opérations du réacteur étaient en mésophilie. Cependant, cette bactérie est étroitement apparentée avec un *Clostridium* mésophile soit *C. sporosphaeroides*. Aussi, 12,5 % des clones étaient affiliés avec *C. acetobutylicum*, une espèce dont les hydrates de carbone sont la source de carbone. Cette bactérie produit entre autres du H₂, de l'acétate, du butyrate et du *n*-butanol. Ensuite, 8,3 % des clones étaient affiliés avec une autre espèce de *Clostridium* soit *C. tyrobutyricum* qui utilise comme substrat des monosaccharides tels que le glucose et le fructose. Pour ce qui est des autres clones, 3,1 % ont été affiliés à *Streptococcus bovis*, 18,8 % avec la famille des *Enterobacteriaceae* dont *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter intermedium*, *Enterobacter* sp. et *Salmonella enteritidis*. Finalement, 13,5 % des clones ont été affiliés avec des bactéries non identifiées. Une étude de Chan, Liu et Fang (2001) a permis de caractériser la structure microbienne présente dans un réacteur anaérobie traitant les effluents d'une brasserie. L'identification des bactéries appartenant au domaine des *Eubacteria* ont donné, suite à la purification et au séquençage de bandes d'ADN provenant d'un DGGE, trois bandes affiliées à des Gram-positifs à bas pourcentage en G + C, une bande affiliée à la sous-classe *delta* des protéobactéries, une bande affiliée à la sous-classe *gamma* des protéobactéries et une bande affiliée au groupe des *Cytophaga*.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Bioréacteurs à opération séquentielle (BOS)

Les BOS permettent la dégradation du lisier de porc dans des conditions anaérobies. Les unités d'échelle laboratoire et semi-industrielle sont situées au Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc d'Agriculture et Agro-Alimentaire Canada à Lennoxville. Leur fonctionnement est sous la supervision du Dr Daniel I. Massé. Le laboratoire est équipé de 12 bioréacteurs à l'échelle laboratoire de 42 L et trois bioréacteurs à l'échelle semi-industrielle de 2,5 m³, 8 m³ et de 12 m³. De plus, un projet de démonstration impliquant deux bioréacteurs à l'échelle commerciale de 160 m³ est en cours sur une ferme porcine en Estrie pour finaliser l'adaptation commerciale de cette biotechnologie.

À la Figure 2 est représentée de façon schématique la configuration des BOS à l'échelle laboratoire. Les bioréacteurs sont composés d'un réservoir en plexiglas étanche (30 cm de diamètre par 70 cm de hauteur), d'une colonne d'alimentation (8,5 cm de diamètre par 91 cm de hauteur), d'une pompe de recirculation du gaz («Dual head vacuum pressure pump», Barnant Compagny, Barrington, IL) et d'un compteur de gaz (fabrication maison).

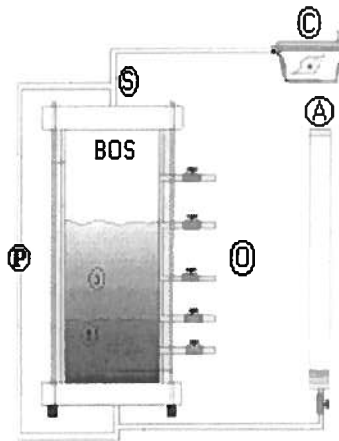


Figure 2 : Bioréacteur à opération séquentielle (BOS) à l'échelle laboratoire d'un volume de 42 L. Modifié de Massé *et al.*, 1996. Légende : A) cylindre d'alimentation. P) pompe de recirculation. O) orifices. S) sortie du biogaz. C) compteur de gaz.

Lors de l'alimentation, le lisier est déposé dans le cylindre réservé à cette fin. Le cylindre est par la suite pressurisé avec de l'azote pour transférer le lisier dans le bioréacteur. Une pompe recircule le biogaz pour agiter le contenu du réacteur. Le réservoir est équipé de cinq orifices permettant d'échantillonner les boues, la liqueur mixte (mélange de boue et de lisier) en cours de traitement ou de vidanger l'effluent traité. L'alimentation peut également se faire par une de ces orifices. La sortie du biogaz amène ce dernier à un compteur qui permet de connaître la quantité de biogaz produit au cours du cycle de traitement.

Au cours du présent projet, nous avons fait le suivi de la microflore présente dans des bioréacteurs qui étaient opérés de deux manières différentes, soit en conditions de démarrage et en conditions normales de traitement. Les conditions de démarrage réfèrent à des bioréacteurs en phase d'acclimatation. La microflore n'était pas encore adaptée au procédé. Les conditions normales de traitement réfèrent à des bioréacteurs qui étaient opérés depuis un certain temps et qui avaient atteint un bon niveau de performance. La microflore était donc bien adaptée au procédé.

Pour les conditions de démarrage, deux bioréacteurs à l'échelle de 42 L, numérotés 21 et 22, ont été mis en service le 26 janvier 2001 à une température de 27 °C avec un volume de lisier de 35 L. Les bioréacteurs semi-industriels, numérotés 17, 18 et 19 de 8 m³, 2,5 m³ et 12 m³ ont été démarrés le 26 janvier 2001 avec des volumes de lisier initiaux de 4 700, 1 506 et 6 975 L respectivement, à une température de 27 °C à l'exception du réacteur 19 qui a été démarré à une température de 28 °C. Les réacteurs à l'échelle commerciale de 160 m³, numérotés 24 et 25, ayant un volume de lisier initial de 145 000 L, ont été démarrés le 25 janvier 2001 à une température de 27 °C. Il n'y a pas eu d'ajout de lisier dans tous ces réacteurs en cours d'expérience. Les températures, vérifiées par des sondes à l'intérieur des réacteurs semi-industriels et commerciales, ont été maintenues, dans la mesure du possible, pendant toute la période du démarrage qui s'étalait jusqu'à 164, 111 et 167 jours respectivement pour les réacteurs laboratoires, semi-industriels et commerciaux.

Pour les conditions normales de traitement, quatre bioréacteurs à l'échelle de 42 L, numérotés 3, 4, 5 et 6, ont été suivis. La température à l'intérieur de la chambre où se trouvaient ces réacteurs a été maintenue à 20 °. Cependant il n'y avait pas présence de sondes à l'intérieur des réacteurs pour vérifier la température. Pour chacun des bioréacteurs, le cycle analysé a duré 50 jours, soit du 7 mai au 26 juin 2001. Au départ, le volume de boue restant du cycle précédent était de 21 L. Il y a eu deux alimentations au cours de l'expérimentation, soit le 7 et le 14 mai 2001, où 2 294 mL de lisier frais ont été ajoutés à chaque fois.

Le lisier a été prélevé dans la pré-fosse d'une ferme porcine commerciale (Massé *et al.*, 1996 et 1999). Dans le cadre de ces expériences, deux lots de lisier différents ont été utilisés. Pour le démarrage des réacteurs, le lisier provenait directement de la ferme et était transféré dans les réacteurs. Pour les réacteurs en conditions normales de traitement, le lisier a été conservé au frais, entre 0 et 10 °C, pendant un maximum de un à deux mois. Les contenants ont été bien brassés avant l'alimentation pour assurer une bonne répartition des solides.

Les analyses chimiques des acides gras volatils ont été faites à Agriculture et Agro-alimentaire Canada au Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc à Lennoxville selon la méthode standard 6010 C (APHA, 1992).

2.2. Échantillonnage

Toutes les expérimentations portaient sur la microflore présente dans les réacteurs présentés ci-haut. La microflore a été prélevée à différents moments soit de la période de démarrage ou soit lors du cycle de 50 jours. Pour obtenir un échantillon représentatif, le contenu des réacteurs de 42 L a été mélangé 10 minutes par la recirculation du biogaz. Pour les réacteurs semi-industriels, le mélange s'est fait par la recirculation de la liqueur mixte pour des périodes de 45, 20, et 60 minutes pour les réacteurs 17, 18 et 19 respectivement. Pour les réacteurs à l'échelle commerciale, le mélange s'est fait par la recirculation de la liqueur mixte pendant une heure. Un volume de 500 mL de la liqueur

mixte a été prélevé à une hauteur équivalent à 10 L pour les réacteurs de laboratoire, à la mi-hauteur pour les réacteurs semi-industriels et à 80 % de la hauteur pour les réacteurs commerciaux. Le tout a été homogénéisé à l'aide d'un mélangeur (Polytron, Brinkmann Instruments, Mississauga, ON) et un volume approximatif de 15 mL a été prélevé à l'aide d'une pipette et a été déposé dans une bouteille en plastique. À ce mélange, 3 mL d'acide éthylène-diaminetétra-acétate disodique (EDTA) (BDH Chemicals, Toronto, ON) 0,5 M à pH 8,0 ont été ajoutés. La concentration finale du EDTA dans l'échantillon était de 100 mM. L'EDTA est un chélateur d'ions dont certains sont nécessaires aux ADNases. L'ajout de l'EDTA inhibe ainsi les ADNases, donc favorise l'obtention des ADN génomiques non brisés. Puis, les échantillons ont été congelés à -20 °C.

2.3. Extraction de l'ADN génomique

La technique utilisée pour la lyse cellulaire est basée sur la méthode de Moré *et al.* (1994). La base de la technique consiste à briser les cellules avec des billes de verre en présence d'une solution d'extraction. Des modifications ont été apportées à cette méthode pour rendre plus efficace la lyse des cellules présentes dans la liqueur mixte.

2.3.1. Description des conditions testées

Différents paramètres de la méthode de lyse ont été testés. Ces paramètres sont la présence d'EDTA lors de l'extraction du matériel génétique, ainsi que sa présence avant ou après la congélation des échantillons, le temps de lyse (1, 3, 5 et 10 minutes), la quantité de billes de verre (0,5 ou 1,0 g) et finalement le ratio entre le volume de la solution d'extraction et celui de l'échantillon (250 ou 500 µL). Les billes de verres étaient d'un diamètre variant entre 0,17 et 0,18 mm (B. Braun, Melsungen, Allemagne). La solution d'extraction était composée de 100 mM de NaCl (Fischer, FairLawn, NJ), 500 mM de Tris-HCl à pH 8,0 et de 10 % (p/v) de sodium dodecyl sulfate (SDS) (ICN Biomedicals, Cleveland, OH). Le Tris-HCl a été préparé avec une solution concentrée de Tris 1 M (Fischer) dont le pH a été ajusté à 8,0 avec du HCl concentré (EM Science,

Darmstadt, Allemagne). La lyse cellulaire a été faite à l'aide de l'homogénéisateur Retsch (Brinkmann Instruments).

2.3.2. Visualisation de l'ADN

Pour connaître l'état de l'ADN extrait et le quantifier, une électrophorèse sur gel d'agarose 1,0 % (p/v) (Gibco BRL, Grand Island, NY) a été effectuée à 80 V dans du tampon TAE à une concentration finale de 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Le tampon de chargement d'une concentration 6X (0,25 % (p/v) de bleu de bromophénol (Sigma), 0,25 % (p/v) de xylène cyanol (Sigma) et 30 % (v/v) de glycérol (Fischer)) a été utilisé pour tous les échantillons. La migration a été d'environ 20 minutes. Le gel d'agarose a été coloré 15 minutes dans une solution de 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium (Sigma) et les bandes ont été révélées par rayonnement U.V. à l'aide d'un transilluminateur (GelDoc 1000, Bio-Rad, Hercules, CA). L'ADN est considéré non détérioré si celle-ci était d'un poids moléculaire élevé et surtout s'il n'y avait pas de dégradation trop apparente.

2.3.3. Protocole d'extraction retenu

Les conditions optimales d'extraction ont ainsi été déterminées et utilisées pour la suite du projet. La quantité de billes de verre utilisée était de 0,5 g dans un tube vissé de 1,5 mL. La solution d'extraction et l'échantillon ont été utilisés en volumes égaux de 500 µL. La lyse des cellules a été faite à vitesse maximale pendant 5 minutes. Pour obtenir un surnageant clair, les tubes ont été centrifugés dans une micro centrifugeuse (modèle 59A, Fischer) à 13 000 rpm pendant 3 minutes.

2.3.4. Purification de l'ADN

L'ADN purifié a été obtenu en recueillant 750 µL d'un échantillon lysé et ajouté 750 µL d'une solution de phénol :chloroforme :alcool isoamylique (25:24:1) (Fischer; Produits chimiques américains Ltée, Montréal, QC). Le phénol doit auparavant être

équilibré avec une solution de Tris-HCl à pH 8,0. Le contenu du tube a été mélangé par inversion, pour éviter de briser l'ADN, et le tout a été centrifugé dans une micro centrifugeuse (modèle 59A, Fischer) à 10 000 rpm environ 30 secondes pour séparer les phases aqueuse et phénolique. La phase aqueuse a été recueillie, puis l'étape avec la solution de phénol :chloroforme :alcool isoamylique (25:24:1) a été répétée. Aux phases aqueuses recueillies, un volume égal d'une solution de chloroforme :alcool isoamylique (24 :1) a été ajouté, puis mélangé par inversion, et centrifugé à 10 000 rpm (modèle 59A, Fischer) pendant 30 secondes. Cette étape permet d'enlever toute trace de phénol. L'ADN, présent dans la phase aqueuse, a été purifié en ajoutant 0,3 volume d'acétate d'ammonium (Produits chimiques américains Ltée) 10 M. Le contenu du tube a été mélangé au vortex et centrifugé à 13 000 rpm (modèle 59A, Fischer) pendant 5 minutes. Le surnageant a été récupéré et 2 volumes d'éthanol 95 % (v/v) ont été ajoutés. Le contenu du tube a été mélangé au vortex et incubé sur glace pendant 30 minutes. L'éthanol permet la précipitation de l'ADN. Suite à la précipitation, les tubes ont été centrifugés 30 minutes à 13 000 rpm (Biofuge A, Canlab, Darmstadt, Allemagne) et le surnageant a été aspiré. Le culot a été lavé en ajoutant 250 µL d'éthanol 70 % (v/v). L'éthanol a été aspiré et le culot d'ADN a été séché sous une hotte biologique pendant environ 30 minutes. Puis, il a été dissous dans 40 µL d'un mélange de Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl à pH 8,0 et 1 mM EDTA). Le tout a été conservé à -20°C.

2.3.5. Quantification de l'ADN

L'ADN extrait a été comparé avec trois échantillons d'ADN non digéré du phage lambda (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) soit 100 ng, 50 ng et 25 ng. La quantification de l'intensité de chaque bande a été effectuée avec l'aide du logiciel Molecular-Analysis version 1.3 (Bio-Rad). Pour chaque gel, une courbe standard a été établie à partir des intensités des standards et la quantité d'ADN des échantillons a été déterminés à l'aide de cette courbe.

2.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

2.4.1. Solutions

Les ADNr 16S ont été amplifiés par PCR dans des cocktails réactionnels de 50 μ L. Ceux-ci contenaient le tampon (Tris-HCl 10 mM à pH 9,0, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM) (Amersham Pharmacia Biotech), des nucléotides (200 μ M chacun) (Amersham Pharmacia Biotech), deux amorces spécifiques à l'ADNr 16S (0,75 pmol/ μ L), 0,4 μ g/ μ L d'albumine de sérum de bovin (BSA) (Sigma), 1,25 U d'enzyme ADN *Taq* polymérase (Amersham Pharmacia Biotech) et une dilution d'ADN cible de 0,1 ng/ μ L. Le mélange a été protégé de l'évaporation par l'ajout de 30 μ L d'huile minérale stérile. Pour chaque réaction de PCR, un tube contrôle, c'est-à-dire avec tout le matériel réactionnel mais sans ADN, était fait.

2.4.2. Amorces

Différentes amorces ont été utilisées au cours de l'expérimentation. Les amorces, visant la région variable V3 de l'ADNr 16S, pour amplifier le domaine des *Eubacteria* étaient 341f et 534r (Tableau 1). L'extrémité 5' de l'amorce 341f était liée à une pince GC de 40 nucléotides. Une amplification avec ces amorces générait un fragment d'environ 200 pb. Pour viser le domaine des *Archaea*, deux stratégies d'amplification ont été utilisées, employant deux paires d'amorces distinctes pour amplifier l'ADNr 16S. La première stratégie utilisait la paire d'amorces, Arch D et Arch G (Tableau 1) générant un fragment d'environ 1 500 pb. La deuxième stratégie utilisait la paire d'amorces, Arch 69f et Arch 958r (Tableau 1) générant un fragment d'environ 900 pb. À partir de ces amplicons, un deuxième PCR a été effectué (PCR interne ou «Nested PCR») pour faire les profils DGGE des populations. Cependant, avant d'utiliser les amplicons, le produit de PCR doit être débarrassé des premières amorces utilisées. Pour ce faire, 0,25 volume d'acétate d'ammonium 10 M et 2,5 volumes d'éthanol 95 % (v/v) ont été ajoutés aux produits de PCR et ces derniers ont été incubés à -20 °C pendant 30 minutes. Les tubes

Tableau 1 : Amorces utilisées au cours de l'étude.

Amorces	Spécificité	Position dans <i>E. coli</i>	Séquences	Références
pA	<i>Eubacteria</i>	19 à 38	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	Fernandez <i>et al.</i> , 1999
pH	<i>Eubacteria</i>	1522 à 1541	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'	Fernandez <i>et al.</i> , 1999
341f	<i>Eubacteria</i>	341 à 357	5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	Muyzer, Waal et Uitterlinden, 1993
534r	Universelle	518 à 534	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	Muyzer, Waal et Uitterlinden, 1993
Arch D	<i>Archaea</i>	2 à 21	5'-TTC YGG TTG ATC CYG CCR GA-3'	Cabriol <i>et al.</i> , 1998
Arch G	<i>Archaea</i>	1330 à 1349	5'-GGC GGT GTG TGC AAG GAG CA -3'	Cabriol <i>et al.</i> , 1998
Arch 69f	<i>Archaea</i>	69 à 88	5'-TAA GCC ATG CRA GTC GAA YG-3'	Fernandez <i>et al.</i> , 1999
Arch 958r	<i>Archaea</i>	942 à 960	5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3'	Fernandez <i>et al.</i> , 1999
Arch 344f	<i>Archaea</i>	344 à 363	5'-ACG GGG AGC AGC AGG CGC GA-3'	Casamayor <i>et al.</i> , 2000; Pinar <i>et al.</i> , 2001; Raskin <i>et al.</i> , 1994
Pince GC			5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GCG GGG GCA CGG GGG G-3'	Muyzer, Waal et Uitterlinden, 1993

ont été centrifugés (Biofuge A, Canlab) à 13 000 rpm pendant 15 minutes et le surnageant a été aspiré. Le culot d'ADN a été séché sous une hotte biologique et dissous dans 50 µL d'eau Milli-Q stérile. La paire d'amorce utilisée, pour amplifier la région V3 des ADNr 16S, était Arch 344f et 534r (Tableau 1). À l'amorce Arch 344f était liée la pince GC. Un volume de 1 µL du premier PCR était utilisé pour le deuxième PCR. Les différentes amorces ont été synthétisées à l'aide de l'appareil Gene Assembler (Amersham Pharmacia Biotech) par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

2.4.3. Conditions d'amplification

Toutes les amplifications ont été effectuées avec un appareil «DNA Thermal Cycler 480» (Perkin-Elmer, Norwalk, CO). Les échantillons d'ADN ont été mis dans un tube de 0,5 mL contenant le tampon, les nucléotides, les amorces et le BSA. Les tubes ont été chauffés à 99 °C pendant 5 minutes pour dénaturer l'ADN puis la température était réduite à 80 °C pendant 3 à 5 minutes, période durant laquelle l'enzyme *Taq* a été ajoutée. Le premier cycle d'amplification était le suivant : 94 °C pendant 5 minutes (période de dénaturation), 55 °C pendant 5 minutes (période d'appariement) et 72 °C pendant 2 minutes (période d'élongation). Les cycles suivants, entre 25 et 30, ont suivi les mêmes températures, mais pour des périodes de temps différentes soit de 1, 1 et 2 minutes respectivement. La dernière étape a été une période d'élongation de 10 minutes à 72 °C. Ce programme a été utilisé lorsque le domaine des *Eubacteria* était visé et lors de la deuxième stratégie d'amplification pour le domaine des *Archaea*. Dans le cas de la première stratégie d'amplification chez les *Archaea* le programme de PCR était un programme type «touch down»; la température d'appariement était au départ de 65 °C et elle a été diminuée de 1 °C à tous les deux cycles jusqu'à 55 °C, valeur qui a été conservée pour les 10 derniers cycles. Dans le cas des deuxièmes amplifications chez les *Archaea* à partir des amplicons des premières amplifications, c'est-à-dire avec la paire d'amorces Arch 344f et 534r, la température d'appariement a été de 50 °C. Le reste du programme était le même que décrit ci-haut. L'ADN amplifié a été vérifié à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % (p/v) (section 2.3.2). La migration a été de 45

minutes. Les amplicons ont été quantifiés par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire (EZ load precision molecular standard, Bio-Rad) et à l'aide du logiciel Molecular-Analysis (section 2.3.5).

2.5. Électrophorèse sur gel à gradient de dénaturant (DGGE)

Les ADN génomiques extraits des échantillons ont été amplifiés avec les amorces 341f et 534r pour le domaine des *Eubacteria* et Arch 344f et 534r pour le domaine des *Archaea* (section 2.4). Les amplicons produits ont été déposés sur le gel à gradient linéaire de dénaturant (DGGE).

Le DGGE a été exécuté en utilisant le système DCode de Bio-Rad. La grandeur des plaques de verre était de 18 x 20 cm et de 16 x 20 cm, ce qui donne un gel d'une grandeur de 16 x 16 cm et d'une épaisseur de 1,5 mm. Les solutions formant le gradient ont été produites avec une solution concentrée de 40 % (p/v) bis-acrylamide (Bio-Rad), d'urée (Bio-Rad) et de formamide (Sigma). Ce dernier a été déionisé avec de la résine AG[®] 501-X8 (Bio-Rad). Une solution de 100 % de dénaturant contenait 7 M d'urée et 40 % de formamide. Les amplicons ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 8 %, dont le gradient se situe entre 20 et 70 %, dans du TAE 1X. La même quantité d'ADN, soit environ 300 ng de chaque échantillon, a été déposée sur le gel pour faciliter la comparaison. Un volume de 20 µL d'un tampon de chargement d'une concentration 2X (glycérol contenant 2 % (p/v) de bleu de bromophénol, 2 % (p/v) de xylène cyanol) a été ajouté à l'échantillon. L'électrophorèse a été effectuée à 100 V pendant 16 heures, à 60 °C. Le gel a été coloré dans une solution de 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium et les bandes ont été révélées à l'aide d'un transilluminateur.

Lors du DGGE, les échantillons ont migré en parallèle avec un marqueur de référence de souches pures. Ce marqueur permettait de savoir si la migration avait bien fonctionné et il permettait également la comparaison entre les différents gels. Les souches utilisées ont été *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29213), *Escherichia coli*

(ATCC 25922) et *Streptomyces coelicolor* M145 (laboratoire de Dr François Shareck, INRS-Institut Armand-Frappier). Les souches *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *E. coli* étaient congelées dans le glycérol à -70 °C. Elles ont été cultivées sur milieu TSA (Difco, Détroit, MI) à 37 °C pendant 16 à 20 heures. Un volume de 2 mL de PBS à pH 7,0 a été ajouté sur la surface des géloses pour faciliter la récupération des cellules. Du 1 mL récupéré, 500 µL ont été utilisés pour la lyse des cellules (section 2.3.3) suivi de la purification de l'ADN (section 2.3.4). Pour *S. coelicolor*, un aliquot de l'ADN extrait et purifié nous a été donné. Les amplifications de l'ADNr 16S de chaque souche ont été effectuées avec les amorces 341f avec la pince GC et 534r (section 2.4). Cependant, l'ajout de propionamide (Aldrich Chemical Compagny, Milwaukee, WI) 50 % (p/v) et de Tween (Produits chimiques américains Ltée) 5 % (v/v) a été nécessaire lors de l'amplification de l'ADNr 16S de *S. coelicolor*.

2.6. Génothèque de clones

La formation d'une génothèque de clones permet d'isoler l'ADNr 16S des micro-organismes présents dans un échantillon. Puis, le séquençage de l'ADNr 16S et la comparaison avec les banques de données permet de connaître le genre ou l'espèce des micro-organismes.

2.6.1. Amplification des ADNr 16S

Pour former la génothèque de clones chez les *Eubacteria*, l'échantillon provenait d'un réacteur fonctionnant en conditions normales de traitement (réacteur #3), à une température de 20 °C, au temps de rétention de 24 jours, ce qui représente la moitié du cycle de dégradation. Les amorces utilisées pour amplifier la totalité des ADNr 16S étaient pA et pH (Tableau 1). Pour former les génothèques de clones chez les *Archaea*, l'échantillon provenait d'un réacteur en période de démarrage (réacteur #21), à une température de 27 °C, au jour 164. Les amplifications ont été faites selon les deux stratégies d'amplification décrites précédemment (section 2.4.3) sans le PCR interne. Pour obtenir le plus d'ADN possible, les amplifications ont été faites en triplicata pour

chaque génothèque de clones. L'ADN amplifié a été vérifié à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % (p/v) (section 2.3.2).

À la fin de l'amplification, les produits de PCR ont été combinés dans le même tube et le volume complété à 200 µL avec de l'eau Milli-Q stérile. Les ADN ont été précipités tel que décrit dans la section 2.4.2. Le culot a été dissous dans 10 µL d'eau Milli-Q stérile et conservé à 4 °C.

2.6.2. Formation des clones

Le produit de PCR a ensuite été ligué dans le vecteur pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI) en ajoutant, dans un tube de 0,5 mL, 1 µL du tampon de ligation rapide 2X (60 mM Tris-HCl à pH 7,8, 20 mM de MgCl₂, 20 mM de DTT, 2 mM de ATP, 10 % polyéthylène glycol), 1 µL du vecteur pGEM®-T Easy (50 ng), 1 µL de l'enzyme T4 DNA ligase (3 unités/µL) et 7 µL du produit de PCR. Le tout a été bien mélangé et incubé à 4 °C toute la nuit. Le produit de ligation a été par la suite conservé à 4 °C.

La transformation du produit de ligation a été effectuée dans des cellules de *Escherichia coli* compétentes (Nova Blue pour la génothèque de clones des *Eubacteria* et DH5α pour les génothèques de clones des *Archaea*) (les cellules compétentes provenaient du laboratoire de Richard Villemur, INRS-Institut Armand-Frappier; Sambrook, Fritsh et Maniatis, 1989). Les cellules ont été dégelées sur glace et le produit de ligation y a été ajouté (5 µL de produit de ligation pour 100 µL de cellules compétentes à une concentration entre 10⁶ et 10⁸ UFC/mL). Une incubation a été effectuée sur glace pendant 30 minutes et un choc thermique, à 42 °C pendant 90 secondes suivies de 2 minutes sur glace, pour permettre l'entrée du produit de ligation dans les cellules compétentes. Le milieu SOC, 400 µL, a été ajouté, puis il y a eu incubation à 37 °C sous agitation pendant 45 minutes. Le milieu SOC est composé de milieu SOB stérile et de glucose 1 M (ICN Biomedicals) préalablement filtré sur membrane de 0,22 µm (Millex®-GV, Millipore, Molsheim, France). Le milieu SOB est composé de 20 g/L de Bacto Tryptone (Difco), 5 g/L d'extrait de levure (Difco), 1 g/L de NaCl et 10 mM de KCl (JT Baker Chemicals). Le pH a été ajusté à 7,0 avec du NaOH (JT Baker Chemicals). Ce

milieu a été stérilisé à l'autoclave et ajusté à 10 mM de MgCl₂ (Produits chimiques américains Ltée). Suite à l'incubation à 37 °C, 100 µL du mélange ont été déposés sur milieu solide SOB (SOB liquide avec 15 g/L d'agar (Oxoid, Hampshire, Angleterre) et 20 mM de MgCl₂) contenant les produits de sélection appropriés soit 100 mg/L d'ampicilline (ICN Biomedicals), 42 mg/L de X-Gal (Gibco BRL) et 12 mg/L de IPTG (Boehringer Mannheim, Deutschland, Allemagne). La présence d'ampicilline permet la croissance des cellules ayant reçu le vecteur seulement. L'utilisation du vecteur pGEM®-T Easy donne sur milieu contenant de l'ampicilline des colonies blanches lorsque l'insert est présent à la bonne position, c'est-à-dire dans le gène *lac* du vecteur. Lorsque l'insert n'est pas dans le gène *lac*, ce dernier est activé sous l'induction de l'IPTG et il y a formation d'un pigment bleu dans la colonie. L'incubation des boîtes de Pétri a été effectuée à 37 °C pendant 16 à 24 heures. Chacune des colonies blanches a été repiquée dans 3 mL de milieu SOB liquide à pH 7,0 et incubées à 37 °C de 16 à 24 heures sous agitation pour obtenir suffisamment de cellules et ainsi plusieurs copies des ADNr 16S.

À la fin de la période d'incubation, 200 µL de chaque clone ont été congelés dans 20 % (v/v) de glycérol et conservé à -70 °C. L'extraction des ADN totaux a été exécutée en centrifugeant à 13 000 rpm (Biofuge A, Canlab) environ 30 secondes, 1,0 mL de la culture bactérienne des clones. Le surnageant a été aspiré et le culot lavé avec 500 µL de TEN (10 mM Tris-HCl à pH 8,0, 1 mM EDTA et 100 mM de NaCl). Une deuxième centrifugation à 13 000 rpm (Biofuge A, Canlab) environ 30 secondes a été effectuée et le surnageant a été aspiré. Le culot a été dispersé dans 200 µL de TEN et 300 µL d'une solution de phénol :chloroforme :alcool isoamylique (25:24:1) ont été ajoutés. Les cellules de *E. coli* ont été brisées au vortex pendant 15 à 30 secondes. Les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm (Biofuge A, Canlab) pendant 5 minutes. La phase aqueuse a été prélevée et 0,1 volume d'acétate d'ammonium 10 M ainsi que 2 volumes d'éthanol 95 % (v/v) ont été ajoutés. La précipitation de l'ADN a été effectuée à -20 °C pendant 15 minutes et les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm (Biofuge A, Canlab) pendant 10 minutes. Le surnageant a été aspiré et le culot lavé avec 250 µL d'éthanol 70 % (v/v). Il a été séché sous la hotte biologique et dissous dans 50 µL de TE contenant

10 µg/mL d'ARNase. La présence de l'insert a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,0 % (p/v) (section 2.3.2).

2.6.3. Criblage des clones

Le criblage des clones permet de différencier lesquels ont le même insert. Pour ce faire, deux méthodes ont été utilisées, soit le DGGE et le polymorphisme de taille des fragments de restriction («restriction fragment length polymorphism», RFLP).

2.6.3.1. DGGE

À partir des ADN plasmidiques obtenus, des amplifications avec les amorces appropriées aux deux domaines (Tableau 1) ont été effectuées selon les conditions décrites dans la section 2.4.3. Les différents amplicons obtenus ont été déposés sur un DGGE de 8 % de polyacrylamide avec un gradient entre 20 et 70 % (section 2.5). L'électrophorèse a été effectuée à 100 V pendant 16 heures.

2.6.3.2. RFLP

Deux enzymes des restrictions ont été utilisées de façon distinctes, soit *RsaI* (GT↓AC) (Amersham Pharmacia Biotech) et *HhaI* (GCG↓C) (Amersham Pharmacia Biotech). La digestion avec l'enzyme *RsaI* a été effectuée avec l'ADN plasmidique, tandis que la digestion avec l'enzyme *HhaI* a été effectuée avec l'insert amplifié seulement (section 2.4). Cette deuxième méthode a été retenue pour l'enzyme *HhaI*, car il y avait trop de fragments sur le gel d'agarose permettant de cribler les clones lorsque la digestion était effectuée simultanément sur l'ADN plasmidique et chromosomique (provenant de la bactérie hôte). Le tampon utilisé pour toutes les digestions a été One-Phor-All (10 mM Tris-acétate à pH 7,5, 10 mM d'acétate de magnésium, 50 mM d'acétate de potassium (Amersham Pharmacia Biotech)) à une concentration finale de 1X et l'incubation a été effectuée à 37 °C pour un minimum de 2 heures. Le patron des bandes a été révélé par une électrophorèse sur gel d'agarose 2,0 % (p/v) (section 2.3.2).

Le marqueur de poids moléculaire a été «DNA ladder Plus» 100 pb (MBI Fermentas, Burlington, ON).

La diversité des clones a été analysée en traçant une courbe de raréfaction et par un algorithme de ChaoI à l'aide du programme «BioDiversity Professional», version 2.0 (Neil McAleece. 1997. BioDiversity Professional. Conçu par P.J.D. Lamshead, G.L.J. Paterson et J.D. Gage. The natural history museum and The Scottish association for marine science. <http://www.sams.ac.uk/dml/projects/benthic/bdpro/>). Le critère de sélection est le nombre de clones mis dans un même groupe suite au criblage avec la méthode du RFLP.

2.7. Séquençage

Le séquençage des clones a été réalisé chez DNA LandMarks Inc., compagnie située à St-Jean-sur-le-Richelieu, Québec. L'appareil utilisé était un ABI PRISM® 3700 de la compagnie Applied Biosystems (Foster City, CA) avec un système d'électrophorèse par capillarité. Les réactions de séquençage étaient de type «dye terminator». Pour la génothèque de clones visant les *Eubacteria*, c'est l'amorce pA qui a été utilisée pour les réactions de séquençage, alors que pour les *Archaea*, ce sont les amorces Arch D et Arch 69f qui ont été utilisées, dépendant de la génothèque de clones. Les séquences ont été analysées et corrigées à l'aide du programme Chromas version 1.45 (Conor McCarthy, School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australie, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), tandis que la recherche d'homologie a été effectuée avec les banques de données «GenBank» et «EMBL» à l'aide des logiciels BLAST (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et FASTA3 (European Bioinformatics Institute, <http://www2.ebi.ac.uk/>). La recherche de chimères éventuelle a été faite à l'aide du logiciel «Chimera Check» du Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>). L'étude de la phylogénie des différents clones s'est poursuivie en procédant à l'alignement des différentes séquences à l'aide du programme BioEdit version 5.0.9 (Hall, 1999), plus précisément avec «CLUSTALW multiple alignment» (Thompson, Higgins et Gibson, 1994). Les

constructions des arbres phylogéniques ainsi que les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les outils informatiques de l'ensemble PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1993). Le logiciel DNADIST (version 3,572c) a été utilisé pour évaluer les distances entre les espèces en comparant les séquences selon les paramètres de «Kimura-2». Ensuite, un arbre phylogénique a été construit en utilisant le logiciel FITCH (version 3,572c). Les analyses de la robustesse de chaque arbre ont été effectuées selon la méthode du «bootstrap» qui utilise les programmes SEQBOOT (version 3,572c), DNADIST, FITCH et CONSENSE (version 3,572c). Pour chaque analyse, 1000 arbres ont été construits. Une valeur de «bootstrap» plus petite que 500 n'a pas été considérée. L'arbre consensus a été retracé à l'aide du programme CorelDRAW (version 8) de Corel Corporation (Ottawa, ON).

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1. Analyses des acides gras volatils totaux dans les liqueurs mixtes

La mesure des acides gras volatils permet de connaître l'état de la dégradation du lisier dans les réacteurs en période de démarrage (selon les trois échelles de grandeur) ou pendant un cycle de conditions normales de traitement (section 2.1. p. 32 et 33). L'allure des courbes des acides gras volatils totaux (Figures 3 et 4) démontre la performance des réacteurs. Le suivi des acides gras volatils totaux dans les liqueurs mixtes des réacteurs en période de démarrage (Figure 3) démontre dans un premier temps une augmentation de leur concentration et cela peu importe la grandeur de l'échelle des réacteurs. La concentration moyenne des acides gras volatils totaux pour les trois échelles de réacteur était de 5 027 mg/L au jour 6 pour atteindre une concentration moyenne de 10 076 mg/L au jour 62. Par la suite, il y a eu une baisse de la concentration jusqu'à une valeur moyenne de 344 mg/L à la fin de la période de démarrage, ce qui signifie une réduction d'environ 93 % par rapport à la concentration au début (jour 6).

Dans le cas du suivi des acides gras volatils totaux dans les liqueurs mixtes des réacteurs en conditions normales de traitement (Figure 4), la valeur moyenne de la concentration a augmentée entre le jour de l'alimentation du réacteur et le jour 10 du cycle suivi d'une baisse de la valeur à une concentration moyenne de 2 009 mg/L à la fin du cycle.

3.2. Lyse cellulaire

Pour étudier les micro-organismes présents dans les échantillons, les cellules ont été lysées pour extraire l'ADN. Tout d'abord, les résultats de lyse cellulaire par broyage de billes de verre en absence d'EDTA ont démontré que l'ADN extrait d'un échantillon de liqueur mixte non congelé a produit une traînée sur un gel d'agarose (Figure 5), ce qui indique que l'ADN était partiellement fragmenté. Au contraire, le produit d'extraction en présence d'EDTA a donné une bande claire.

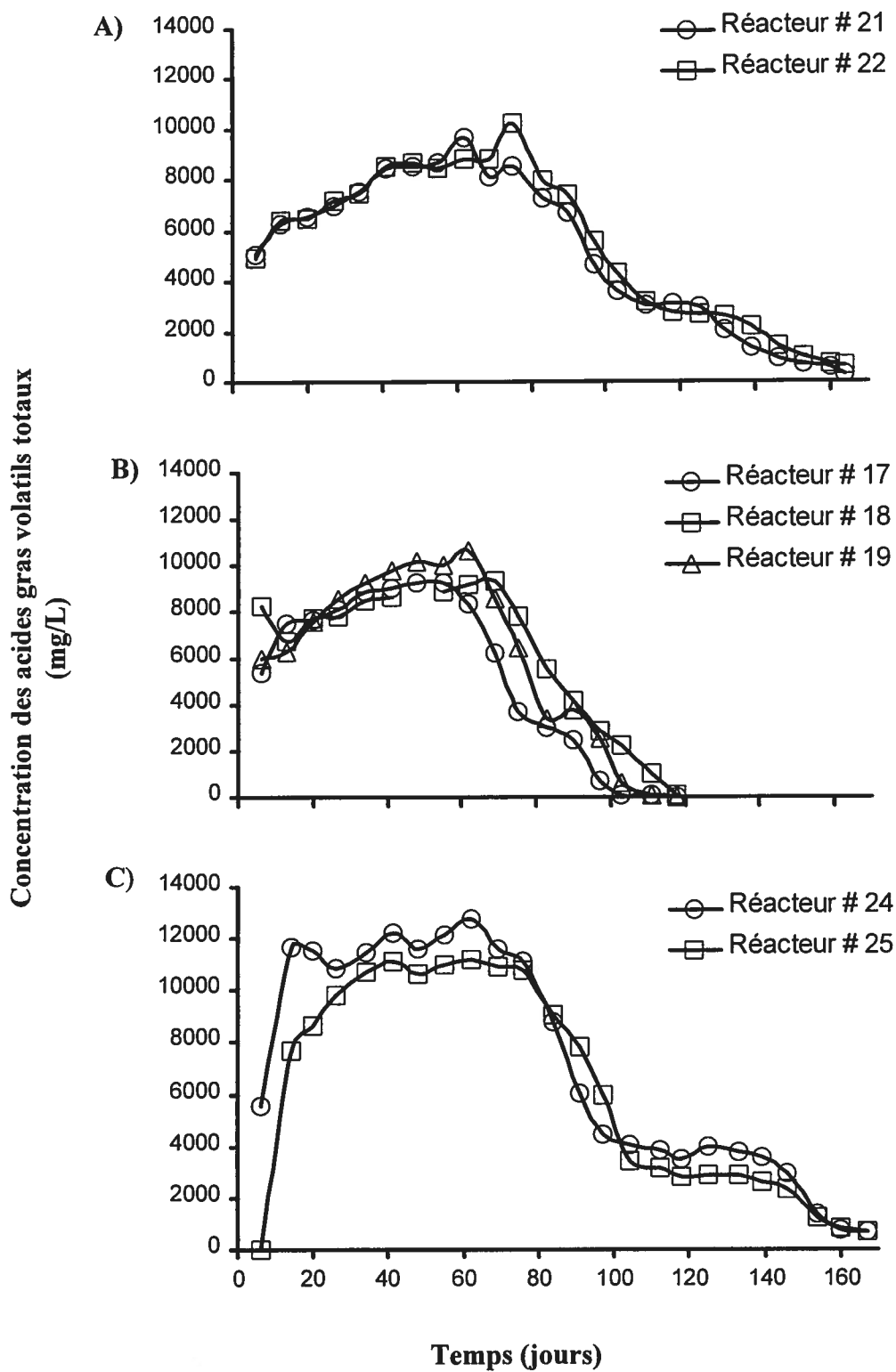


Figure 3 : Suivi des acides gras volatils totaux des réacteurs en période de démarrage. Légende : A) Réacteurs à l'échelle laboratoire. B) Réacteurs à l'échelle semi-industrielle. C) Réacteurs à l'échelle commerciale.

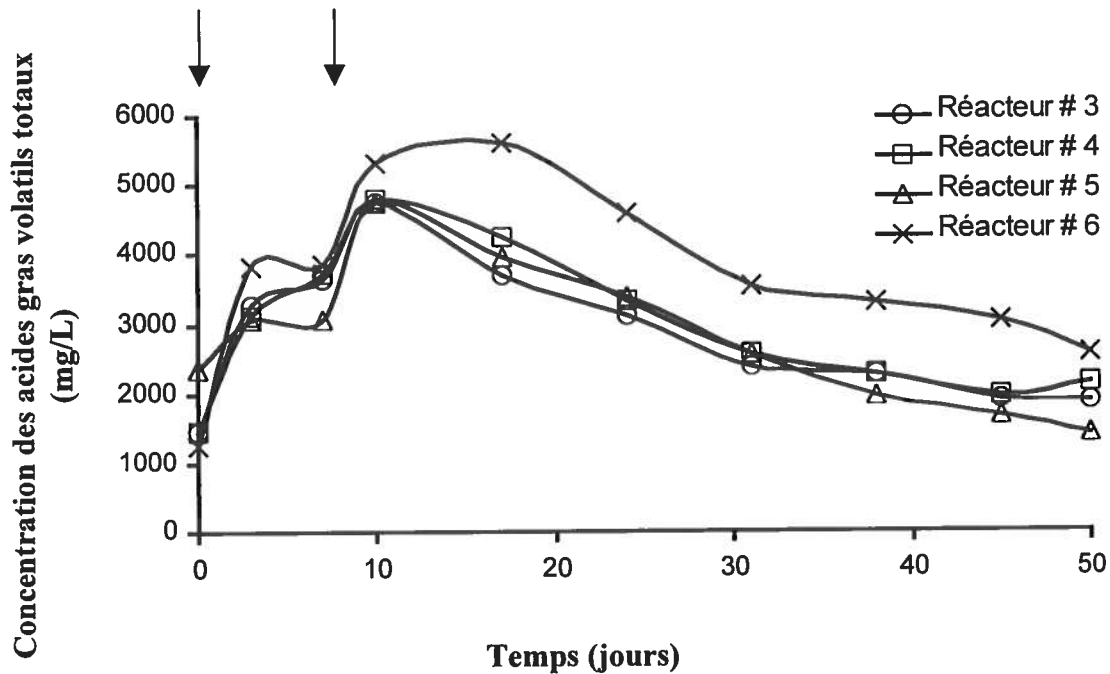


Figure 4 : Suivi des acides gras volatils totaux des réacteurs en conditions normales de traitement à une échelle laboratoire. Les flèches indiquent des ajouts de lisier frais.

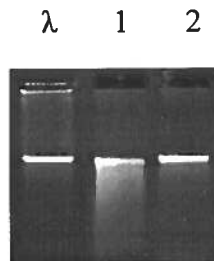


Figure 5 : Effet de l'EDTA sur la qualité de l'ADN extrait d'un échantillon de liqueur mixte. L'EDTA a été ajouté dans le mélange d'extraction avant l'étape de lyse. La concentration du gel d'agarose était de 1 % (p/v). Légende : λ) ADN du phage lambda purifié (100 ng). 1) Extraction en absence d'EDTA. 2) Extraction en présence d'EDTA.

La présence d'EDTA avant ou après la congélation des échantillons n'apporte pas de différence au niveau de la qualité de l'ADN (Figure 6). L'ADN n'est pas fragmentée et elle ne présente pas de traînée importante. Donc, pour la suite des expériences,

l'EDTA a été ajouté dans les échantillons immédiatement après leur prélèvement, à une concentration finale de 100 mM, de manière à les protéger tout au long de leur transport (entre le Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc de Lennoxville et l'INRS-Institut Armand-Frappier à Laval) et de leur entreposage à -20°C .

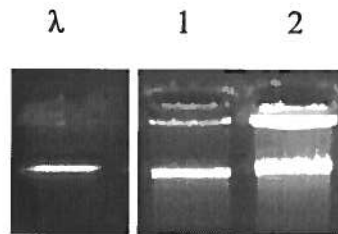


Figure 6 : Effet de l'EDTA ajouté aux échantillons avant ou après leur congélation.

La concentration du gel d'agarose était de 1,0 % (p/v). Légende : λ) ADN du phage lambda purifié (100 ng). 1) Extraction en présence d'EDTA avant la congélation de l'échantillon. 2) Extraction en présence d'EDTA après la congélation de l'échantillon.

Pour déterminer le temps de lyse optimal, quatre périodes ont été testées soit 1, 3, 5 et 10 minutes. Les résultats obtenus ont été semblables quelle que soit la durée de la lyse (Figure 7). Pour les expériences subséquentes, une période de lyse de 5 minutes a été utilisée.

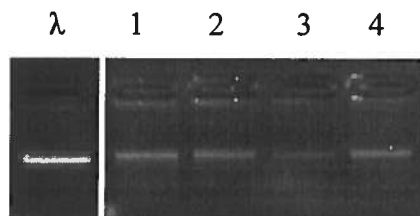


Figure 7 : Effet du temps de lyse sur des échantillons de liqueur mixte. La concentration du gel d'agarose était de 1,0 % (p/v). Légende : λ) ADN du phage lambda purifié (100 ng). 1) 1 minute. 2) 3 minutes. 3) 5 minutes. 4) 10 minutes.

Les essais concernant la quantité de billes de verre et le ratio entre la solution d'extraction et le volume d'échantillon sont résumés dans le Tableau 2. Les résultats

Tableau 2: Quantité de billes de verre et ratio entre la solution d'extraction et le volume d'échantillon testés pour la lyse cellulaire.

Échantillons	Quantité de billes (g)	Solution extraction (μ L)	Quantité échantillon (μ L)
1	0,5	250	250
2	0,5	250	500
3	0,5	500	500
4	0,5	500	250
5	1,0	250	250
6	1,0	250	500
7	1,0	500	500
8	1,0	500	250

obtenus démontrent qu'il existe seulement des différences mineures entre ces essais (Figure 8). Les paramètres utilisés pour l'échantillon # 3 semblent générer une lyse légèrement meilleure. En effet, la bande était nette, claire, sans traînée et une bonne quantité d'ADN était présente. Donc, toutes les lyses cellulaires subséquentes ont été faites en utilisant les conditions de l'échantillon # 3.

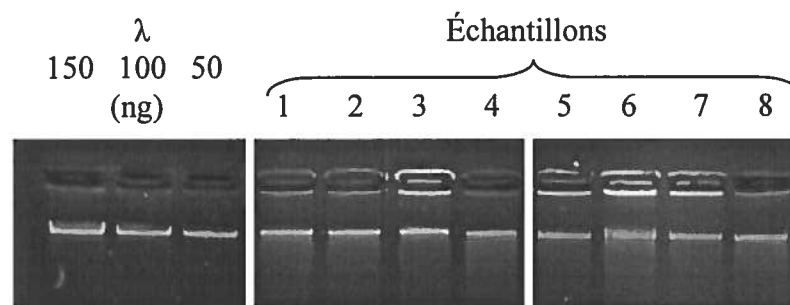


Figure 8 : Effet de la quantité de billes de verre et du ratio entre la solution d'extraction et la quantité d'échantillon dans la lyse cellulaire. La concentration du gel d'agarose était de 1,0 % (p/v). Légende : λ) ADN du phage lambda purifié (100 ng). Échantillons (voir Tableau 2).

3.3. Domaine des *Eubacteria*

L'analyse de la communauté microbienne appartenant au domaine des *Eubacteria* présente dans la liqueur mixte provenant des BOS a été effectuée sur les deux séries de réacteurs, soit ceux en période de démarrage et ceux en conditions normales de traitement. Le marqueur de souches pures, présent sur tous les DGGE, permet de comparer les profils entre eux. Le produit de PCR de chaque souche a été déposé sur un DGGE pour déterminer la hauteur de migration des différents fragments (résultats non présentés). L'ordre des souches sur le gel est indiqué à la Figure 9.

3.3.1. Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en période de démarrage

La diversité des populations (représentée par les bandes d'ADN sur les profils DGGE) du domaine des *Eubacteria* dans les échantillons de liqueur mixte provenant d'un réacteur en période de démarrage était très élevée. Certaines populations semblaient toutefois plus nombreuses que d'autres compte tenu de la différence en intensité des bandes. De plus, il y avait des différences entre les profils de réacteurs à différentes échelles. Les modifications des profils sont survenues surtout dans les premiers jours de la période de démarrage des réacteurs (Figures 9, 10 et 11). Pour le réacteur # 21 à l'échelle laboratoire de 42 L (Figure 9), les principaux changements sont survenus entre le début de la phase de démarrage et le jour 27. Pour le réacteur # 19 à l'échelle semi-industrielle de 12 m³ (Figure 10), les populations ont semblé plus stables à partir du jour 83, tandis que pour le réacteur # 24 à l'échelle commerciale de 160 m³ (Figure 11), les populations ont semblé plus stables à partir du jour 112. Les profils des communautés des réacteurs de même volume ont présenté des résultats similaires (Appendice A).

Un des changements était la forte diminution de l'intensité relative d'une population, identifiée par la lettre A sur les Figures 9, 10 et 11, et qui était présente dans le lisier brut. Malgré la diminution, cette population n'était pas complètement éliminée suite à la période de démarrage. Les populations identifiées par la lettre B sont apparues

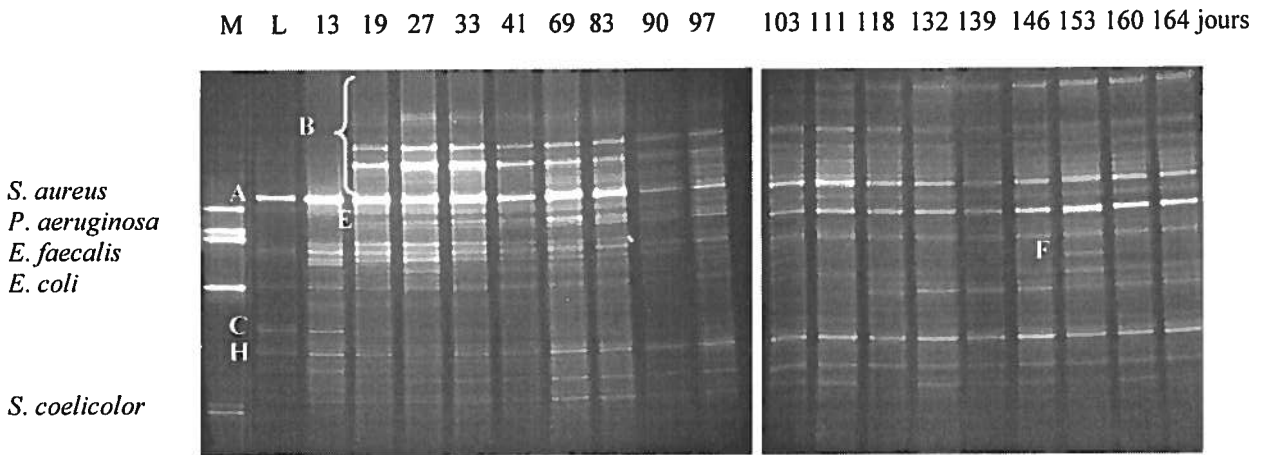


Figure 9 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 21, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %.

Légende : M) Marqueur de référence. L) Lisier brut. *S.* : *Staphylococcus*. *P.* : *Pseudomonas*. *E.* : *Enterococcus*. *E.* : *Escherichia*. *S.* : *Streptomyces*. Les lettres identifient certaines bandes d'intérêt.

M L 13 19 27 33 41 69 83 90 97 103 111 jours

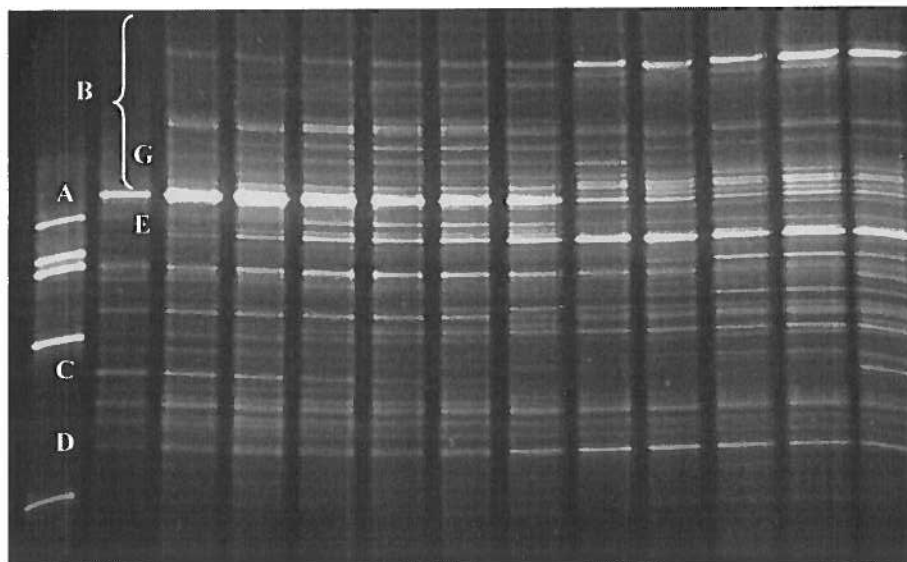


Figure 10 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 19, à l'échelle de 12 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) Lisier brut. Les lettres identifient certaines bandes d'intérêt.

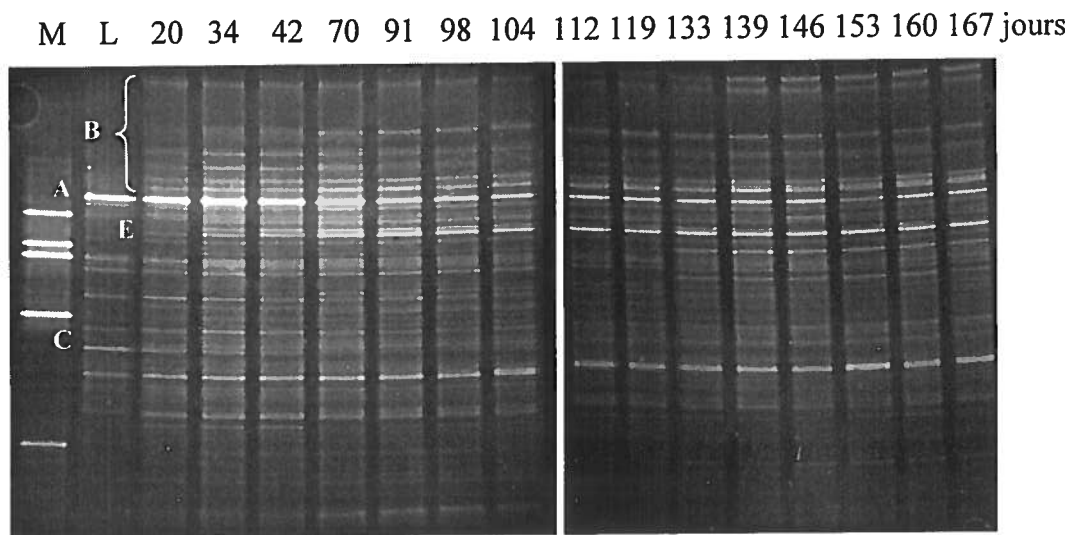


Figure 11 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 24, à l'échelle de 160 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) Lisier brut. Les lettres identifient certaines bandes d'intérêt.

à des jours différents dépendant de l'échelle des réacteurs. Pour le réacteur # 21 (Figure 9), les bandes sont apparues entre le jour 13 et 19. Pour le réacteur # 19 (Figure 10) et pour le réacteur # 24 (Figure 11), les bandes apparaissent entre le début de la phase de démarrage et les jours 13 et 20 respectivement. L'intensité relative des bandes de certaines de ces populations (représentées par la lettre B) augmentait graduellement ou diminuait au cours de la période de démarrage. La population C, présente dans le lisier a, pour sa part, presque complètement disparu suite à la période de démarrage (Figures 9, 10 et 11), alors que d'autres populations prenaient probablement de l'importance en nombre, car elles étaient présentes dans le lisier brut et l'intensité relative des bandes correspondantes augmentait au cours de la période de démarrage (D, Figure 10). La population représentée par la lettre E (Figures 9, 10 et 11) n'est pas présente dans le lisier brut, mais elle apparaît au cours de la période de démarrage, tout comme les populations identifiées par la lettre B. Certaine population pouvait apparaître une seule fois (F) (Figure 9) ou rester quelques jours puis disparaître (G, Figure 10).

3.3.2. Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en conditions normales de traitement

Pour le réacteur # 3 d'une échelle laboratoire de 42 L, la diversité des communautés microbiennes était très élevée tout au long du cycle de traitement de 50 jours (Figure 12). En effet, au moins 17 bandes peuvent être distinguées. De plus, il n'y a pas eu de variation importante des populations pendant le traitement. Les différences, pour un réacteur donné, se situaient entre le lisier brut, ayant servi à alimenter la biomasse, et le premier échantillon de liqueur mixte. Certaines populations, représentées par la lettre A (Figure 12) qui étaient présentes dans le lisier n'ont pas été détectées dans le réacteur même au premier jour du cycle. Aussi, une population, représentée par la lettre B (Figure 12) était présente dans les échantillons de liqueur mixte, alors qu'elle ne l'était pas dans le lisier brut. La présence d'une population majeure, représentée par la lettre C (Figure 12) qui se retrouve à la fois dans le lisier brut et la liqueur mixte est à noter. Les profils des communautés des réacteurs de même volume ont présenté des résultats similaires (Appendice B).

M L 0 3 7 10 17 21 24 28 31 38 45 50 jours

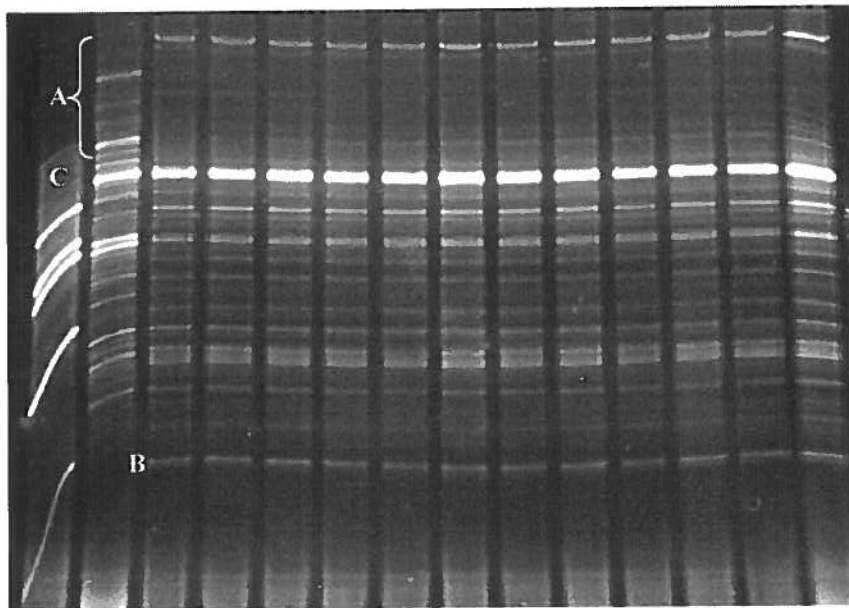


Figure 12 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 3, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) Lisier brut. Les lettres identifient certaines bandes d'intérêt.

Néanmoins, des variations mineures ont été observées entre les différents réacteurs lorsque nous avons comparé des échantillons prélevés au même jour de traitement (Figure 13). Par exemple, pour l'échantillon au temps 0 du réacteur # 3, nous avons remarqué une seule bande en haut du gel, alors que pour le même jour, nous avons remarqué trois bandes pour le réacteur # 4 et deux bandes pour le réacteur # 5. D'autres différences mineures étaient également perceptibles, comme des changements en intensité ou des changements dans le patron des bandes. Outre ces différences mineures, les profils observés pour chacun des réacteurs étaient semblables.

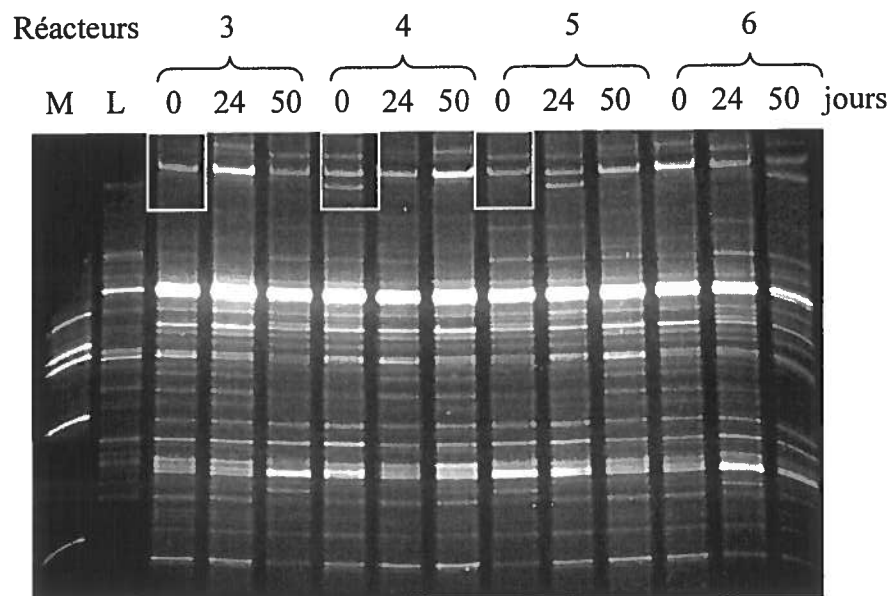


Figure 13 : Profil des *Eubacteria* des réacteurs # 3, # 4, # 5 et # 6, à l'échelle de 42 L, après 0, 24 et 50 jours en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) Lisier brut. Les carrés mettent en évidence certaines différences entre les réacteurs.

3.3.3. Criblage des clones

Une génothèque de clones a été créée à partir de l'échantillon du jour 24 du réacteur # 3 (réacteur en conditions normales de traitement). Le criblage des clones s'est fait en utilisant la méthode du DGGE. Cependant, puisque l'extraction d'ADN contenait en plus de plasmides transformés, l'ADN chromosomique des cellules hôtes, il y avait

deux bandes pour chaque clone sur les gels. Une bande provenait de l'amplification des gènes de l'ADNr 16S d'*Escherichia coli* puisque celle-ci se situait à la même hauteur que la bande d'*E. coli* dans le marqueur de référence, tandis que l'autre bande représente l'ADNr 16S des clones. Les 54 clones criblés ont été classifiés en 23 groupes (Figure 14).

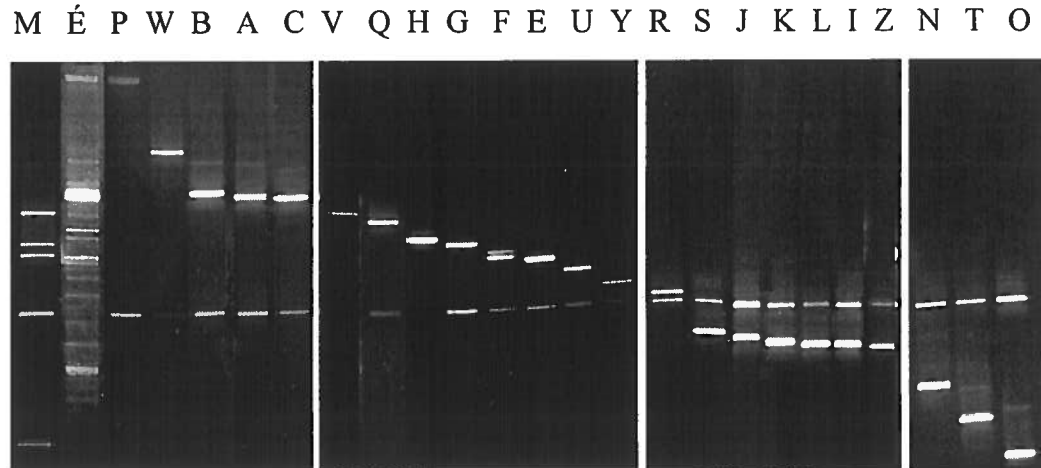


Figure 14 : Profil de l'échantillon du réacteur # 3 au jour 24 et d'un représentant de chaque groupe de clones. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. É) échantillon. Les autres lettres correspondent au nom attribué à chaque groupe de clones.

Chaque groupe de clones correspond à une bande présente dans l'échantillon de départ à l'exception du groupe W. Trois de ces groupes (E, I et W) se sont avérés être des chimères et ont été exclus des analyses. La Figure 15 montre la courbe de raréfaction obtenue avec les données des 20 groupes non-chimériques. Le tracé n'atteint pas de plateau suggérant que les 20 groupes obtenus ne représentent pas toute la biodiversité de l'échantillon. D'après l'analyse de ChaoI, le nombre de groupes présents dans l'échantillon serait estimé à 36. Les 20 groupes que nous avons obtenus représenteraient alors 55,5 % de ce nombre.

3.3.4. Affiliations des groupes de clones

Pour chaque groupe, un clone a été sélectionné pour en faire séquencer l'ADNr 16S, à l'exception du groupe H où deux clones ont été sélectionnés (# 73 et # 120). La séquence

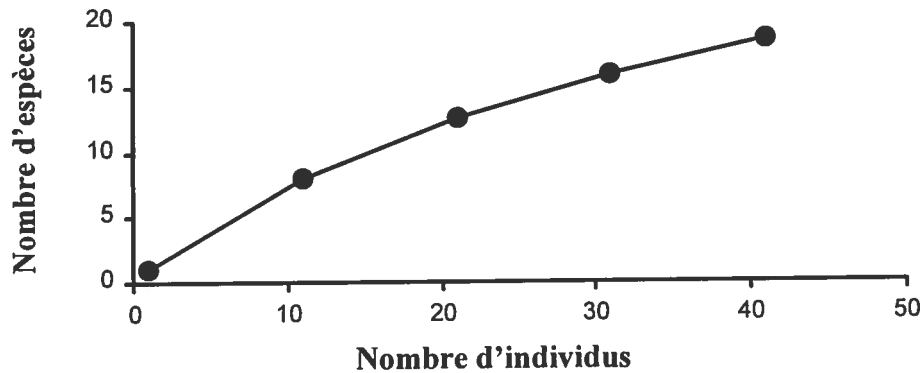


Figure 15 : Courbe de raréfaction de la génothèque de clones du domaine *Eubacteria*.

des clones a été comparée avec les séquences disponibles dans les banques de données. Cette première comparaison nous a permis de classer nos séquences à différents regroupements d'*Eubacteria*. À part deux séquences qui se situaient à 98 % (groupe F) et 95 % (groupe L), tous les autres pourcentages d'identité se situaient en deçà de 93 %. Les séquences utilisées pour l'analyse phylogénique avaient des longueurs comprises entre 810 et 1160 pb et huit arbres phylogéniques ont été construits en regroupant les séquences apparentées au même genre. Les groupes B, A, et F sont regroupés sous le genre *Bacteroides* (Figure 16) et représentaient 37,5 % des 54 clones criblés. Les groupes G et Y avaient des séquences proches des genres *Spirochete* et *Treponema* (Figure 17) et représentaient 4,2 % des clones. Les groupes C, V, et Q représentaient 10,4 % des clones et avaient des séquences apparentées au genre *Acholeplasma* (Figure 18), tandis que les groupes N, T et O (18,8 %) sont apparentés avec le genre *Caloramator* (Figure 19). Les groupes H, U, S, J, L et Z sont apparentés au super groupe des *Clostridium* (Figure 20). C'est le deuxième groupe de clones en importance avec 22,9 %. Les groupes P (Figure 21) et R (Figure 22), représentant chacun 2,1 % des clones, n'ont pas pu être regroupés sous un genre particulier. En fait, le groupe P s'apparente à des espèces provenant de l'environnement sans toutefois avoir une identification précise. Le groupe K est apparenté à des bactéries isolées d'un environnement semblable au BOS. Quant au groupe K (Figure 23), représentant 2,1 % des clones, il s'apparente au genre *Alkaliphilus*. Pour chaque arbre, *Escherichia coli* était le groupe externe.

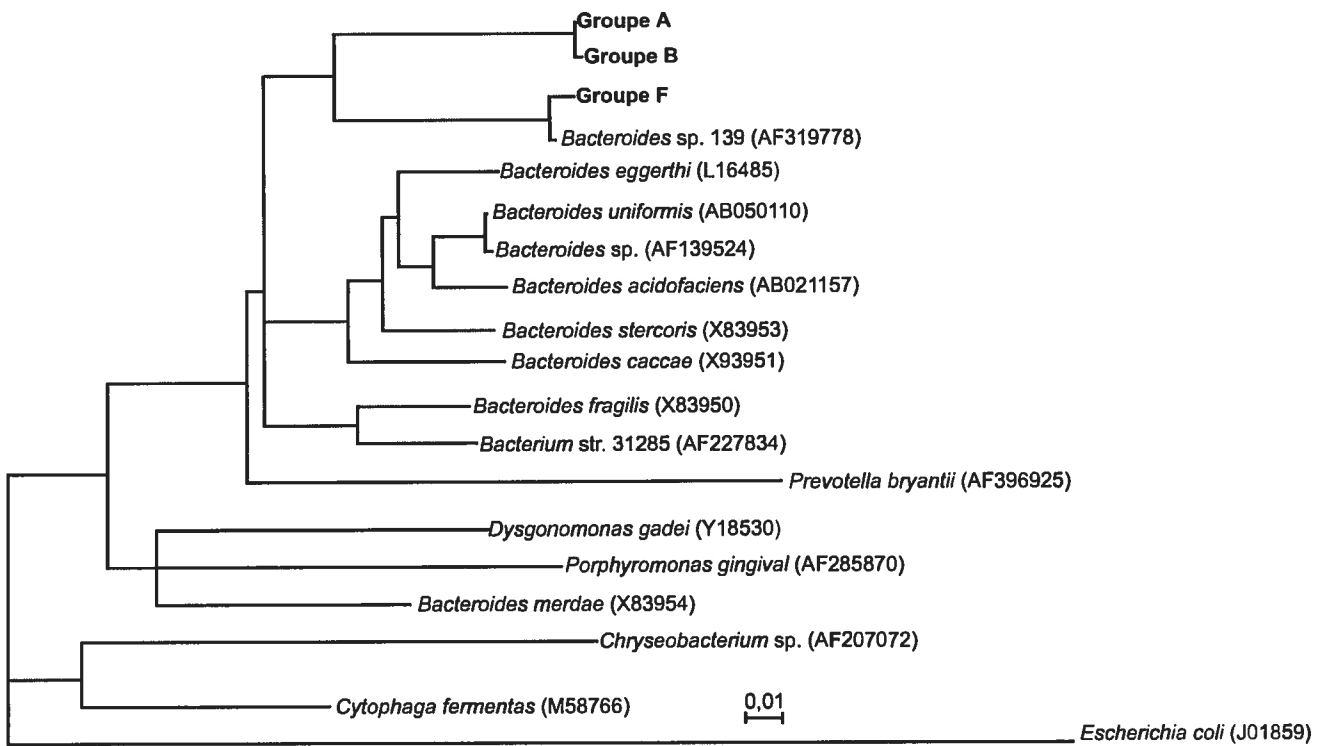


Figure 16 : Arbre phylogénique du groupe *Bacteroides*. Légende : La barre représente une substitution d'un nucléotide à chaque centaine (1 %).

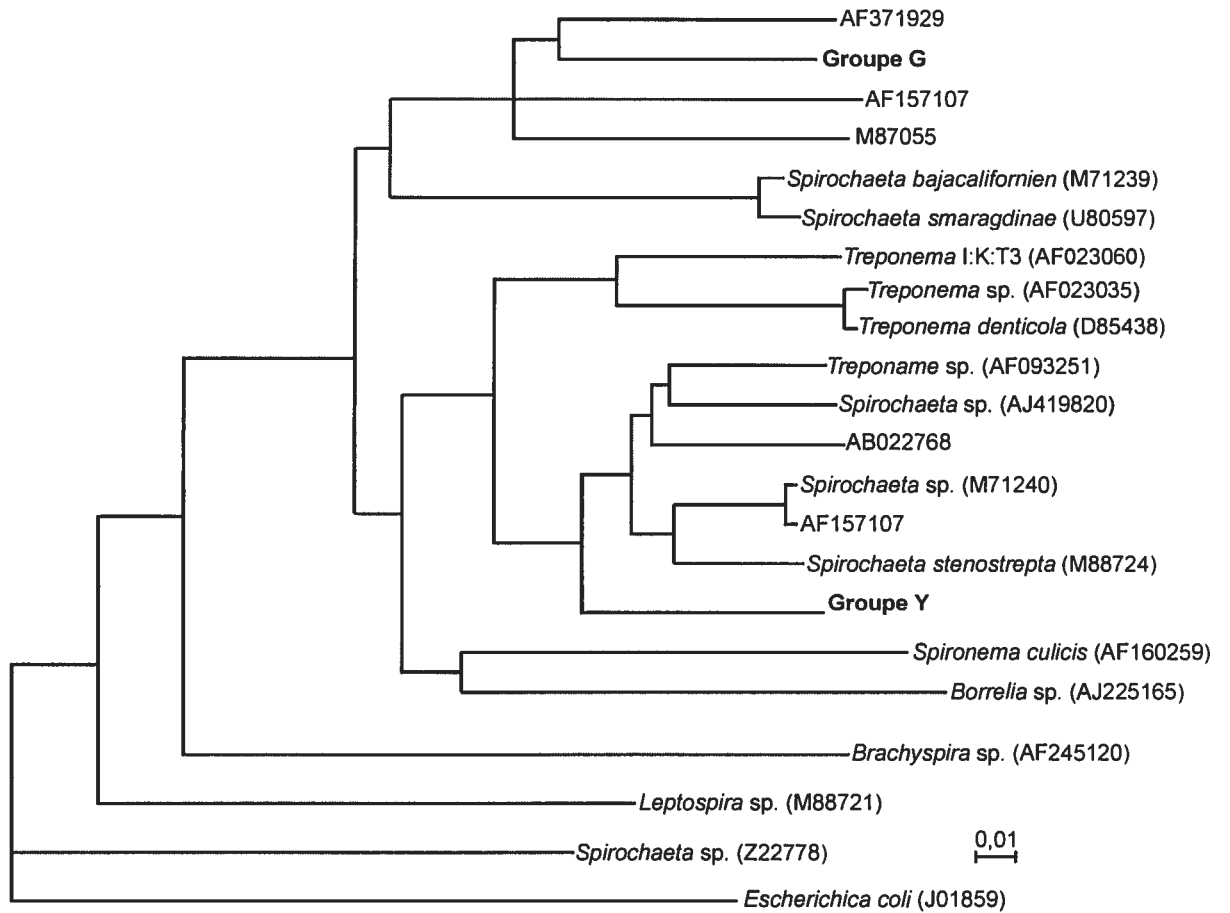


Figure 17 : Arbre phylogénique du groupe *Spirochete/Treponema*. Légende : La barre représente une substitution d'un nucléotide à chaque centaine (1 %).

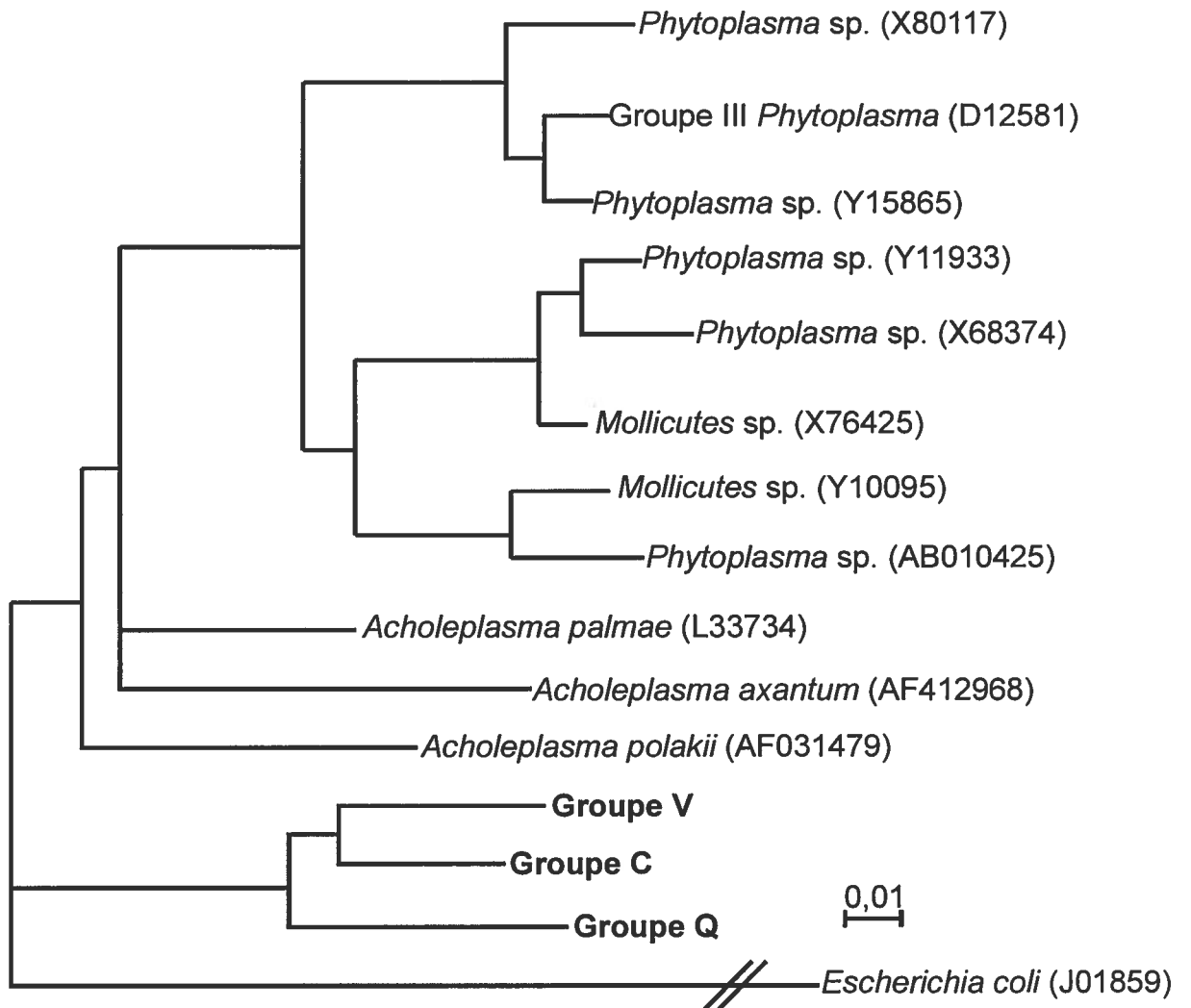


Figure 18 : Arbre phylogénique du groupe *Acholeplasma*. Légende : La barre représente une substitution d'un nucléotide à chaque centaine (1 %).

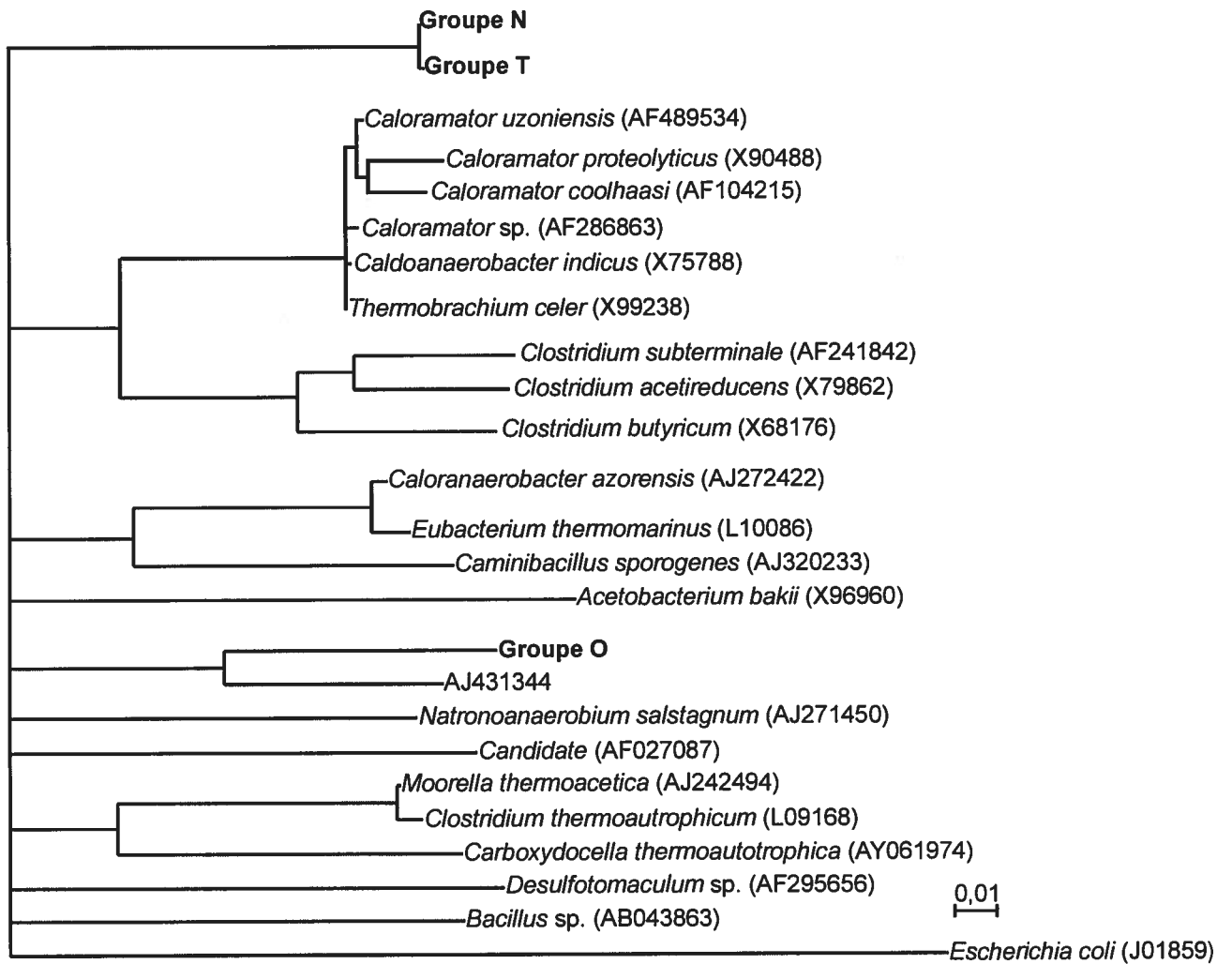


Figure 19 : Arbre phylogénique du groupe *Caloramator*. Légende : La barre représente une substitution d'un nucléotide à chaque centaine (1 %).

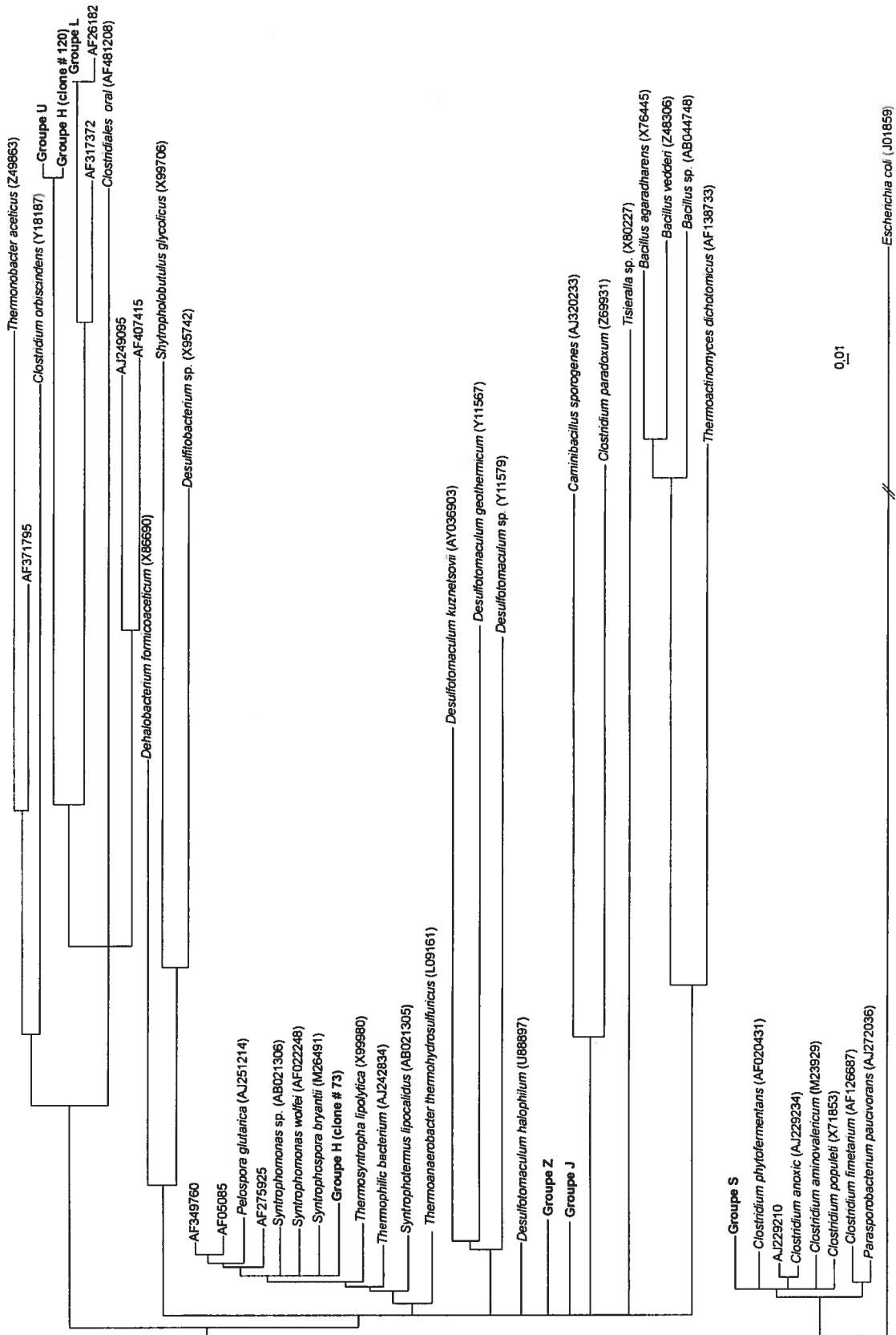


Figure 20 : Arbre phylogénique du groupe *Clostridium*. Légende : La barre représente une substitution d'un nucléotide à chaque centaine (1 %).

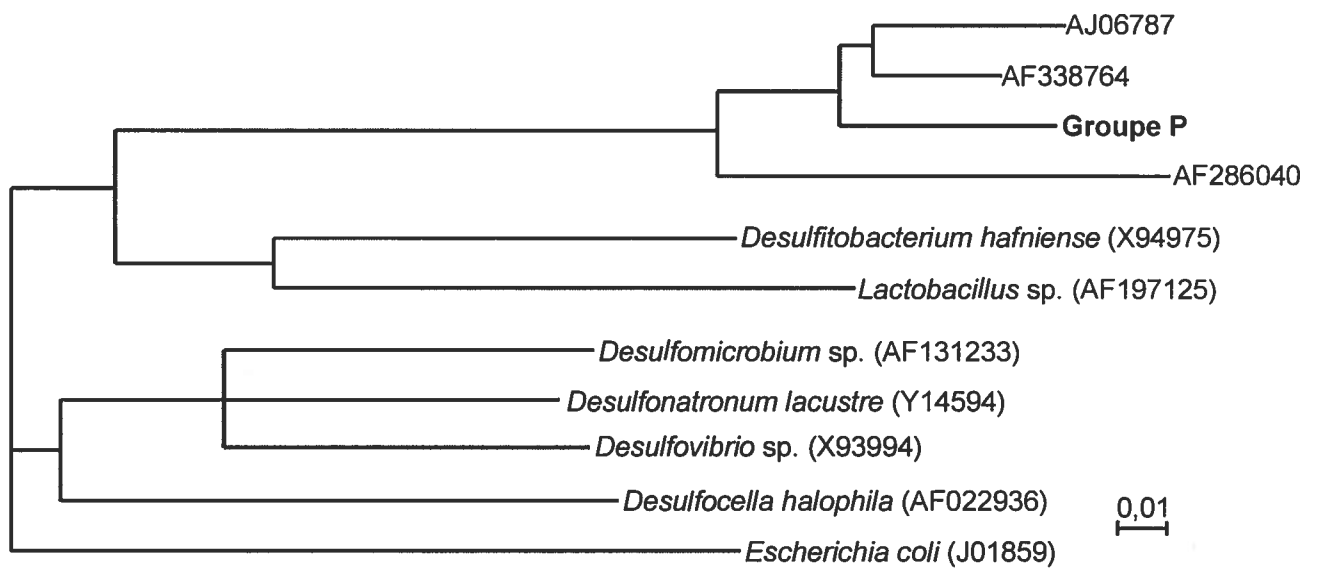


Figure 21 : Arbre phylogénique du groupe P. Légende : La barre représente une substitution d'un nucléotide à chaque centaine (1 %).

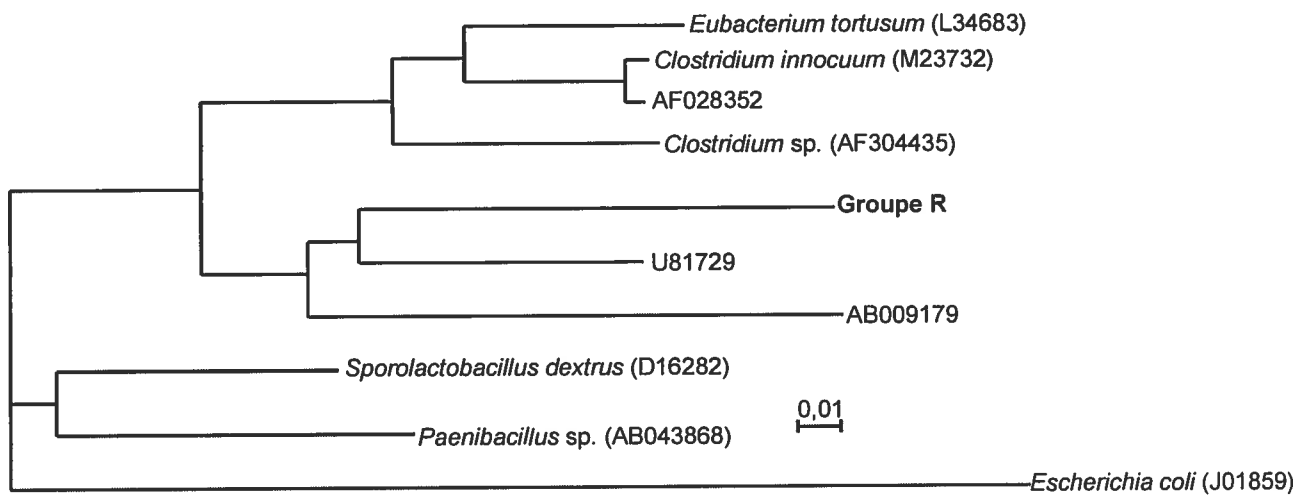


Figure 22 : Arbre phylogénique du groupe R. Légende : La barre représente une substitution d'un nucléotide à chaque centaine (1 %).

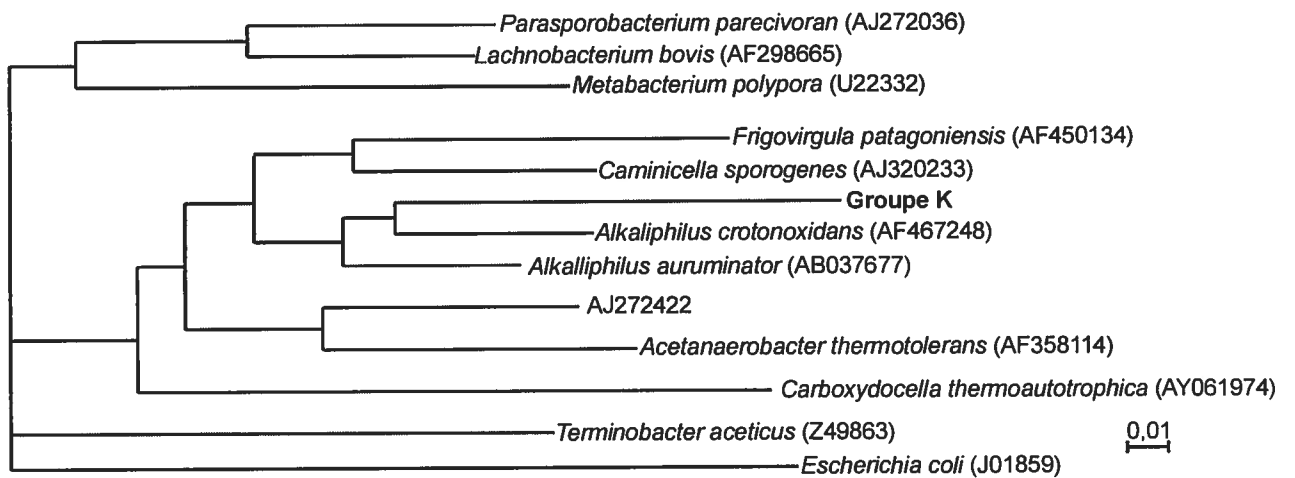


Figure 23 : Arbre phylogénique du groupe K. Légende : La barre représente une substitution d'un nucléotide à chaque centaine (1 %).

3.4. Domaine des *Archaea*

L'analyse de la communauté microbienne, appartenant au domaine des *Archaea* présente dans la liqueur mixte provenant des BOS, a été effectuée sur les deux séries de réacteurs, soit ceux en période de démarrage et ceux en conditions normales de traitement. Deux paires d'amorces différentes ont été utilisées soit Arch D avec Arch G et Arch 69f avec Arch 958r. Les résultats complets (profils des communautés sur gel, génothèques de clones et analyses phylogéniques) pour la première stratégie d'amplification sont d'abord présentés (section 3.4.1.) suivi de ceux obtenus avec la deuxième stratégie d'amplification (section 3.4.2). Le marqueur de référence était également présent dans tous les profils présentés, toujours dans le but de pouvoir comparer les profils entre eux.

3.4.1. Utilisation de la première stratégie d'amplification

La première paire d'amorce utilisée a été Arch D et Arch G. Celle-ci a servi pour une analyse par DGGE en combinaison avec la paire d'amorces Arch 344f et 534r pour un PCR interne. La paire d'amorces Arch D et Arch G a également servi pour la constitution d'une génothèque de clones.

3.4.1.1. Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en période de démarrage

Les profils des communautés microbiennes pour le domaine des *Archaea* ont démontré une faible diversité comparée aux profils des communautés pour le domaine des *Eubacteria*. L'utilisation de cette paire d'amorces n'a pas permis d'obtenir une amplification dans l'échantillon du lisier brut, mais a permis de mettre en évidence un total de six bandes, dont seulement deux étaient communes à toutes les échelles (représentées par les lettres A et B, Figures 24, 25 et 26). La dénaturation de ces deux fragments dans le gel s'est faite à un pourcentage de dénaturant élevé. Ces dernières ont

M 13 19 27 33 41 69 83 90 97 103 111 118 132 139 146 153 160 164 jours

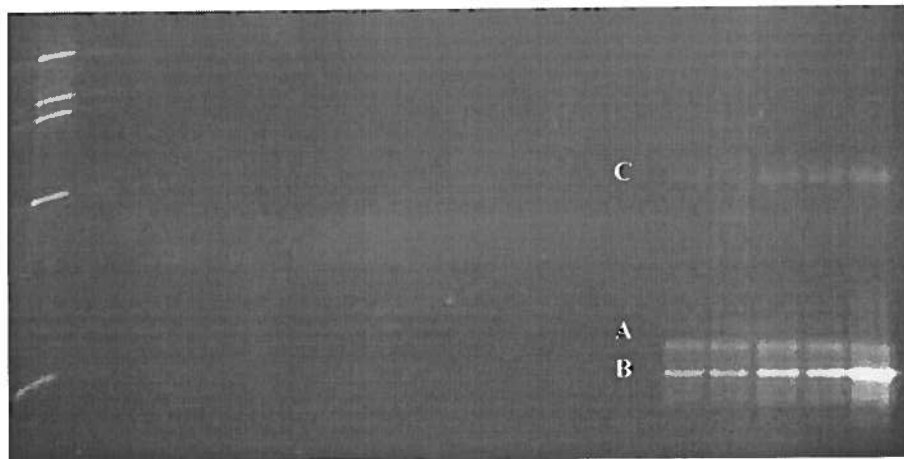


Figure 24 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 21, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. Les lettres identifient certaines bandes d'intérêt.

M 13 69 111 jours

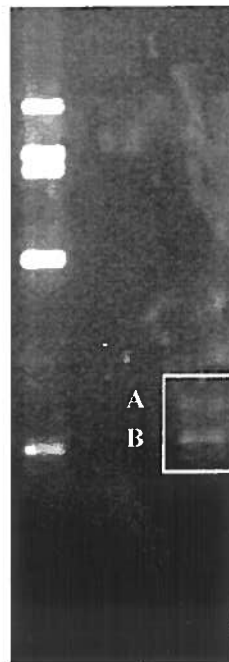


Figure 25 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 19, à l'échelle de 12 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. Le carré met en évidence les deux bandes d'intérêt identifiées par les lettres.

M 20 91 160 jours

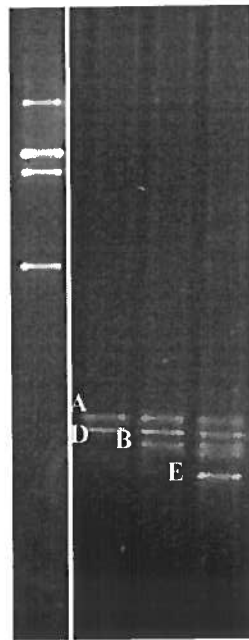


Figure 26 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 24, à l'échelle de 160 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. Les lettres identifient les bandes d'intérêt.

donc un contenu en G + C élevé. La population représentée par la lettre C (Figure 24) est en quantité plus faible en a juger par l'intensité des bandes. Pour les réacteurs à l'échelle laboratoire (Figure 24) et semi-industrielle (Figure 25), aucune population n'a été détectée au début de la période de démarrage des réacteurs. Les populations apparaissaient généralement après un certain temps d'incubation. Pour le réacteur à l'échelle laboratoire, les populations sont apparues après le jour 132 (Figure 24) et une des deux bandes (B) était plus intense. Cependant, pour le réacteur # 19, à l'échelle de 12 m³, (Figure 25) les deux populations sont apparues après le jour 69 et ce, en ayant des intensités relatives similaires, mais faibles. Alors que pour le réacteur # 24, à l'échelle de 160 m³, (Figure 26), deux des populations ont été présentes (A et D) du jour 20 au jour 160, tandis qu'une (B) est apparue entre le jour 20 et 91. Finalement, la dernière population (E) est apparue entre le jour 91 et 160. Les profils des communautés des réacteurs de même volume ont présenté des profils quelque peu différents (Appendice C). En effet, pour le réacteur # 22 à l'échelle de 42 L (Figure C-1), il y a seulement deux populations présentes et elles apparaissent plus tôt dans la période de démarrage. De plus, pour les réacteurs à l'échelle semi-industrielle # 17 et # 18 (Figures C-2 et C-3), les populations semblent également apparaître plus tôt dans la période de démarrage.

3.4.1.2. Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en conditions normales de traitement

Dans le réacteur # 3 (Figure 27), d'une échelle de 42 L, deux populations (A et B) étaient toujours présentes, tout au long du cycle de dégradation de 50 jours. Il s'agissait des mêmes populations principales retrouvées dans les réacteurs en période de démarrage, représentées par les lettres A et B dans les Figures 24, 25 et 26, puisque la dénaturation des fragments d'ADN se faisait au même endroit. L'intensité de la bande du bas était légèrement plus intense (Figure 27), tout comme dans le cas de la Figure 24. Cela se voit particulièrement bien au jour 50 du traitement. Les profils des communautés des réacteurs de même volume ont présenté des résultats similaires (Appendice D).

M 0 3 7 10 17 21 24 28 31 38 45 50 jours

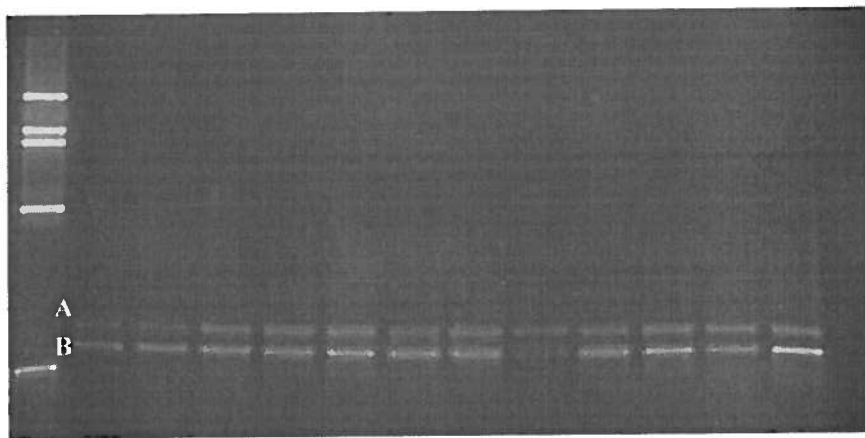


Figure 27 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 3, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. Les lettres identifient certaines bandes d'intérêt.

3.4.1.3. Criblage des clones

Une génothèque de clones a été constituée à partir de l'échantillon du jour 164 du réacteur # 21 (période de démarrage). Suite au criblage avec le RFLP, les clones ont été répartis dans 16 groupes. Ces groupes ont été formés à la suite des combinaisons des patrons de fragments de chaque enzyme comme le démontre, en exemple pour le clone # 1 qui fait partie du groupe Ar 1, la Figure 28. Le Tableau E-1 de l'Appendice E montre les groupes de clones formés.

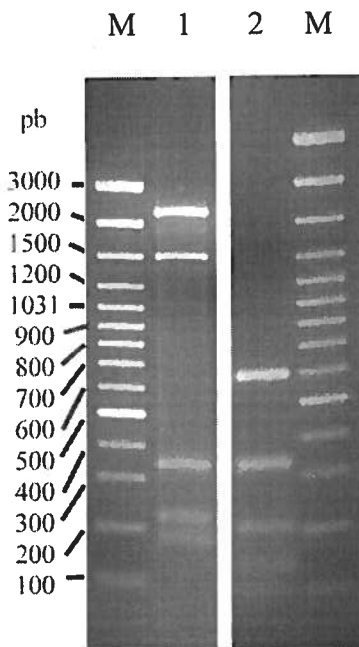


Figure 28: Patrons des digestions des fragments du clone # 1 de la génothèque de clones Arch D et Arch G. La concentration du gel d'agarose était de 2,0 % (p/v). Légende: M) Marqueur «DNA ladder Plus» 100 pb. 1) Digestion avec *RsaI* de l'ADN plasmidique et chromosomique du clone # 1. 2) Digestion avec *HhaI* de l'insert du clone # 1.

Pour le criblage des clones sur le DGGE, six groupes ont été formés (Figure 29). Le groupe K a été le plus abondant avec 86 % des clones. Pour ce groupe, la dénaturation

M É K L M O P N

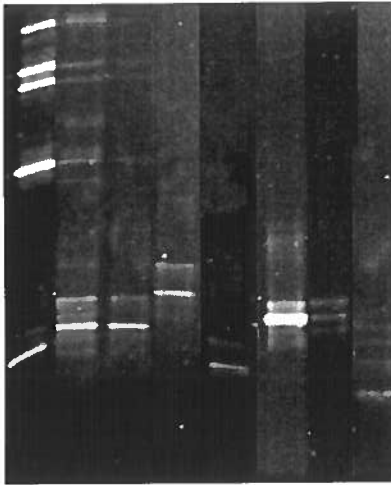


Figure 29 : Profil de l'échantillon du réacteur # 21 au jour 164 et d'un représentant de chaque groupe de clones obtenus avec la paire d'amorces Arch D et Arch G. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. É) échantillon. Les autres lettres correspondent au nom attribué à chaque groupe de clones.

est survenue dans la partie inférieure du gel, à la même hauteur que les deux bandes présentes dans l'échantillon de départ (il y a eu un débordement du puits du marqueur dans le puits pour l'échantillon, ce qui explique des bandes dans le haut du gel). Tous les clones de ce groupe présentaient au moins deux bandes. Aucune de ces bandes ne peut représenter l'ADN chromosomique d'*Escherichia coli* (utilisée comme cellules hôtes), étant donné que les amorces utilisées s'appariaient spécifiquement à l'ADN des *Archaea*. D'ailleurs aucune bande ne se situait à la même hauteur que le fragment de *E. coli* dans le marqueur de référence. Dans ce doublet de bandes, l'une était plus intense que l'autre et c'était généralement celle du bas. Les groupes L, M, O et P présentaient également des doublets de bandes. Par contre, ces dernières n'ont pas migré à des hauteurs correspondant à des fragments présents dans l'échantillon rendant ainsi difficile l'identification des clones. Finalement, pour ce qui est du dernier groupe, N, il présentait plusieurs bandes.

Seuls les groupes formés suite au criblage sur RFLP ont été retenus pour les analyses statistiques. Deux groupes (Ar 6 et Ar 12) ont été exclus des analyses puisqu'ils se sont avérés être des chimères. La Figure 30 montre la courbe de raréfaction obtenue avec les 14 groupes. Cette courbe n'atteint pas de plateau suggérant que les 14 groupes ne représentent pas toute la biodiversité de l'échantillon. De plus, selon l'algorithme de ChaoI, 34 groupes auraient dû être isolés. Les 14 groupes obtenus représentent seulement 41,1 % de ce nombre.

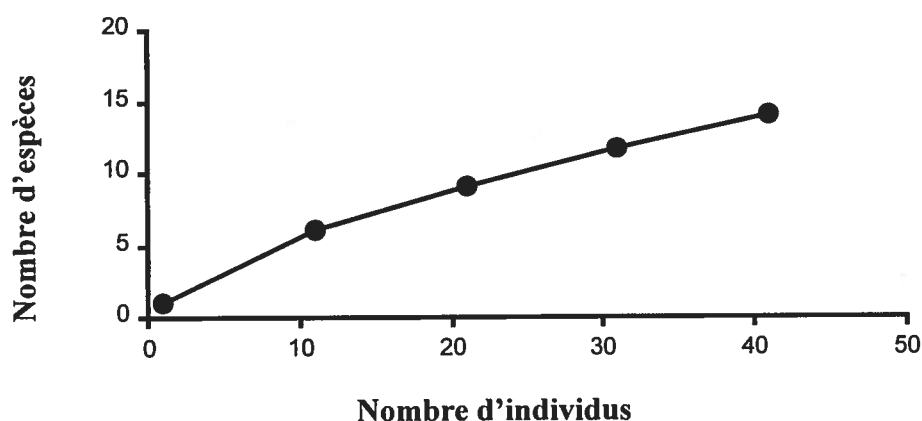


Figure 30 : Courbe de raréfaction de la génothèque de clones formée avec la paire d'amorces Arch D et Arch G.

3.4.1.4. Affiliations des groupes de clones

Comme les groupes ont été formés sur la base des différents patrons de digestion obtenus suite au criblage avec la méthode du RFLP, un clone a été choisi par groupe pour le séquençage de l'ADNr 16S. Cependant, pour le groupe Ar 4, deux clones ont été choisis soit les clones # 6 et # 11. La majorité des clones, 87,8 % (groupe Ar 1, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15 et 16), sont apparentés au genre *Methanoculleus*. Le groupe Ar 2 (4,9 %) est apparenté au genre *Methanosarcina*, alors que le groupe Ar 9 (4,9 %) l'a été au genre *Methanocorpusculum*. Quant au groupe Ar 3, représentant un seul clone (2,4 %), l'analyse préliminaire de la séquence indiquait une chimère. Or, la majorité de la séquence, soit 676 nucléotides, avait une affiliation avec le genre *Methanogenium*. Puisque c'était la seule séquence présentant une affiliation avec ce genre, celle-ci a été

conservée et utilisée pour l'analyse phylogénique. Les séquences avaient une longueur de 690 pb pour l'analyse phylogénique. Les pourcentages d'identité entre les séquences des clones et les séquences disponibles dans les banques de données étaient comprises entre 95 et 98 % pour les affiliations avec le genre *Methanoculleus*, de 98 % pour le genre *Methanocorpusculum*, de 95 % pour le genre *Methanosarcina* et de 95 % pour le genre *Methanogenium*. Suite à l'analyse statistique des séquences, un arbre phylogénique a été construit (Figure 31) présentant quatre groupes d'espèces différentes. *Escherichia coli* était le groupe externe.

3.4.2. Utilisation de la deuxième stratégie d'amplification

La deuxième paire d'amorce utilisée a été Arch 69f et Arch 958r. Celle-ci a servi pour une analyse par DGGE, en combinaison avec la paire d'amorces Arch 344f et 534r pour un PCR interne. La paire d'amorces Arch 69f et Arch 958r a également servi pour la constitution d'une génothèque de clones.

3.4.2.1. Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en période de démarrage

L'utilisation de cette paire d'amorces a permis de mettre en évidence un minimum de quatre populations présentes dans les échantillons. La dénaturation de l'ADN de ces populations survenait à des endroits complètement différents de ceux retrouvés avec la première stratégie d'amplification. De plus, en utilisant cette paire d'amorces, il y avait cette fois un produit d'amplification dans l'échantillon du lisier brut (résultat non présenté). Dans les profils, la bande principale se situait à des concentrations de dénaturant relativement faible (Figures 32, 33 et 34). Les différentes bandes observées étaient pour la plupart présentes dans tous les échantillons de liqueur mixte prélevés au cours de la période de démarrage. Il y a cependant des exceptions pour des populations, représentée par les lettres A et B, qui apparaissent après les jours 69 et 139 dans le profil observé pour le réacteur # 21, à l'échelle laboratoire de 42 L (Figure 32). Cependant,

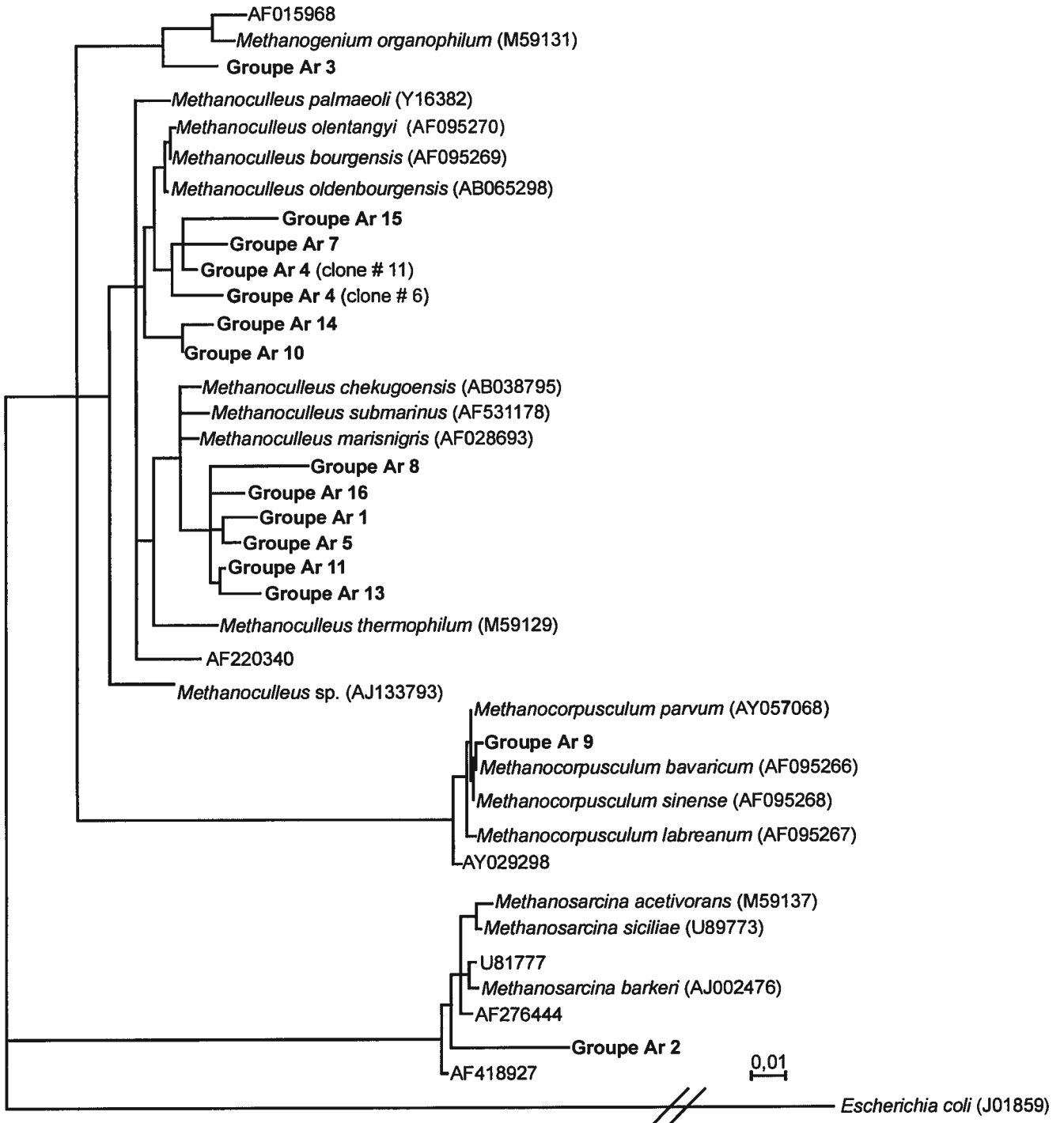


Figure 31 : Arbre phylogénique de la génothèque de clones *Archaea* formée avec la paire d’amorces Arch D et Arch G. Légende : La barre représente une substitution d’un nucléotide à chaque centaine (1 %).

M 13 19 27 33 41 69 83 90 97 103 111 118 132 139 146 153 160 164 jours

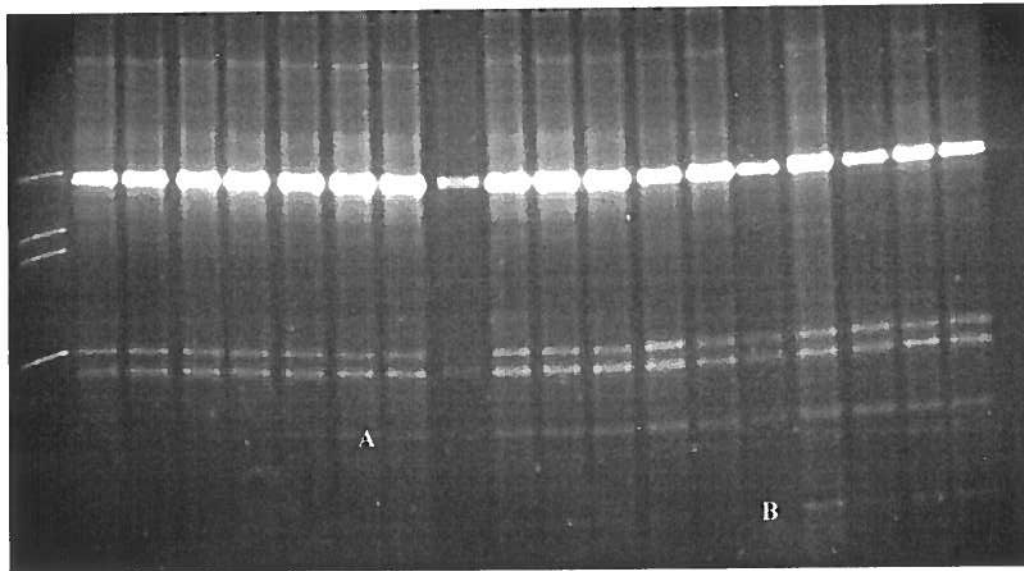


Figure 32 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 21, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. Les lettres identifient certaines bandes d'intérêt.

M 13 69 111 jours

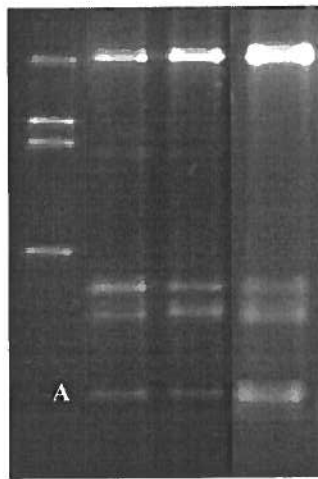


Figure 33 : Profil des *Archaea*, ADN amplifiés avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 19, à l'échelle de 12 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. La lettre identifie une bande d'intérêt.

M 20 91 160 jours

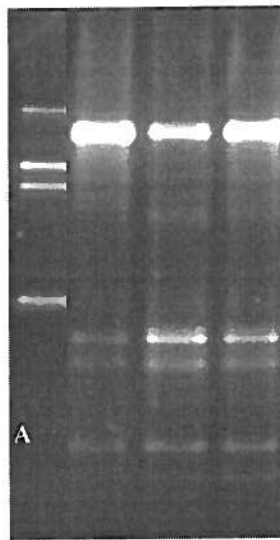


Figure 34 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 24, à l'échelle de 160 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. La lettre identifie une bande d'intérêt.

dans les réacteurs # 19, à l'échelle de 12 m³ (Figure 33) et # 24 à l'échelle de 160 m³ (Figure 34) la bande A était présente bien avant et elle augmentait en intensité avec le temps. Quant à la bande B, elle n'est pas présente dans les Figures 33 et 34. Les profils des communautés des réacteurs de même volume ont présenté des résultats similaires (Appendice F). Cependant, pour les profils observés pour les réacteurs à l'échelle semi-industrielle # 17 et # 18 (Figures F-2 et F-3), la bande représentée par la lettre A (Figure 33) est présente dans le jour 13, mais pas par la suite.

3.4.2.2. Profils des communautés microbiennes sur DGGE des réacteurs en conditions normales de traitement

Trois populations étaient présentes dans ce type de profil (Figure 35). Il s'agissait des mêmes populations que dans les profils des réacteurs en période de démarrage à l'exception de la bande A (Figures 32, 33 et 34) qui n'était plus présente. Comme observé précédemment, la première bande était plus intense que les deux autres. Les trois populations étaient stables tout au long du cycle de traitement. Le même type de profil a été observé pour le réacteur # 4 (Figure G-1, Appendice G). Par contre, dans les profils observés pour les réacteurs # 5 et # 6 (Figures G-2 et G-3, Appendice G), une quatrième bande apparaît dénaturant à la même hauteur que la bande A des Figures 32, 33 et 34.

3.4.2.3. Criblage des clones

Une génothèque de clones a été constituée à partir de l'échantillon du jour 164 du réacteur # 21 (période de démarrage). Le criblage des 44 clones a été fait en utilisant deux méthodes, soit le RFLP et le DGGE. Suite au criblage avec le RFLP, les clones ont été répartis dans 17 groupes. La Figure 36 montre, en exemple pour le clone # 102 qui fait parti du groupe Ar 19, une combinaison des deux patrons de digestion. Le Tableau H-1 de l'Appendice H montre les groupes de clones formés.

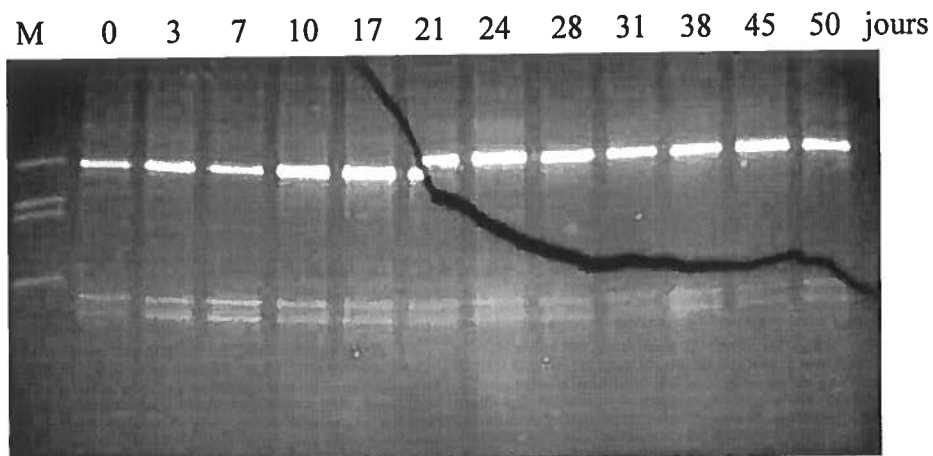


Figure 35 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 3, à l'échelle de 42 L, au cours du cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

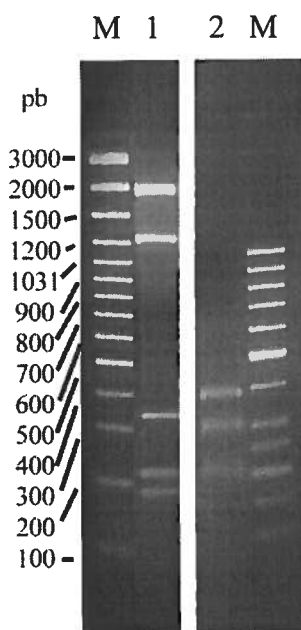


Figure 36 : Patrons des digestions des fragments du clone # 102 de la génothèque de clones Arch 69f et Arch 958r. La concentration du gel d'agarose était de 2,0 % (p/v). Légende: M) Marqueur «DNA ladder Plus» 100 pb. 1) Digestion avec *RsaI* de l'ADN plasmidique et chromosomique du clone # 102. 2) Digestion avec *HhaI* de l'insert du clone # 102.

Pour ce qui était du criblage sur le DGGE, sept groupes de clones ont été formés (Figure 37). Il y a tout d'abord le groupe T qui représente la première bande dans

M É T R W S Q V X

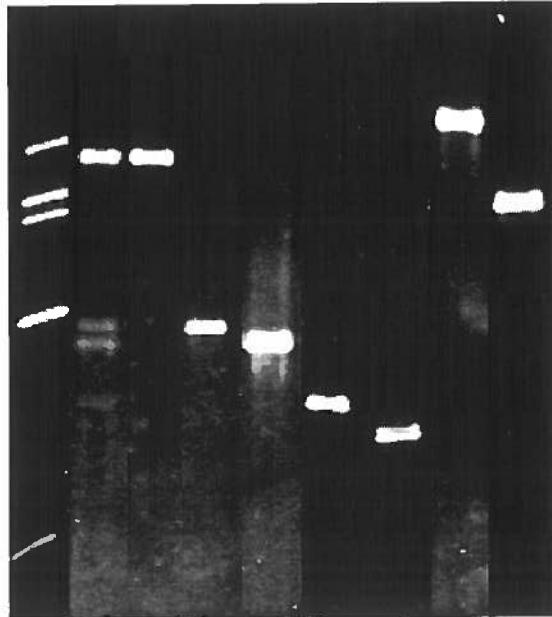


Figure 37 : Profil de l'échantillon du réacteur # 21 au jour 164 et d'un représentant de chaque groupe de clones obtenus avec la paire d'amorces Arch 69f et Arch 958r. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. É) échantillon. Les autres lettres correspondent au nom attribué à chaque groupe de clones.

dans l'échantillon, soit la plus intense. C'était d'ailleurs dans ce groupe qu'il y a le plus de clones, soit 40,5 %. Il y a ensuite les groupes R (27 %) et W (8,1 %) qui représentent les deuxième et troisième bandes. Finalement, le groupe S (5,4 %) représente la quatrième bande au bas du gel. Les trois autres groupes formés, soit Q (13,5 %), V (2,7 %) et X (2,7 %), n'étaient pas reliés à une bande dans l'échantillon de départ.

Seul les groupes formés suite au criblage sur RFLP ont été retenus pour les analyses statistiques. La Figure 38 montre la courbe de raréfaction obtenue avec les 17 groupes. La courbe n'atteint pas de plateau suggérant que les 17 groupes ne représentent

pas toute la biodiversité de l'échantillon. De plus, selon l'algorithme de ChaoI, 23 groupes auraient dû être isolés. Les 17 groupes obtenus représentent 73,9 % de ce nombre.

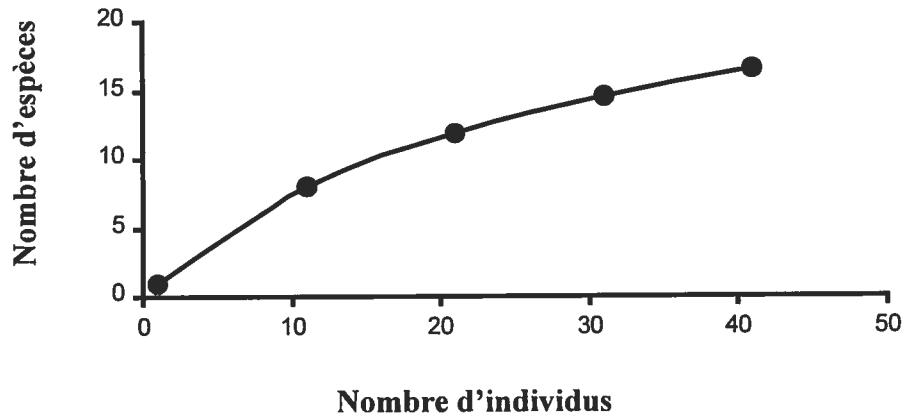


Figure 38 : Courbe de raréfaction de la génothèque de clones formée avec la paire d'amorces Arch 69f et Arch 958r.

3.4.2.4. Affiliations des groupes de clones

Puisque les groupes ont été formés sur la base des différents patrons de digestion obtenus suite au criblage avec la méthode du RFLP, un clone a été choisi par groupe pour le séquençage de l'ADNr 16S. Pour l'analyse phylogénique, les séquences avaient des longueurs de 953 pb. Suite à l'analyse des séquences, les différents groupes ont été rassemblés en quatre genres distincts. Les groupes représentant le plus de clones, avec 38,6 %, étaient apparentés au genre *Methanobrevibacter*. Le deuxième groupe de clones en importance, 29,5 %, étaient apparenté au genre *Methanosaeta*, tandis que le troisième groupe, avec 25 % des clones, l'était au genre *Methanosphaera*. Enfin, seulement 6,8 % des clones ont été apparentés au genre *Methanobacterium*. Les pourcentages d'identité des séquences sont élevés avec les genres *Methanobrevibacter* (97-99 %) et *Methanosaeta* (96-98 %). Le pourcentage d'identité avec le genre *Methanobacterium* se situait entre 94 et 96 %, tandis qu'avec le genre *Methanosphaera* il était plus bas, soit entre 94 et 95 %. Pour l'arbre phylogénique (Figure 39), *Escherichia coli* était le groupe externe.

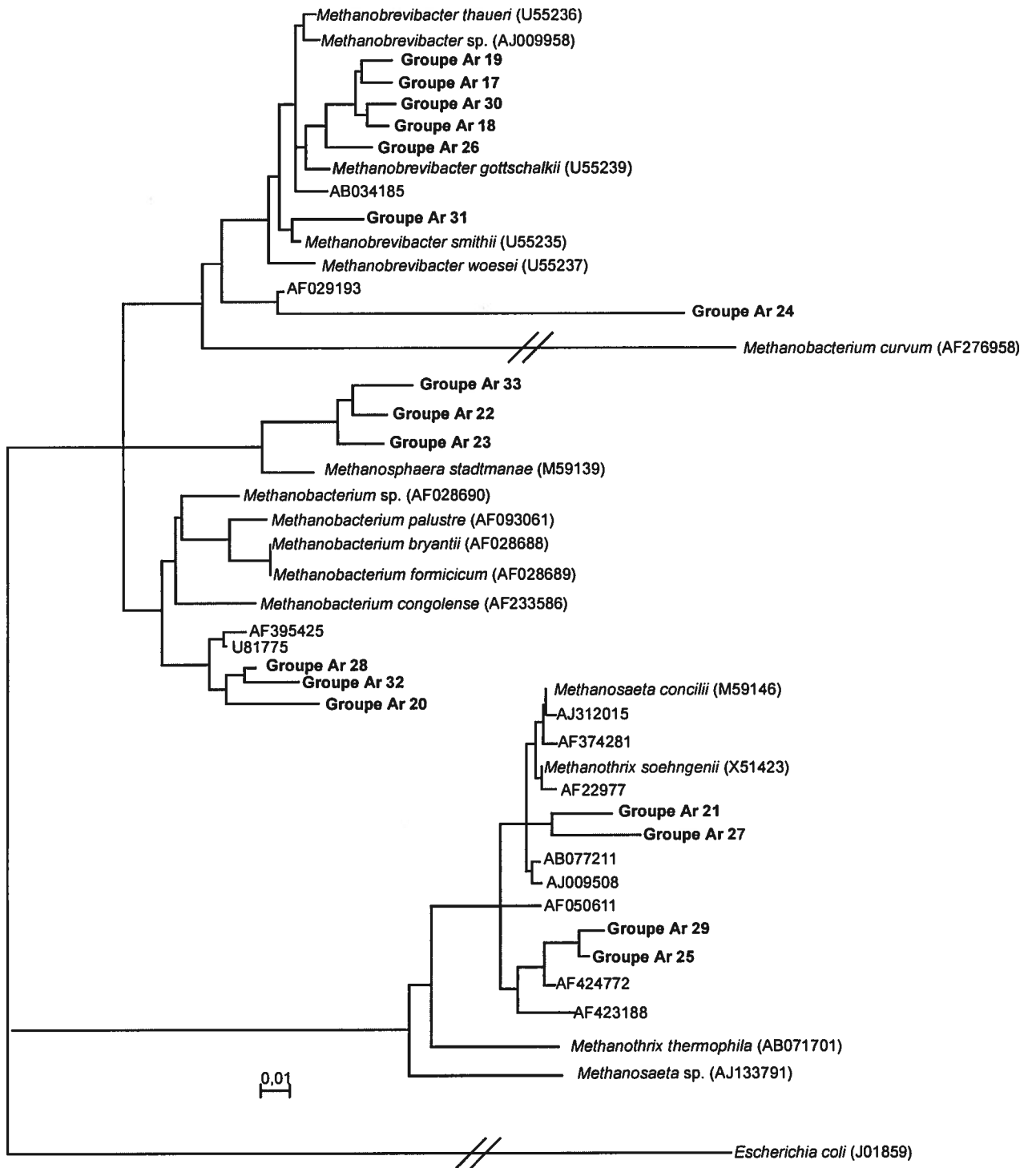


Figure 39 : Arbre phylogénique de la génothèque de clone *Archaea* formée avec la paire d'amorces Arch 69f et Arch 958r. Légende : La barre représente une substitution d'un nucléotide à chaque centaine (1 %).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1. Lyse cellulaire

La méthode de lyse utilisée pour cette étude, qui consistait en la friction des billes de verres et des cellules en présence d'EDTA, a donné de bons résultats. En effet, l'ADN n'est pas fragmenté et est en bonne quantité. Le EDTA joue son rôle de chélateur d'ions aux ADNases et permet une bonne conservation à toutes les étapes de manipulation des échantillons. Selon une étude de Curtis et Craine (1998), la méthode des billes de verres est la plus efficace, car elle a permis de mettre en évidence un plus grand nombre de populations dans leurs échantillons. Moré *et al.* (1994) ont même démontré que cette méthode est plus efficace que celle du gel-dégel pour des échantillons complexes. Cependant, dans une lyse cellulaire, il est presque impossible de briser toutes les parois des cellules, surtout lorsque l'échantillon est complexe tel que la liqueur mixte de réacteurs (Curtis et Craine, 1998; Zhang et Fang, 2000). Malheureusement, nous n'avons pas pu vérifier le pourcentage de cellules lysées en microscopie dû à des difficultés rencontrées.

4.2. Domaine des *Eubacteria*

La biomasse des réacteurs anaérobies étudiée dans cette recherche est constituée de populations appartenant majoritairement au domaine des *Eubacteria*. En fait, les méthodes utilisées ne permettent pas de quantifier la proportion relative des deux domaines bactériens présents. Par contre, il a fallu utiliser une technique de PCR interne pour amplifier les espèces du domaine *Archaea* démontrant ainsi leur faible abondance. Pour le domaine des *Eubacteria*, il y avait toujours d'excellentes amplifications et l'usage d'une deuxième amplification n'était pas nécessaire. Cependant, puisque les espèces appartenant au domaine *Eubacteria* n'effectuent pas l'étape finale de la dégradation, qui est la formation du méthane, les études antérieures n'ont pas mis l'accent sur l'analyse de ce domaine.

4.2.1. Choix des amorces

Le choix des amorces pour le domaine des *Eubacteria* est basé sur les travaux de Muyzer *et al.* (1993) qui utilisaient la paire d'amorce 341f, avec une pince GC, et 534r pour analyser différentes populations de souches pures et ainsi prouver l'efficacité du DGGE. Cette paire d'amorces est tout à fait désignée pour amplifier les régions conservées des séquences des ADNr 16S des différentes espèces appartenant à ce domaine (Watanabe, Kodama et Harayama, 2001). La combinaison de ces deux amorces, 341f qui est spécifique au domaine des *Eubacteria* et 534r qui est universelle, permet d'amplifier le plus d'espèces possibles dans les échantillons (Øvreas *et al.*, 1997). D'ailleurs, la diversité retrouvée dans les profils des *Eubacteria* (Figures 9, 10, 11 et 12) démontre bien que cette paire d'amorces réussit à amplifier beaucoup d'espèces. D'autres auteurs ont utilisé les mêmes amorces pour étudier des populations bactériennes semblables (Ferrari et Hollibaugh, 1999; Hollibaugh, Wong et Murrell, 2000; Ishii, Fukui et Takii, 2000; Luxmy, Nakajima et Yamamoto, 2000; Onuki *et al.*, 2000). L'utilisation de ces amorces par ces auteurs a permis de mettre en évidence des populations appartenant à des genres tels que *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Nitrobacter* et *Nitrosomonas*. Les amorces utilisées ne sont pas dégénérées. L'amplification d'un fragment unique d'ADN avec de telles amorces dégénérées formerait un produit de PCR mixte qui pourrait se séparer sur DGGE (Kowalchuk *et al.*, 1997). Notons finalement que la longueur du fragment, environ 200 pb, permet une bonne séparation sur le DGGE.

4.2.2. Criblage de la génothèque de clones

La génothèque de clones formée pour le domaine *Eubacteria* n'est pas complète. En effet, selon l'analyse de raréfaction (Figure 15), l'allure de la courbe ne démontre pas que toutes les espèces ont été isolées. L'analyse de raréfaction permet de supposer le nombre d'espèces dans l'échantillon selon le nombre d'individus déjà isolés. En d'autres mots, elle permet de déterminer quelle fraction des espèces présentes dans la communauté a été détectée. C'est l'allure de la courbe qui permet de déterminer si toutes les espèces ont été détectées. En effet, si la courbe est prononcée, cela indique une grande diversité.

Si la courbe forme un plateau, cela indique que presque tous les individus ont été isolés, donc que la génothèque de clones est complétée. Dans notre cas, 20 groupes de clones (excluant les chimères) ont été isolés alors que selon l'algorithme de ChaoI, il y aurait théoriquement 36 groupes présents. Il aurait fallu continuer d'isoler des clones pour avoir une bonne représentativité de la communauté microbienne.

Le criblage sur DGGE est une méthode rapide permettant de discriminer les clones. Cependant, ce n'est pas parce que deux fragments, provenant de deux clones distincts, se situent à la même hauteur qu'ils ont nécessairement exactement la même séquence. Par exemple, deux bandes migrant à la même hauteur et formant le groupe H ont été séquencées, soit celles provenant des clones # 73 et # 120. Malgré le fait qu'ils appartiennent tous les deux au super groupe des *Clostridium* (Figure 20), ils n'ont pas le même embranchement et la distance phylogénique entre les clones est très élevée indiquant qu'ils sont passablement différents. D'ailleurs, l'homologie entre les séquences est de seulement 70 %. Une étude de Lapara *et al.* (2000) a démontré le même phénomène où des bandes provenant de clones co-migraient vis-à-vis une même bande de l'échantillon, mais elles possédaient des séquences différentes. Il est donc possible, dans cette étude, que des clones aient été mis dans un même groupe suite au criblage sur le DGGE, mais qu'ils aient des séquences différentes et qu'ils soient affiliés à des genres bactériens différents. Ainsi, la biodiversité de la communauté est probablement plus élevée que celle que nous avons observée. Pour éviter ce problème, une autre méthode de criblage aurait pu être utilisée, tel le RFLP utilisé avec le domaine des *Archaea*, ou encore un gradient de dénaturant plus restreint aurait pu être employé. Ainsi, il aurait été possible de mettre en évidence de faibles différences dans les positions de bandes qui migraient de façon similaire.

4.2.3. Analyse des arbres phylogéniques

L'identification des *Eubacteria* présents dans un réacteur en conditions normales de traitement à une température de 20 °C révèle des populations très diversifiées. Les faibles pourcentages d'affiliation entre les séquences inconnues et les séquences

disponibles dans les banques de données peuvent s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas eu d'étude portant sur l'identification des micro-organismes, se basant sur l'ADNr 16S, présents dans un réacteur en anaérobie dégradant le lisier de porc lorsque la température de fonctionnement est à 20 °C. Les banques de données sont dépourvues de telles informations. Cependant, il est possible de lier les séquences à des groupes ou des genres, ce qui confirme que ces derniers proviennent de micro-organismes bel et bien présents dans le réacteur et non d'artefacts. D'ailleurs toutes les séquences ont été analysées pour connaître les éventuelles chimères.

Le plus grand nombre des clones criblés a été affilié aux *Bacteroides* (Figure 16), un genre Gram-négatif. Les bactéries appartenant à ce genre sont des organismes anaérobies stricts, ayant un métabolisme fermentaire. Elles utilisent entre autres le peptone pour produire des acides gras volatils tel le butyrate (Holt et Krieg, 1984). Dans l'étude de Leser *et al.* (2002) qui analysait les populations dans des intestins de porcs, c'est le genre *Bacteroides* qui dominait. Il est possible de retrouver ce genre dans d'autres environnements tels que des intestins d'humains (Suau *et al.*, 1999) et dans un réacteur anaérobie ayant comme substrat les déchets de distillation du vin (Godon *et al.*, 1997). Les espèces, tels que *Bacteroides uniformis*, *B. eggerthii*, *B. fragilis* et *B. caccae*, sont voisines des groupes de clones A, B et F (Figure 16) obtenus dans cette étude, tout comme dans les études de Suan *et al.* (1999) portant sur les intestins d'humains, de Leser *et al.* (2002) portant sur les intestins de porcs et de Whitehead et Cotta (2001) portant sur le lisier.

Deux groupes de la génothèque de clones ont été affiliés à des genres qui sont très rapprochés soit *Spirochete* et *Treponema* (Figure 17). Ces mêmes genres ont été isolés dans des intestins de termites (Leadbetter *et al.*, 1999) et dans le lisier de porc (Whitehead et Cotta, 2001). Ces études ont mis en évidence que le métabolisme de ces genres permettait, entre autres, de former de l'acétate à partir du H₂ et du CO₂. Les affiliations des clones dans les études de Leadbetter *et al.* (1999) et Whitehead et Cotta (2001) ressemblent à celles retrouvées dans cette étude, soit avec de longues distances phylogéniques et des embranchements avec des séquences non identifiées.

Pour ce qui est de l'arbre phylogénique du groupe des *Caloramator* (Figure 19), les clones des groupes O, N et T ont été affiliés, entre autres, avec différentes espèces de *Caloramator* et avec *Thermonbrachium celer*, quoique les analyses statistiques par «bootstrap» ne permettent pas de conclure que ces trois groupes ont une relation avec ces genres. Une étude effectuée par Hengstmann *et al.* (1999) a démontré le même constat alors qu'ils identifiaient des micro-organismes présents dans les rizières. Une étude de Engle *et al.* (1999) sur *Thermonbrachium celer*, démontre que ce micro-organisme produit de l'acétate, du formate, du CO₂ et du H₂. De plus, une espèce de *Caloramator* citée dans ce même article nous apprend qu'elle produit de l'acétate, du butyrate, du valérate, du CO₂ et du H₂.

Plusieurs groupes de clones ont été affiliés avec des genres appartenant au super groupe des *Clostridium* (Figure 20). Nous remarquons qu'il y a quatre sous-groupes, soit celui des genres *Syntrophomonas*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* et un groupe formé avec des séquences non identifiées. Le clone # 73 du groupe H a été affilié au genre *Syntrophomonas*. Ce genre a déjà été isolé dans un réacteur à température mésophile (Hansen, Ahring et Raskin, 1999) où le principal substrat était constitué d'acides gras. D'ailleurs *S. wolfei* a été la première espèce à être décrite comme étant capable d'oxyder le butyrate (Dong et Stams, 1995). Les produits formés par l'oxydation du butyrate sont le H₂ et le formate. Le genre *Syntrophomonas* a également été isolé dans un réacteur anaérobie ayant comme substrat de l'eau usée provenant de la distillation du vin (Godon *et al.*, 1997). Quant au groupe S, il s'apparente plus proprement dit à *Clostridium*, un genre Gram-positif, reconnu pour croître dans des conditions anaérobies. Les bactéries appartenant à ce genre produisent des acides organiques et des alcools à partir des carbohydrates (Holt et Sneath, 1984). Ce genre est retrouvé en grand nombre dans les clones isolés d'intestin de porc (Leser *et al.*, 2002). Les groupes Z et J ont un embranchement commun avec le genre *Desulfotomaculum*, cependant c'est le même embranchement qu'avec le genre *Syntrophomonas*, ce qui laisse des doutes sur la véritablement affiliation de ces clones. Finalement, les groupes L, U et le clone # 120 du groupe H ont été affiliés avec des séquences non identifiées rendant ainsi leur identification difficile.

Quant aux groupes C, V et Q, les séquences les plus approchées appartiennent au genre *Acholeplasma*, quoique l'embranchement des trois groupes se situe à l'extérieur de ceux-ci (Figure 18). Le genre *Acholeplasma* est un Gram-négatif ayant un métabolisme fermentaire (Holt et Krieg, 1984). Ce sont les carbohydrates qui leur servent de substrat. Habituellement, les bactéries appartenant à ce genre sont des parasites d'hôtes vertébrés, mais peuvent être retrouvées dans la flore des plantes et des insectes. Le groupe K a des affiliations avec le genre *Alkaliphilus* (Figure 23). Ce genre se classe parmi les bactéries alcalophiles, c'est-à-dire des bactéries qui croissent dans un environnement salin et à un pH entre 7,0 et 12,0. Les bactéries alcalophiles comprennent divers groupes autant dans le domaine *Eubacteria* (*Bacillus* spp.) qu'*Archaea* (*Natrobacterium* spp.) (Krulwich et Guffantii, 1989). Tous ces groupes ont des métabolismes différents et comprennent soit des bactéries aérobies, anaérobies facultatives et anaérobies strictes. Aucune étude antérieure n'a démontré la présence des genres *Acholeplasma* et *Alkaliphilus* dans des environnements semblables à celui étudié ici.

Pour ce qui est des groupes qui n'ont pu être affiliés avec des genres précis, il y a les groupes P (Figure 21) et R (Figure 22). À la suite de la recherche dans les banques de données, la séquence analysée du groupe P a des affiliations éloignées avec le genre *Lactobacillus*. C'est le même constat avec la séquence du groupe R, mais l'affiliation se fait avec le genre *Streptococcus*. Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus*, un Gram-positif, ont un métabolisme fermentaire. Elles produisent entre autres de l'acétate, du formate et du CO₂ (Holt et Sneath, 1984). Cependant, elles ne produisent pas d'acides gras volatils à plus de deux atomes de carbones. Quant aux bactéries appartenant au genre *Streptococcus*, un Gram-positif, elles ont également un métabolisme fermentaire dont le produit final est principalement de l'acide lactique (Holt et Sneath, 1984). Selon Leser *et al.* (2002) et Whitehead et Cotta (2001), ces deux genres sont présents dans le lisier brut.

4.2.4. Analyse des profils

L'interprétation d'un DGGE doit se faire en tenant compte des bandes qui apparaissent, disparaissent ou diminuent en intensité d'un échantillon à l'autre sur un même gel. Puisque la même quantité d'ADN a été utilisée pour chaque échantillon, une diminution en intensité d'une bande peut être interprétée comme une diminution de l'abondance relative des bactéries appartenant à une population donnée. Cependant, le DGGE n'est pas une méthode reconnue pour quantifier le nombre exact de populations présentes dans les échantillons.

L'analyse des profils des réacteurs en période de démarrage (Figures 9, 10 et 11) démontre une variété des populations. Celles qui sont présentes dans le lisier et dont le rôle n'est probablement pas important disparaissent plus ou moins rapidement. Ce sont probablement des bactéries qui ne sont pas favorisées sous les conditions de démarrage. Quant à l'apparition de populations dans les échantillons de liqueur mixte, soit celles représentées par la lettre B dans les Figures 9, 10 et 11, il s'agit probablement de bactéries anaérobies strictes présentes au départ dans le lisier et dont la croissance est accélérée dans le réacteur. Leur nombre devient donc plus important et la méthode du PCR-DGGE permet de les détecter. Par contre, certaines de ces populations ont diminué avec le nombre de jours de démarrage ce qui pourrait être attribué à la diminution de la concentration de certains substrats. Compte tenu de la hauteur de dénaturation des fragments, ces populations possèdent probablement un faible pourcentage en G + C. Selon les études de Leser *et al.* (2002) et de Whitehead et Cotta (2001), ce sont ces types de bactéries qui sont le plus souvent isolées dans les intestins et dans le lisier de porcs. Dans notre cas, ces populations, n'ont pas été identifiées formellement puisqu'elles n'étaient plus présentes dans l'échantillon qui a servi à former la génothèque de clones (Figure 14). Ces populations ne seraient probablement pas importantes au niveau du traitement comme tel. L'augmentation de l'intensité relative des bandes signifierait probablement que les populations qui y sont reliées ont un rôle plus important, donc leur nombre augmente. Quant à la bande identifiée par la lettre A dans les Figures 9, 10 et 11, elle diminue en intensité tout au long de la période de démarrage, alors qu'elle est intense

tout au long du cycle de traitement (C, Figure 12). Selon la hauteur de migration de cette bande, nous pouvons la relier aux groupes A et B, groupes représentant le genre *Bacteroides* (Figures 14 et 16). Puisque la période de démarrage est très longue, il serait normal qu'une population fermentaire diminue en nombre, alors que la période d'un cycle de traitement (50 jours) n'est pas assez long pour affecter cette population. Après un certain temps de démarrage, les populations présentes semblent se maintenir à une concentration stable.

Lorsque les réacteurs sont en conditions normales de traitement, l'abondance relative des différentes populations se maintient tout au long du cycle (Figure 12). Elles ne disparaissent pas même si elles ne participent pas nécessairement à la dégradation de la matière organique. En effet, lors d'un cycle de traitements, la dégradation des polymères complexes se fait au tout début, suivi de la dégradation des acides gras volatils et ensuite la production du biogaz. Lors de cette dernière étape, nous pouvons supposer que les *Eubacteria* sont moins actifs, donc présents en moins grand nombre. Or, les *Eubacteria* sont présents tout au long du cycle et la concentration des différentes populations est stable. L'explication provient peut-être du fait qu'étant donné que les méthodes utilisées visent l'ADN, une population peut être détectée même si elle n'est pas nécessairement active.

Lorsque nous comparons les profils des *Eubacteria* retrouvés dans les réacteurs en période de démarrage (Figures 9, 10 et 11) et en conditions normales de traitement (Figure 12), nous remarquons que les lisiers bruts ne présentent pas exactement les mêmes populations, surtout dans le haut du gel. Pour cette étude, deux lots de lisier différents ont été utilisés. Un des lots, celui présenté à la Figure 12, a été conservé quelques temps avant d'être utilisé. Ce qui pourrait expliquer la présence de certaines populations dans ce lisier par rapport au lisier présenté aux Figures 9, 10 et 11. Certaines populations dans les liqueurs mixtes sont également différentes. En plus de celles dénaturant dans le haut du gel (représentées par la lettre B), il y a des différences tout au long du gradient de dénaturant. Plusieurs bandes principales sont cependant présentes en intensité relative différente. Il est important de noter que les températures de

fonctionnement des réacteurs n'étaient pas les mêmes. Pour les réacteurs en période de démarrage, les températures étaient à 27 et 28 °C, alors que pour les réacteurs en conditions normales de traitement, la température de fonctionnement était à 20 °C. L'écart de température peut expliquer en partie les différences dans les profils. Ces températures d'opération ont été choisies par Agriculture et Agro-alimentaire Canada dans le but de répondre à d'autres objectifs de leur programme de recherche.

4.2.5. Analyse des acides gras volatils

Le suivi des acides gras volatils (Figures 3 et 4) démontre dans un premier temps l'hydrolyse de la matière organique par les organismes fermentaires ce qui explique l'augmentation de leur concentration. Dans un deuxième temps, il y a utilisation des acides gras volatils donc une baisse de leur concentration.

En analysant les courbes, nous remarquons que l'augmentation de la concentration des acides gras volatils entre les jours 13 et 19 (Figure 3A) concorde avec l'apparition de populations tel que révélé au jour 19 dans la Figure 9 (représentées par la lettre B). Or, ces populations n'ont pas été identifiées au cours de cette étude. C'est la même constatation pour les Figures 10 et 11 où des populations font leur apparition avant les jours 13 et 20. À ces jours, nous remarquons une augmentation des acides gras volatils dans les Figures 3B et 3C. Cependant, à partir du moment où la concentration des acides gras volatils a baissé, soit après plus de 90 jours (Figure 3), l'intensité des bandes a diminué (Figures 9, 10 et 11).

La variation de la concentration des acides gras volatils dans les réacteurs en conditions normales de traitement (Figure 4) n'est pas reflétée par la stabilité des populations présentes (Figure 12). Ceci s'explique probablement par la petite durée de l'incubation, soit 50 jours comparativement à 164, 111 et 167 jours pour les périodes de démarrage, ainsi que par la température d'incubation plus basse.

4.3. Domaine des *Archaea*

Le problème majeur avec le domaine des *Archaea* est la difficulté d'obtenir un produit de PCR à partir de l'ADN total extrait. Un PCR interne a été nécessaire. Selon Berthelet, Whyte et Greer (1996), l'utilisation d'un PCR interne sert à améliorer la spécificité et la sensibilité de l'amplification.

4.3.1. Choix des amorces

Pour ce qui est des choix des amorces pour ce domaine, il n'y a pas de consensus en ce qui concerne des amorces qui amplifieraient tous les *Archaea* présents dans un même échantillon. Il faut donc choisir en fonction des espèces susceptibles de se retrouver dans l'échantillon. Dans notre cas, nous savions que les *Archaea* présents appartenaient au groupe des méthanogènes, ces derniers faisant partie des *Euryarchaeota*, un des deux phylum du domaine *Archaea*. Les méthanogènes se divisent en trois catégories (Garcia, Patel et Olivier, 2000) : le premier groupe oxyde le formate, le H₂ et réduit le CO₂ pour former le CH₄, le deuxième groupe utilise des composés méthylés et le troisième groupe utilise l'acétate.

Dans cette étude, différentes paires d'amorces ont été testées (Cabriol *et al.*, 1998; Casamayor *et al.*, 2000; Chan, Liu et Fang, 2001; Marchesi *et al.*, 2001; Pinar *et al.*, 2001; Vetriani *et al.*, 1999). De ces essais, deux paires distinctes ont été retenues soit les paires Arch D-Arch G et Arch 69f-Arch 958r. Lorsque ces amorces étaient utilisées, il n'y avait pas de produit non spécifique détecté et la longueur du fragment correspondait à l'ADNr 16S au complet ou du moins en bonne partie. Ces amorces étaient dégénérées dans le but d'aller chercher tous les *Archaea* présents dans l'échantillon. Le choix de la paire d'amorce pour la deuxième amplification avait comme contrainte que le produit de PCR formé devait avoir une longueur de 200 pb de manière à être facilement séparable sur DGGE. Le choix s'est arrêté sur les amorces 344f, spécifique au domaine *Archaea*, et 534r, qui est universelle (Casamayor *et al.*, 2000; Pinar *et al.*, 2001; Vetriani *et al.*, 1999). Ces amorces n'étaient pas dégénérées.

4.3.2. Première stratégie d'amplification

La première stratégie d'amplification utilisait la paire d'amorces Arch D et Arch G qui amplifiait l'ADNr 16S au complet, suivi d'une deuxième amplification avec les amorces Arch 344f et 534r (PCR interne).

4.3.2.1. Criblage de la génothèque de clones

Selon l'analyse de raréfaction (Figure 30), cette génothèque de clones n'est pas complète, car d'après l'allure de la courbe aucun plateau n'a été atteint. Cependant, le critère de sélection fait en sorte que tous les organismes potentiellement présents, y compris les espèces et même les sous-espèces, sont pris en considération. Ainsi, selon l'algorithme de ChaoI, 34 groupes auraient dû être trouvés. Nous avons pu isoler 16 groupes qui ont été affiliés à quatre genres de méthanogènes qui sont peut-être les genres dominants lors de la période de démarrage. Cependant, l'isolement d'autres clones serait nécessaire pour identifier toutes les souches et les espèces présentes.

Le criblage des clones s'est fait dans un premier temps en utilisant la méthode du RFLP où 14 groupes (excluant les chimères) ont été formés. Le criblage a également été fait en utilisant la méthode du DGGE (Figure 29). La présence de moins de groupes en DGGE pourrait s'expliquer par le fait qu'une partie seulement de l'ADNr 16S (environ 200 pb) est inspectée comparativement au criblage par RFLP où tout l'ADNr 16S est pris en considération (1 500 pb). La présence des doublets avec le criblage en DGGE pourrait s'expliquer par la présence de conformations secondaires des séquences ou la présence de plusieurs ADNr 16S (Curtis et Craine, 1998; Hollibaugh, Wong et Murrell, 2000). Or, puisque l'amplification provenait d'insert unique, il est impossible qu'il y ait présence de plusieurs ADNr 16S. De plus, la présence de contaminant probable a été vérifiée par un témoin pour chaque réaction de PCR. En comparant les groupes formés en RFLP et ceux formés en DGGE, nous remarquons que certains groupes RFLP se retrouvent dans plus d'un groupe DGGE. Ceci signifie que certains clones ont été placés dans un même groupe suite au criblage en RFLP, alors qu'ils ont migré à des hauteurs différentes sur le

DGGE indiquant qu'ils ont des séquences différentes. Nous nous sommes rendus compte de cet état de fait tardivement et le temps nous a manqué pour faire les analyses supplémentaires requises pour tenir compte du criblage par DGGE. Pour cette raison, seul le criblage en RFLP a été considéré pour distinguer les clones éliminant ainsi la possibilité de relier les clones à des bandes dans l'échantillon, donc les bandes à des genres de méthanogènes.

4.3.2.2. Analyse de l'arbre phylogénique

Lors de l'analyse des séquences provenant du clonage de l'échantillon, quatre genres sont ressortis des affiliations soit *Methanoculleus*, *Methanocorpusculum*, *Methanogenium* et *Methanosarcina* (Figure 31). Les genres *Methanoculleus*, *Methanocorpusculum* et *Methanogenium* appartiennent tous les trois à l'ordre des *Methanomicrobiales*. Ce sont des méthanogènes hydrogénotrophes, donc qui produisent le méthane à partir de la combinaison H₂-CO₂ et également à partir du formate (Garcia, Patel et Olivier, 2000; Rouvière *et al.*, 1992). Ils sont Gram-négatifs et ils ont des formes de coques irréguliers (Maestrojuán *et al.*, 1990; Zellner *et al.*, 1999).

Les séquences reliées au genre *Methanoculleus* se divisent en deux groupes (Figure 31). Tout d'abord, il y a les groupes Ar 4, Ar 7, Ar 10, Ar 14 et Ar 15 qui ont des affiliations avec les espèces *M. olentangyi*, *M. bourgensis* et *M. oldenbourgensis*. Ensuite, il y a les groupes Ar 1, Ar 5, Ar 8, Ar 11, Ar 13 et Ar 16 qui ont des affiliations plus près des genres *M. chekugoensis*, *M. submarinus* et *M. marisnigris*. Cependant, toutes ces espèces utilisent la combinaison du H₂ et du CO₂ et le formate pour produire le méthane, mais pas l'acétate (Zellner *et al.*, 1999). Les températures de croissance optimales de *M. olentangyi*, *M. bourgensis*, *M. chekugoensis* et de *M. marisnigris* se situent entre 20 et 37 °C, mais les bactéries appartenant à ces espèces peuvent croître à des températures allant de 10 à 55 °C (Zellner *et al.*, 1999). Ces températures de croissance sont compatibles avec celle du réacteur en période de démarrage où l'échantillon a été prélevé soit 27 °C. Quant à leur pourcentage en G + C, il se situe entre 51 et 62 %. Donc, un pourcentage relativement élevé ce qui expliquerait que la dénaturation des fragments

se fait à des concentrations de dénaturant élevées. Jusqu'à présent, *Methanoculleus chekugoensis* et *M. marisnigris* ont été isolés d'un échantillon de rizière (Dianou *et al.*, 2001; Joulain *et al.*, 1998). *M. marisnigris* a également été isolé d'un effluent d'un réacteur anaérobie de lisier de porc (Maestrojuàn *et al.*, 1990) et d'une fosse à lisier (Whitehead et Cotta, 1999). Finalement, *M. bourgensis* a été isolé de boues d'épuration (Maestrojuàn *et al.*, 1990).

Le groupe Ar 9 a des affiliations avec le genre *Methanocorpusculum*. Ce genre oxyde le formate, ainsi que le H₂ en combinaison avec le CO₂ (Zeller *et al.*, 1989) pour produire le méthane. Le pourcentage en G + C de *Methanocorpusculum* se situe entre 48 et 54 %. Les trois espèces de *Methanocorpusculum* affiliées à la séquence du clone sont *M. parvum*, *M. bavaricum* et *M. sinense*. Les deux premiers ont une température de croissance optimale à 37 °C, tandis que le dernier croît à une température de 30 °C, donc près de celle du réacteur, 27 °C, où l'échantillon a été prélevé pour former la génothèque de clone. L'isolement de *M. parvum* a été fait dans une fosse à lisier de porc (Whitehead et Cotta, 1999), *M. bavaricum* dans un sédiment d'eau boueuse et finalement *M. sinense* de l'eau usée provenant d'une distillerie (Zeller *et al.*, 1989).

Le groupe Ar 3 a été affilié avec le genre *Methanogenium* qui est caractérisé par le fait que nombre des espèces classées a priori dans ce genre ont été reclassées dans le genre *Methanoculleus*. Par exemple, *Methanoculleus marisnigris*, *M. thermophilicum*, *M. bourgensis* et *M. olentangyi* étaient tous classés dans le genre *Methanogenium* (Maestrojuàn *et al.*, 1990). Il existe cinq espèces de *Methanogenium* et leur contenu en G + C varie entre 47 et 52 % (Garcia, Patel et Olivier, 2000). Les espèces observées peuvent être psychrophile, mésophile ou thermophile (Garrity, Boone et Castenholz, 2001). Un de leur habitat sont les sédiments marins où leur fonction est probablement reliée à l'enlèvement de l'hydrogène gazeux. C'est à l'espèce *M. organophilum* que la séquence du groupe Ar 3 est affiliée. La source de carbone de cette espèce est l'acétate, tandis qu'elle utilise le formate ou le H₂ combiné au CO₂ pour former le méthane.

Enfin, le groupe Ar 2 a été affilié au genre *Methanosarcina* qui représente les méthanogènes acétotrophes prédominants dans plusieurs écosystèmes anaérobies où la matière organique est complètement dégradée en CO₂ et en CH₄ (Garcia, Patel et Olivier, 2000). Ce genre est retrouvé dans l'eau fraîche, la boue, des sols anoxiques, des lagunes et des réacteurs anaérobies. Il a également été isolé dans le rumen de la vache (Whitford, Teather et Forster, 2001). Il peut utiliser l'acétate, la combinaison H₂ et CO₂ ainsi que des composés méthylés pour produire le méthane (Garcia, Patel et Olivier, 2000). Les *Methanosarcina* sont reconnus pour croître lorsque la concentration en acétate est élevée, soit environ 2 000 mg/L (Zheng et Raskin, 2000). Or l'échantillon utilisé pour la construction de la génothèque de clones a été prélevé lorsque la concentration en acétate était basse, soit 277 mg/L, ce qui peut expliquer la faible abondance de ce genre. De plus, ce clone est relativement éloigné des espèces de *Methanosarcina* isolées jusqu'à présent rendant l'affiliation plus difficile, le pourcentage d'identité avec les séquences connues étant de seulement 95 %. Cependant, la croissance de *Methanosarcina* à une température de 27 °C est possible, puisqu'un *M. siciliae* C2J est considérée comme mésophile et peut croître à des températures se situant entre 20 et 40 °C (Elberson et Sowers, 1997).

4.3.2.3. Analyse des profils

Au niveau des profils des réacteurs aux échelles de 42 L et de 12 m³ en période de démarrage, deux populations communes apparaissent tardivement (Figures 24 et 25). Il est logique de penser que le nombre de méthanogènes va augmenter tardivement dans la biomasse de ces réacteurs, puisqu'ils effectuent la dernière étape de dégradation soit la production du méthane qui se fait suite à la fermentation de la matière organique et à la dégradation des acides gras volatils. Donc, après un certain temps dans la période de démarrage, ces méthanogènes sont dans des conditions de croissance favorables, leur nombre devient plus important et ils deviennent détectables avec la méthode du PCR-DGGE. L'augmentation en intensité d'une des populations dans le réacteur à l'échelle laboratoire (Figure 24) est peut-être due au fait que son rôle est plus important que l'autre population, donc en nombre plus élevé. Ces bactéries étaient nécessairement dans la biomasse ayant servi au démarrage du réacteur, car il n'y a eu aucun ajout d'une autre

biomasse pendant cette période. Au départ, leur nombre était insuffisant ce qui empêchait leur détection par la méthode. Par contre, dans le réacteur à l'échelle commerciale, une des deux bandes communes était détectable après seulement 20 jours d'incubation de la période de démarrage (Figure 26).

Dans un réacteur en conditions normales de traitement, ces deux populations communes sont toujours présentes (Figure 27). Nous nous attendions à une variation des populations puisqu'il y a une variation des activités de dégradation pendant le cycle. En effet, au début du cycle les activités d'hydrolyse, de fermentation et d'acétogénèse sont favorisées. La méthanogénèse démarre dès qu'il y a présence d'acétate, de CO₂ et d'hydrogène, mais la production de méthane est habituellement plus forte dans la deuxième moitié du cycle. C'est à ce moment que nous pensions que les méthanogènes seraient détectables par la méthode du PCR-DGGE. Or, ils sont présents dès le début. Ceci s'explique probablement par le fort volume de boues (21 L) déjà présent dans le réacteur et provenant du cycle précédent.

Malgré le fait que les températures de fonctionnement des réacteurs en période de démarrage et ceux en conditions normales de traitement n'étaient pas les mêmes, nous retrouvons deux bandes communes pour tous les réacteurs (Figures 24, 25, 26 et 27). Par contre, certaines différences ont été observées au niveau des profils entre les réacteurs en période de démarrage où les températures étaient les mêmes. Ces différences au niveau des populations s'expliqueraient peut-être par la différence dans le volume des boues qui affecte la représentativité des échantillons.

4.3.2.4. Analyse des acides gras volatils

L'apparition de populations pourrait concorder avec la consommation des acides gras volatils totaux. En effet, pour le réacteur à l'échelle commerciale il y a eu apparition d'une population entre le jour 20 et 91 (représentée par la lettre B, Figure 26), alors qu'il y a une baisse des acides gras volatils à partir du jour 60 (Figure 3C). Cette population pourrait être le genre *Methanosarcina* puisqu'il utilise l'acétate pour former le méthane.

Malheureusement, cette population n'a pas pu être identifiée formellement puisque les clones isolés n'ont pas pu être reliés à des bandes précises de l'échantillon de départ, donc à des genres de méthanogènes. Ce raisonnement ne peut pas être appliqué aux réacteurs à l'échelle laboratoire (Figure 24) et semi-commerciale (Figure 25). L'apparition des populations se fait plus tardivement que la baisse des acides gras volatils totaux.

La variation de la concentration des acides gras volatils dans les réacteurs en conditions normales de traitement (Figure 4) n'est pas reflétée par la stabilité des populations (Figure 27). Ceci s'explique probablement par le fait qu'il y a toujours un certain niveau d'acétate dans les réacteurs et que les méthanogènes sont toujours actifs.

4.3.3. Deuxième stratégie d'amplification

La deuxième stratégie d'amplification utilisait la paire d'amorces Arch 69f et Arch 958r qui amplifiait une partie de l'ADNr 16S, suivi d'une deuxième amplification avec les amorces Arch 344f et 534r (PCR interne).

4.3.3.1. Criblage de la génothèque de clones

Cette génothèque de clones n'est pas complète. En effet, selon l'analyse de raréfaction (Figure 38) aucun plateau n'a été atteint. Donc, ce n'est pas tous les individus qui ont été isolés, mais encore une fois le critère de sélection fait en sorte que tous les organismes, jusqu'à la sous-espèce, sont pris en considération. Donc, selon l'algorithme de ChaoI, 23 groupes auraient dû être isolés. Nous avons probablement identifié les genres dominants, mais il faudrait cependant continuer l'isolement pour identifier toutes les souches et les espèces présentes.

Le criblage des clones a été fait en utilisant deux méthodes, le RFLP et le DGGE. Le criblage en RFLP a permis de former 17 groupes, alors que sept groupes ont été obtenus à l'aide du DGGE (Figure 37). Cependant, en DGGE, seulement une partie de l'ADNr 16S est analysée. Des groupes formés en DGGE, certains n'avaient pas de

corrélation avec une bande dans l'échantillon de départ. De plus, certains clones n'ont pas pu être regroupés puisqu'ils présentaient deux bandes. En analysant les résultats, nous en sommes venus à la même conclusion que précédemment, c'est-à-dire que seul le criblage en RFLP devait être considéré pour distinguer les clones.

4.3.3.2. Analyse de l'arbre phylogénique

Suite à l'analyse des séquences, les groupes Ar 17, Ar 18, Ar 19, Ar 26, Ar 30 et Ar 31 ont été affiliés au genre *Methanobrevibacter* (Figure 39). Ce genre utilise principalement le formate pour produire le méthane. *Methanobrevibacter* est isolé en abondance dans les excréments de chevaux, porcs, vaches, rats, oies, moutons, dans les intestins et dans le rumen de la vache (Lin, et Miller, 1998; Whitford, Teather et Forster, 2001). De plus une des espèces connues, *M. smithii*, a été isolée dans des boues d'une usine d'épuration et dans des intestins d'animaux (Garcia, Patel et Olivier, 2000). Dans deux études distinctes, la similarité entre la séquence de l'ADNr 16S provenant d'un clone isolé d'excréments de porc (Lin et Miller, 1998) et d'une fosse à lisier (Whitehead et Cotta, 1999), était de 97-98 % et de 95 % respectivement avec *M. smithii*. Le groupe Ar 24 pourrait faire partie du genre *Methanobrevibacter*, mais l'affiliation avec ce genre est éloignée. En fait, il se rapproche plus d'un micro-organisme jusqu'à présent non identifié.

Les séquences provenant des groupes Ar 22, Ar 23 et Ar 33 sont apparentées au genre *Methanosphaera* (Figure 39). Ce genre est un Gram-positif avec un bas pourcentage en G + C, soit entre 23 et 26 % (Garrity, Boone et Castenholz, 2001; Miller et Wollin, 1985). Les bactéries appartenant à ce genre utilisent le méthanol, produit par d'autres bactéries à partir de la pectine, et le H₂ pour la méthanogenèse (Garcia, Patel et Olivier, 2000). Elles sont incapables d'utiliser le H₂ en combinaison avec le CO₂ pour former le méthane et encore moins le formate. L'inhabilité à réduire le CO₂ est due au manque d'activité ou à l'inactivité d'un système de réductase du CO₂ et de la coenzyme M méthyltransférase (Garcia, Patel et Olivier, 2000). L'espèce type de ce genre, soit *M. stadtmanae*, est un résident du large intestin chez l'humain (Miller et

Wolin, 1985) et des clones affiliés à cette espèce ont été isolés du rumen de la vache (Whitford, Teather et Forster, 2001).

Les séquences des groupes Ar 20, Ar 28 et Ar 32 s'apparentent au genre *Methanobacterium* (Figure 39), plus précisément aux espèces *M. congolense*, *M. bryantii*, *M. formicium* et *M. palustre*. Une étude de Cuzin *et al.* (2001), dont le but était d'isoler des méthanogènes dans un digesteur traitant la pelure du manioc brute, a permis de caractériser *M. congolense*. Il utilise la combinaison H₂-CO₂ pour la production du méthane, c'est un Gram-positif, sa température de croissance se situe entre 37 et 42 °C et son pourcentage en G + C est de 39,5 %. Quant à l'étude de Joulian *et al.* (1998) portant sur les micro-organismes dans des rizières, des clones ont été affiliés à *M. bryantii* et *M. formicium*. Ces deux espèces utilisent le H₂ et le CO₂, mais pas l'acétate pour la formation du méthane. Par contre, seul *M. formicium* utilise le formate. Leur température optimale de croissance se situe entre 37 et 45 °C, mais peut se faire à partir de 30 °C (Garrity, Boone et Castenholz, 2001). Les *Methanobacterium* isolées dans cette étude représentent peut-être une nouvelle espèce de ce genre puisqu'ils constituent un groupe distinct dans l'arbre phylogénique. Les genres *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* et *Methanobacterium* sont tous regroupés sous le même ordre de méthanogènes soit *Methanobacteriales*.

Les séquences des groupes Ar 21, Ar 25, Ar 27 et Ar 29 semblent avoir une affiliation avec le genre *Methanosaeta* (Figure 39). Par contre, les distances sont telles que les séquences semblent être nouvelles ou du moins affiliées avec des séquences non identifiées. Le genre *Methanosaeta* est un méthanogène acétotrophe avec un pourcentage en G + C entre 50 et 61 %. L'optimum de croissance se situe entre 35 et 40 °C, mais la croissance peut se faire entre 10 et 45 °C (Garrity, Boone et Castenholz, 2001). Il utilise seulement l'acétate pour produire le méthane (Garcia, Patel et Olivier, 2000). De plus, il a une croissance lente, soit un temps de doublement entre quatre à sept jours. Donc, avant que la population soit assez nombreuse pour être détectée avec une méthode telle que le PCR-DGGE, ça peut être très long. Cependant, ce genre croît lorsque la

concentration en acétate est basse et c'était le cas dans le réacteur lorsque l'échantillon a été prélevé puisqu'elle était à 277 mg/L.

Dans cette génothèque de clones, nous remarquons que ce sont les méthanogènes hydrogénotrophes qui sont les plus dominants, représentant 70,4 %. Une étude de Joulain *et al.* (1998) portant sur les méthanogènes cultivables dans les rizières rapporte la même constatation. Cependant la méthode utilisée dans cette étude (méthode du nombre le plus probable) peut préférentiellement sélectionner des *Methanobacterium* par rapport à d'autres espèces, ce qui entraînerait une conclusion erronée. Cependant, une autre étude portant sur des sols de rizières rapporte que ce sont les genres *Methanosaeta* et *Methanobacterium* qui sont dominants (Hengstmann *et al.* 1999), et ce autant lorsqu'ils sont cultivés que lorsque seulement l'ADNr 16S est étudié.

4.3.3.3. Analyse des profils

Les profils sont caractérisés par le fait qu'il n'y a pas de changement majeur et cela pour les deux séries de réacteurs (Figures 32, 33, 34 et 35). En effet, à part deux populations apparaissant dans le réacteur à l'échelle laboratoire lors de la période de démarrage (Figure 32), qui pourrait être reliée au genre *Methanosaeta* dû à leur apparition tardive, les populations sont stables à en juger par l'intensité relative des bandes. Ce sont probablement ces populations qui produisent le méthane lorsque le lisier est entreposé dans les caniveaux.

Malgré le fait que les températures de fonctionnement des réacteurs en période de démarrage et ceux en conditions normales de traitement n'étaient pas les mêmes, cela ne semble pas affecter les populations présentes sauf pour les populations représentées par les lettres A et B dans la Figure 32.

4.3.3.4. Analyse des acides gras volatils

L'apparition de la population, représentée par la lettre A dans le réacteur à l'échelle laboratoire (Figure 32) pourrait concorder à la consommation de l'acétate, car

dans la Figure 3A il y a une baisse des acides gras volatils totaux. Cette population pourrait être le genre *Methanosaeta* puisqu'il utilise seulement l'acétate pour former le méthane. Malheureusement, cette population n'a pas pu être identifiée formellement puisque les clones isolés n'ont pas pu être reliés à des bandes précises de l'échantillon de départ, donc à des genres de méthanogènes. Ce raisonnement ne s'applique pas aux réacteurs à l'échelle semi-industrielle (Figure 33) et commerciale (Figure 34), car il n'y a pas d'apparition de populations. Nous pouvons supposer que les méthanogènes sont toujours actifs dans la biomasse.

Quant au suivi des acides gras volatils dans les réacteurs en conditions normales de traitement (Figure 4), leur variation n'est pas reflétée par le profil des populations (Figure 35). Les méthanogènes sont toujours présents et actifs dans la biomasse.

4.4. Perspectives de recherche

L'identification de la microflore présente dans des bioprocédés anaérobies opérés à basse température tel que les bioréacteurs à opération séquentielle étudiés ici est à son début. Ils ne sont pas encore complets, car ce ne sont pas toutes les populations présentes dans la biomasse qui ont été isolées et identifiées. Pour compléter l'acquisition des connaissances fondamentales, il serait important d'identifier tous les organismes présents dans la biomasse, de faire une correspondance entre les clones isolés et les bandes présentes dans les profils pour le domaine *Archaea*, de déterminer la proportion de chaque domaine bactérien, d'étudier le dynamisme et le niveau d'activité des populations. Pour réussir à corréler les clones avec des bandes de l'échantillon, il serait possible de découper la bande de l'échantillon dans le gel de polyacrylamide, de réamplifier le fragment et de procéder au séquençage. Le fragment ne risque pas d'être contaminé par une autre séquence puisque la diversité des populations de l'échantillon est relativement faible. De cette façon le genre bactérien de la population serait connu et une corrélation avec un clone possible. Pour déterminer la proportion de chaque domaine bactérien, des sondes phylogéniques pourraient être utilisées. Ces sondes permettent de quantifier une population puisqu'elles sont spécifiques à un genre ou une espèce. Quant à l'étude du

dynamisme et du niveau d'activité des populations, des analyses faites à partir de l'ARN permettraient de connaître les populations qui sont actives. En effet, seules les populations métaboliquement actives produisent des ARN ribosomaux en grande quantité contrairement aux populations qui ne sont pas actives où le niveau des ARN ribosomaux est plus bas.

La plus grosse contrainte dans l'utilisation des traitements anaérobies est la lenteur de la période de démarrage. Les connaissances acquises jusqu'à maintenant pourraient être utilisées comme outils de diagnostics pour ainsi diminuer la longueur des temps de démarrage. En utilisant les connaissances acquises chez les *Archaea*, surtout ceux apparaissant tardivement, le suivi de ces populations de façon plus précise permettra peut-être de réduire de façon substantielle la durée de la période des démarrages. Pour bien suivre les populations, des sondes phylogéniques pourront être formées pour détecter de façon plus rapide si telle population est présente et en nombre suffisant dans la biomasse. Par exemple, si après une centaine de jours de démarrage les populations ne sont pas apparues, probablement que la biomasse ne supporte pas la charge organique. Dans ce cas, une nouvelle stratégie pourra être utilisée pour continuer la période de démarrage des réacteurs. Ces outils de diagnostics seront utilisés conjointement avec les tests physico-chimiques déjà existants.

CONCLUSION

L'épandage du lisier de porc sur les terres agricoles engendre des problèmes environnementaux importants. Son pouvoir polluant est tel qu'un système de traitement est souhaitable. À Agriculture et Agro-alimentaire Canada, un traitement biologique du lisier de porc a été mis au point. Le processus de dégradation se fait en anaérobie selon des conditions d'opérations séquentielles standards à une température de 20 °C. La nouveauté de ce traitement est la température relativement basse à laquelle la dégradation de la matière organique se fait. La stabilité ainsi que la performance du traitement ont été documentées. Cependant, la microflore permettant la dégradation de la matière organique, n'a jamais été étudiée.

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient donc d'analyser l'évolution de la microflore présente dans les réacteurs lors du traitement du lisier et d'identifier les micro-organismes dominants présents dans la biomasse. L'évolution de la microflore a été étudiée par PCR-DGGE dans deux séries de réacteurs soit lorsqu'ils sont en période de démarrage et lorsqu'ils sont en conditions normales de traitement. Quant à l'identification des micro-organismes dominants, elle a été faite pour les deux domaines bactériens présents, soit les *Eubacteria* et les *Archaea*, par amplification, clonage et séquençage de fragments d'ADNr 16S.

Pour ce qui est du domaine des *Eubacteria*, la microflore était très diversifiée et en changement lorsque les réacteurs étaient en période de démarrage, surtout pendant les premiers jours de la période. Cependant, elle était stable c'est-à-dire sans changement apparent lorsque les réacteurs fonctionnaient en conditions normales de traitement. L'identification des micro-organismes dominants lors du traitement a démontré une grande diversité. Les genres dominants sont *Bacteroides*, *Spirochete/Treponema*, *Acholeplasma*, *Caloramator* et certains regroupés dans le super groupe des *Clostridium*. Malheureusement, ce n'est pas toutes les espèces potentiellement présentes dans la biomasse qui ont été clonées. La majeure partie des séquences obtenues montrait peu d'homologie (moins de 93 %) avec les séquences disponibles dans les banques de

données. Ceci indique qu'un bon nombre des bactéries détectées appartient à des espèces qui n'ont pas encore été décrites. Nous pouvons croire que les micro-organismes détectés dans cette étude ne sont pas encore répertoriés et que nous sommes les premiers à les avoir entrevus.

Pour ce qui est du domaine des *Archaea*, deux stratégies d'études ont dû être employées, chacune utilisant des amorces différentes pour amplifier l'ADNr 16S. Avec la première stratégie, la microflore prenait beaucoup de temps pour s'implanter dans les réacteurs en période de démarrage, à l'exception des réacteurs à l'échelle commerciale. De plus, la diversité de cette microflore était faible. Cependant, cette même microflore était bien implantée dans les réacteurs en conditions normales de traitement. L'identification de la microflore dans les réacteurs en période de démarrage démontre quatre groupes de méthanogènes soit *Methanoculleus*, *Methanocorpusculum*, *Methanogenium* et *Methanosarcina*. Avec la deuxième stratégie, la microflore semble plus diversifiée que la première, mais quand même moins que celle du domaine des *Eubacteria*. Les populations sont toutefois très stables autant dans les réacteurs en période de démarrage que dans les réacteurs en conditions normales de traitement. Encore là l'identification de la microflore dans les réacteurs en phase de démarrage démontre quatre groupes principaux soit *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanobacterium* et *Methanosaeta*. Tous ces groupes de méthanogènes sont connus et documentés.

Ces nouvelles connaissances à propos de la biomasse vont nous permettre d'approfondir l'étude des réacteurs traitant le lisier de porc dans des conditions anaérobies à 20 °C. Cependant, cette étude est incomplète, car ce ne sont pas toutes les populations présentes dans la biomasse qui ont été isolées. Pour compléter cette étude, il serait important d'identifier tous les organismes présents dans la biomasse, de faire une correspondance entre les clones isolés et les bandes présentes dans les profils pour le domaine *Archaea*, de déterminer la proportion de chaque domaine bactérien, d'étudier le dynamisme et le niveau d'activité des populations. Les connaissances acquises jusqu'à maintenant pourraient être utilisées comme outils de diagnostics au niveau de la

période de démarrage. L'établissement de sondes phylogéniques correspondantes aux populations présentes dans la biomasse permettraient de suivre de façon plus concise la dégradation de la matière organique lors de cette période et ainsi peut-être diminuer le temps de démarrage des réacteurs.

APPENDICE A

Profils sur DGGE des populations appartenant au domaine *Eubacteria* des réacteurs pendant la période de démarrage.

M L 13 19 27 33 41 69 83 90 97 103 111 118 132 139 146 153 160 164 jours

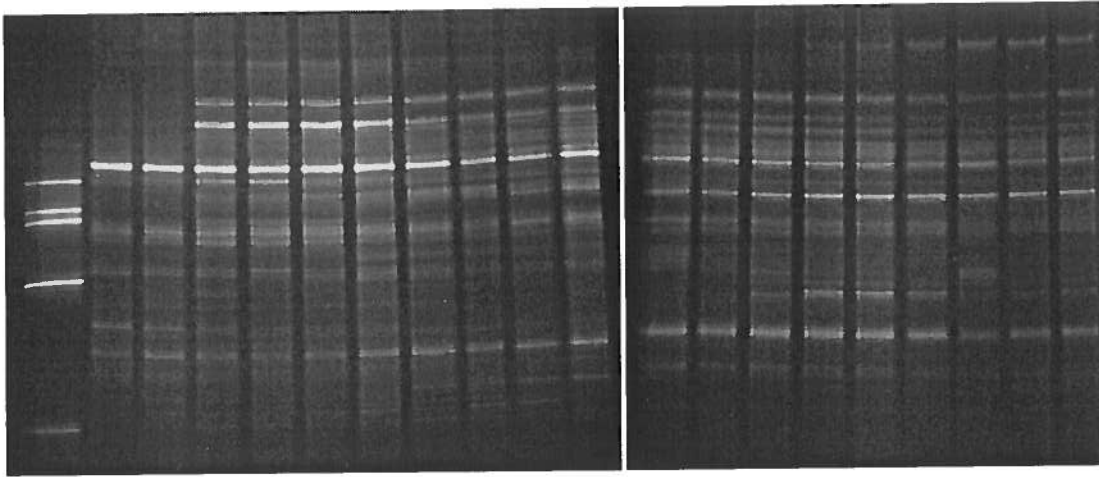


Figure A-1 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 22, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) lisier brut.

M L 13 19 27 33 41 69 83 90 97 103 111 jours

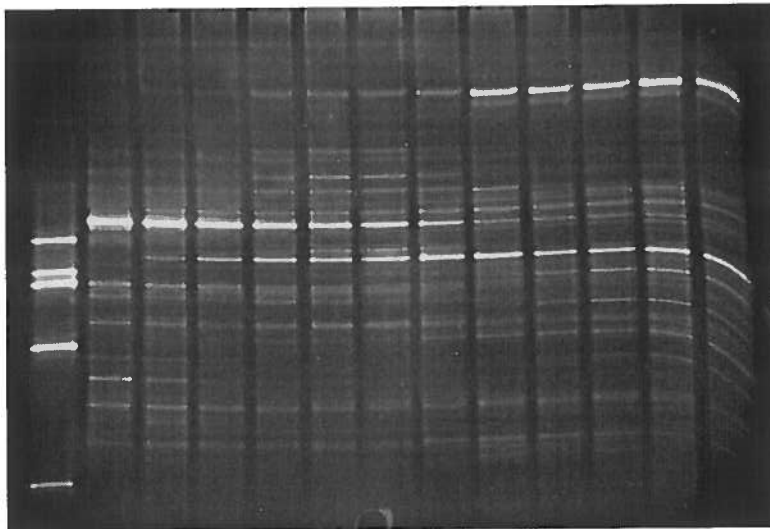


Figure A-2 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 17, à l'échelle de 8 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) lisier brut.

M L 13 19 27 33 41 69 83 90 97 103 111 118 jours

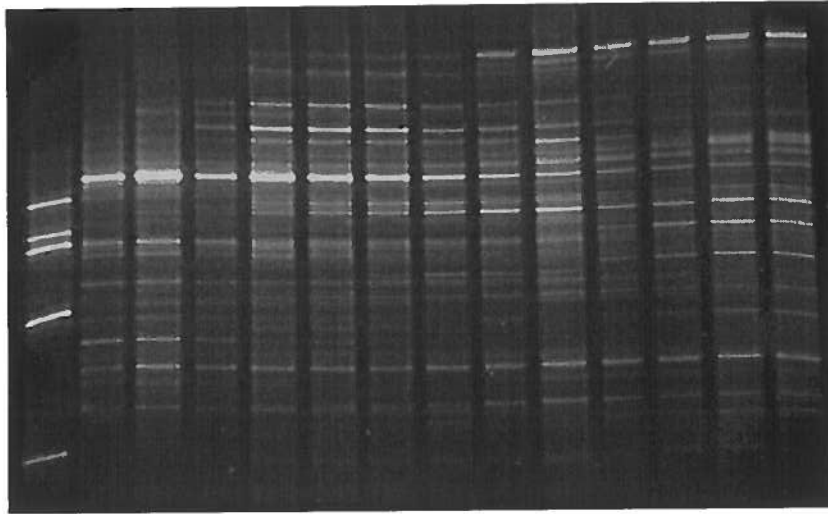


Figure A-3 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 18, à l'échelle de 2,5 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) lisier brut.

M L 20 34 42 70 91 98 104 112 119 133 139 146 153 160 167 jours

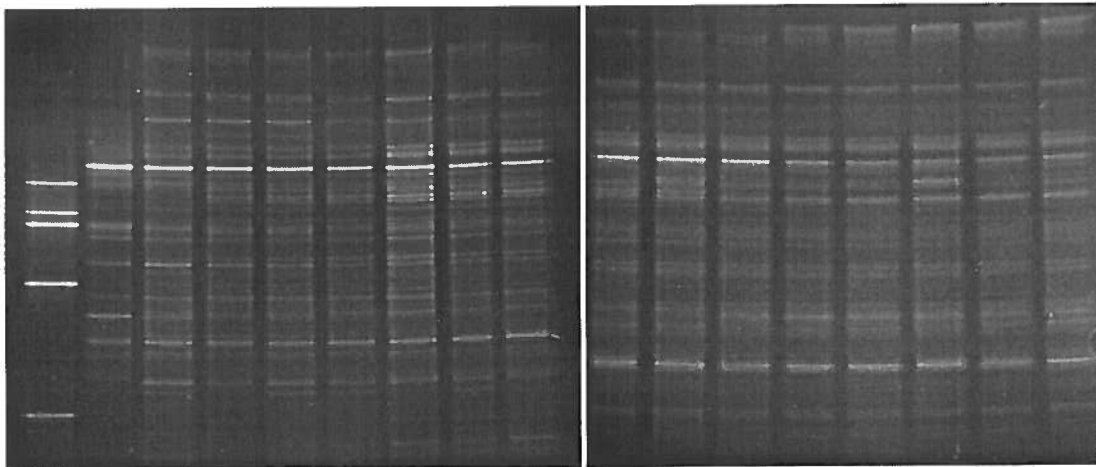


Figure A-4 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 25, à l'échelle de 160 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) lisier brut.

APPENDICE B

Profils sur DGGE des populations appartenant au domaine *Eubacteria* des réacteurs en conditions normales de traitement.

M L 0 3 7 10 17 21 24 28 31 38 45 50 jours

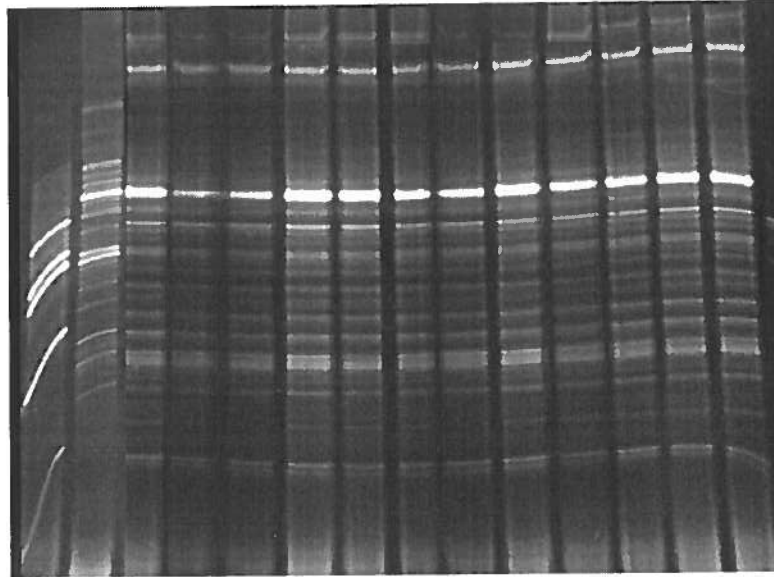


Figure B-1 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 4, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) lisier brut.

M L 0 3 7 10 17 21 24 28 31 38 45 50 jours

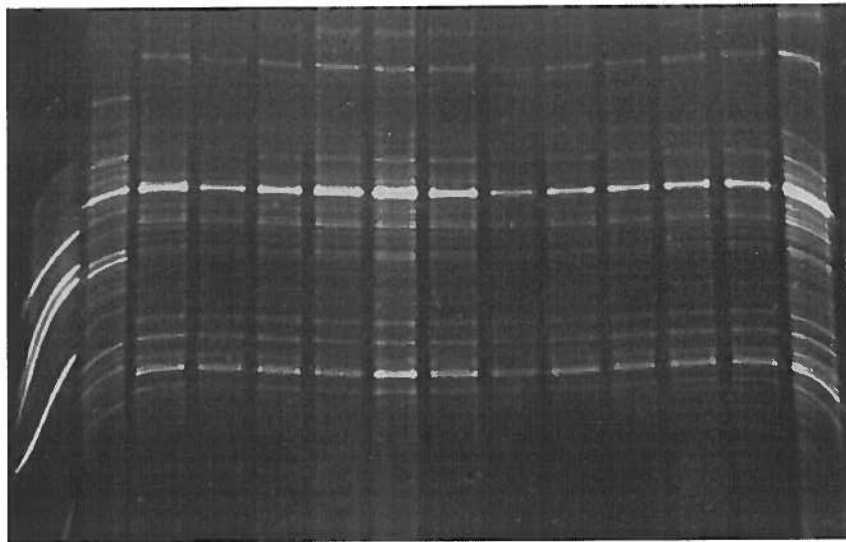


Figure B-2 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 5, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) lisier brut.

M L 0 3 7 10 17 21 24 28 31 38 45 50 jours

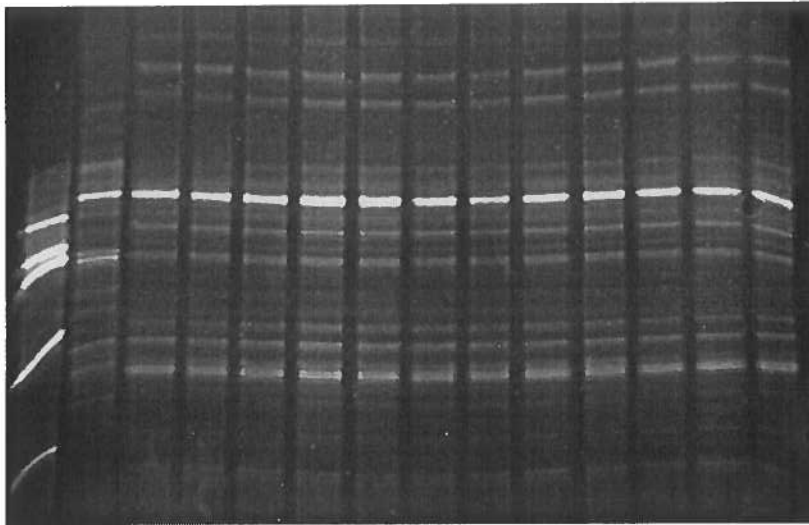


Figure B-3 : Profil des *Eubacteria* du réacteur # 6, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence. L) lisier brut.

APPENDICE C

Profils sur DGGE des populations appartenant au domaine *Archaea*
Lorsque amplifiées selon la première stratégie d'amplification pendant la période de
démarrage des réacteurs.

M 13 83 164 jours

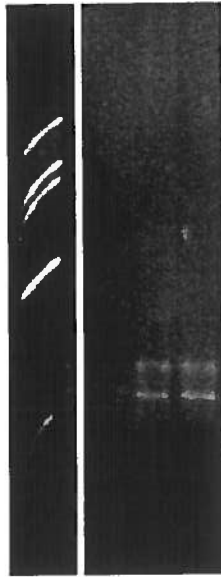


Figure C-1 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 22, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

M 13 69 111 jours

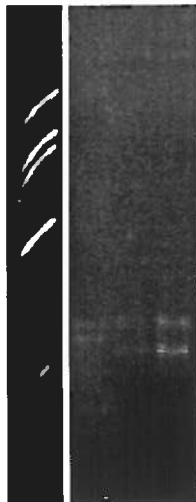


Figure C-2 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 17, à l'échelle de 8 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

M 13 69 111 jours

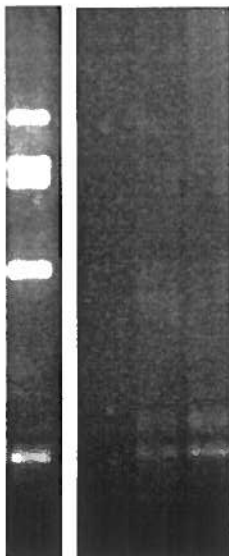


Figure C-3 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 18, à l'échelle de 2,5 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %.
Légende : M) Marqueur de référence.

M 20 91 140 jours

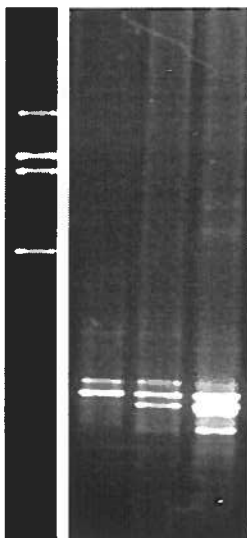


Figure C-4 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 25, à l'échelle de 160 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %.
Légende : M) Marqueur de référence.

APPENDICE D

Profils sur DGGE des populations appartenant au domaine *Archaea* lorsque amplifiées selon la première stratégie d'amplification à partir des réacteurs en conditions normales de traitement.

M 0 24 50 jours



Figure D-1 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 4, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

M 0 24 50 jours



Figure D-2 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 5, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

M 0 24 50 jours



Figure D-3 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch D et Arch G, du réacteur # 6, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

APPENDICE E

Groupes de clones pour la génothèque de clones Arch D-Arch G formés à la suite des combinaisons des patrons de digestions en RFLP.

**Tableau E-1 : Groupes de clones formés pour la génothèque de clones Arch D-Arch
G suite aux combinaisons des profils de digestion.**

# des clones	# des profils de digestion avec <i>Rsa</i> I	# des profils de digestion avec <i>Hha</i> I	Groupes de clones
1	1	1	Ar 1
2	1	1	Ar 1
3	1	1	Ar 1
10	1	1	Ar 1
13	1	1	Ar 1
15	1	1	Ar 1
16	1	1	Ar 1
22	1	1	Ar 1
27	1	1	Ar 1
30	1	1	Ar 1
35	1	1	Ar 1
39	1	1	Ar 1
41	1	1	Ar 1
28	1	1	Ar 1
33	1	1	Ar 1
37	1	1	Ar 1
4	1	2	Ar 2
32	1	2	Ar 2
5	3	3	Ar 3
6	5	1	Ar 4
11	5	1	Ar 4
23	5	1	Ar 4
29	5	1	Ar 4
40	5	1	Ar 4
43	5	1	Ar 4
7	6	1	Ar 5
12	6	1	Ar 5
14	6	1	Ar 5
20	6	1	Ar 5
36	6	1	Ar 5
42	6	1	Ar 5
8	8	6	Ar 6
9	4	1	Ar 7

17	7	1	Ar 8
18	6	2	Ar 9
31	6	2	Ar 9
19	5	7	Ar 10
21	1	5	Ar 11
24	2	1	Ar 12
25	6	4	Ar 13
26	9	7	Ar 14
34	9	1	Ar 15
38	1	4	Ar 16

APPENDICE F

Profils sur DGGE des populations appartenant au domaine *Archaea* lorsque amplifiées selon la deuxième stratégie d'amplification pendant la période de démarrage des réacteurs.

M 13 83 164 jours

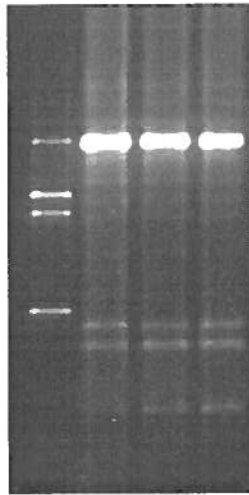


Figure F-1 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 22, à l'échelle de 42 L, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %.
Légende : M) Marqueur de référence.

M 13 69 111 jours

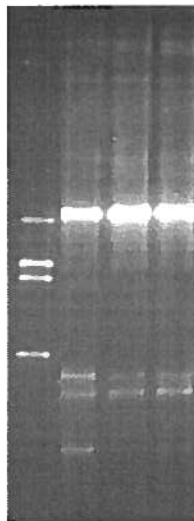


Figure F-2 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 17, à l'échelle de 8 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %.
Légende : M) Marqueur de référence.

M 13 69 111 jours

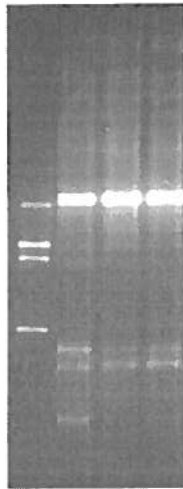


Figure F-3 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 18, à l'échelle de 2,5 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

M 20 91 140 jours

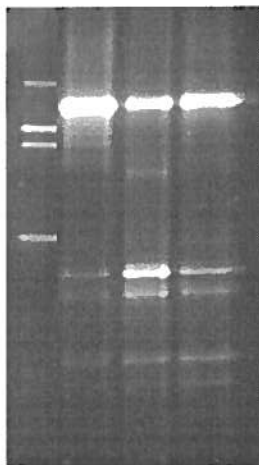


Figure F-4 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 25, à l'échelle de 160 m³, pendant la période de démarrage. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

APPENDICE G

Profils sur DGGE des populations appartenant au domaine *Archaea* lorsque amplifiées selon la deuxième stratégie d'amplification à partir des réacteurs en conditions normales de traitement.

M 0 24 50 jours

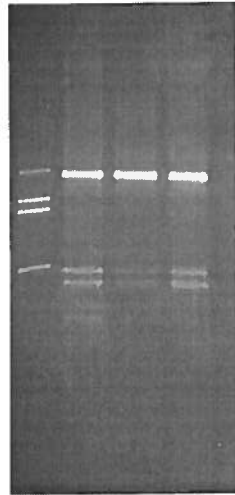


Figure G-1 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 4, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

M 0 24 50 jours

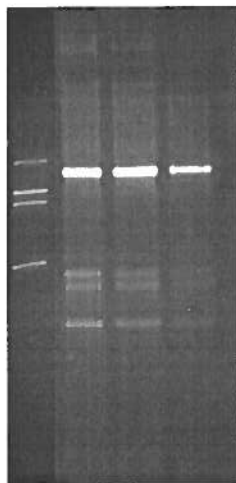


Figure G-2 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 5, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

M 0 24 50 jours

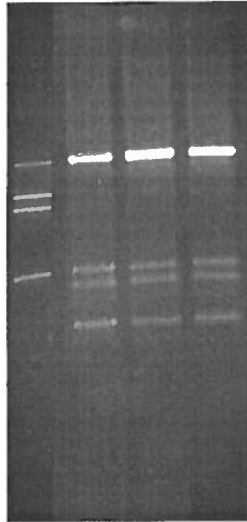


Figure G-3 : Profil des *Archaea*, ADN amplifié avec les amorces Arch 69f et Arch 958r, du réacteur # 6, à l'échelle de 42 L, pendant un cycle en conditions normales de traitement. Le gradient de dénaturant se situait entre 20 et 70 %. Légende : M) Marqueur de référence.

APPENDICE H

Groupes de clones pour la génothèque de clones Arch 69f-Arch 958r formés à la suite des combinaisons des patrons de digestions en RFLP.

**Tableau H-1 : Groupes de clones formés pour la génothèque de clones Arch 69f-
Arch 958r suite aux combinaisons des profils de digestion.**

# des clones	# des profils de digestion avec <i>Rsa</i> I	# des profils de digestion avec <i>Hha</i> I	Groupes de clones
100	1	1	Ar 17
108	1	1	Ar 17
101	2	5	Ar 18
102	2	2	Ar 19
134	2	2	Ar 19
110	2	2	Ar 19
113	2	2	Ar 19
117	2	2	Ar 19
135	2	2	Ar 19
103	3	1	Ar 20
104	1	3	Ar 21
105	1	3	Ar 21
106	1	3	Ar 21
116	1	3	Ar 21
120	1	3	Ar 21
122	1	3	Ar 21
137	1	3	Ar 21
107	3	2	Ar 22
115	3	2	Ar 22
121	3	2	Ar 22
144	3	2	Ar 22
109	5	2	Ar 23
111	5	2	Ar 23
138	5	2	Ar 23
142	5	2	Ar 23
147	5	2	Ar 23
133	5	2	Ar 23
112	8	6	Ar 24
114	12	3	Ar 25
119	6	2	Ar 26
129	6	2	Ar 26
123	7	3	Ar 27

139	7	3	Ar 27
124	7	1	Ar 28
126	11	3	Ar 29
132	11	3	Ar 29
149	11	3	Ar 29
127	10	2	Ar 30
136	10	2	Ar 30
143	10	2	Ar 30
130	6	4	Ar 31
140	14	3	Ar 31
145	12	1	Ar 32
148	9	2	Ar 33

RÉFÉRENCES

- AMANN, R. I., W. Ludwig et K.-H. Schleifer. 1995. «Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation». Microbiological Reviews, vol. 59, no. 1, p. 143-169.
- APHA. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Éd. A. E. Greenberg, L. S. Clesceri et A. D. Eaton, 18^{ème} édition. Washington : American Public Health Association.
- ATLAS, R. M. et R. Bartha. 1998. Microbial Ecology. Fundamentals and application. 4^{ème} édition. Californie : Benjamin / Cummings science publishing, 694 p.
- BEAUDET, R., C. Gagnon, J.-G. Bisailon et M. Ishaque. 1990. «Microbiological aspects of aerobic thermophilic treatment of swine waste». Applied and Environmental Microbiology, vol. 56, no. 4, p. 971-976.
- BERTHELET, M., L. G. Whyte et C. W. Greer. 1996. «Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns». FEMS Microbiology Letters, vol. 138, p. 17-22.
- BICUDO, J. R., S. M. Goyal et J. Zhu. 2000. Compte rendu de «Animal, Agricultural and Food Processing Wastes». Animal production, manure management and pathogens: a review (du 9 au 11 octobre, Des Moines, Iowa). 14 pages.
- CABRIOL N., R. Villemur, J. Perrier, F. Jacob, B. Fouillet et P. Chambon. 1998. «Isolation of a methanogenic bacterium, *Methanosarcina* sp. strain FR, for its ability to degrade high concentrations of perchloroethylene». Canadian Journal of Microbiology, vol. 44, p. 1142-1147.
- CASAMAYOR, E. O., H. Schafer, L. Baneras, C. Pedros-Alio et G. Muyzer. 2000. «Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparaison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, no. 2, p. 499-508.
- CDPQ. 1999. Coup d'oeil 1999: la production porcine au Québec. Sainte-Foy, Québec. Centre de développement du porc du Québec.
- CHAN, O. C., W. T. Liu et H. H. P. Fang. 2001. «Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene». Water Science and Technology, vol. 43, no. 1, p. 77-82.
- CHYNOWETH, D. P., A. C. Wilkie et J. M. Owens. 1999. «Anaerobic treatment of piggery slurry-review». Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, vol 12, no. 4, p. 607-628.

- CURTIS, T. P. et N. G. Craine. 1998. «The comparison of the diversity of activated sludge plants». Water Science and Technology, vol. 37, p. 71-78.
- CUZIN, N., A. S. Ouattara, M. Labal et J. L. Garcia. 2001. «*Methanobacterium congolense* sp. nov., from a methanogenic fermentation of cassava peel». International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 51, no. 2, p. 489-493.
- DAGUE, R. R., C. E. Habben, S. R. Pidaparti, 1992. «Initial studies on the anaerobic sequencing batch reactor». Water Science and Technology, vol. 26, no. 9-11, p. 2429-2432.
- DE LONG, E., G. S. Wickham et N. R. Pace. 1989. «Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells». Science, vol. 243, p. 1360-1363.
- DIANOU, D., T. Miyaki, S. Asakawa, H. Morii, K. Nagaoka, K. H. Oyaizu et S. Matsumoto. 2001. «*Methanoculleus chikugoensis* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from paddy field soil in Japan, and DNA-DNA hybridization among *Methanoculleus* species». International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 51, no. 5, p. 1663-1669.
- DONG, X et A. J. M. Stams. 1995. «Evidence for H₂ and formate formation during syntrophic butyrate and propionate degradation». Anaerobe, vol. 1, p. 35-39.
- DONHAM, K. J. 2000. «The concentration of swine production». Toxicology, vol. 16, no. 3, p. 559-597.
- DUVAL, J. 1992. «Contrôles des odeurs de lisier de porc». Montréal: 9 pages.
- ELBERSON, M. A. et K. R. Sowers. 1997. «Isolation of an aceticlastic strain of *Methanosarcina siciliae* from marine canyon sediments and emendation of the species description for *Methanosarcina siciliae*». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 47, no. 4, p. 1258-1261.
- ENGLE, M., Y. Li, F. Rainey, S. DeBlois, V. Mai, A. Reichert, F. Mayer, F. P. Messner et J. Wiegel. 1996. «*Thermobrachium celere* gen. nov., sp. nov., a rapidly growing thermophilic, alkalitolerant, and proteolytic obligate anaerobe ». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 46, no. 4, p. 1025-1033.
- FANG, H. H. P., T. Zhang, H. Liu. 2002. «Microbial diversity of mesophilic hydrogen-producing sludge». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 58, p. 112-118.

- FELSENTEIN, J. 1993. PHYLIP (Phylogenetic inference package), version 3.5c. Departement of genetics, University of Washington, Seattle, WA.
- FERNANDEZ, A., S. Huang, S. Seston, J. Xing, R. Hickey, C. Criddle et J. Tiedje. 1999. «How stable is stable? Function versus community composition». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no. 8, p. 3697-3704.
- FERRARI, V. C. et J. T. Hollibaugh. 1999. «Distribution of microbial assemblages in the central arctic ocean basin studied by PCR/DGGE: analysis of large data set». Hydrobiologia, vol. 401, p. 55-68.
- FERRIS, M. J., G. Muyzer et D. M. Ward. 1996. «Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, no. 2, p. 340-346.
- FODDE, R. et M. Losekoot. 1994. «Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis». Human Mutation, vol. 3, no. 2, p. 83-94.
- FPPQ. 2002. Rapport annuel 2001-2002. Fédération des producteurs de porcs du Québec, 61 pages.
- GARCIA, J.-L., B. K. C. Patel et B. Olivier, 2000. «Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea». Anaerobe, vol. 6, p. 205-236.
- GARRITY, G. M., D. R. Boone et R. W. Castenholz. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^{ème} édition, New York : Springer, vol. 1, 721 p.
- GERHARDT, P., R. G. E. Murray, W. Wood et N. R. Krieg. 1994. «Direct total-cell counting». Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington : A. S. F. microbiology. p. 24.
- GODON, J.-J., E. Zumtejn, P. Dabert, F. Habouzit et R. Moletta. 1997. «Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 7, p. 2802-2813.
- GOUVERNEMENT DU CANADA. 1997. Evaluation of liquide hog manure management and treatment technologies. Technological transfer working group as part of the Agro-Environmental plan of the hog industry. Ottawa : 31 pages.
- GOUVERNEMENT DU CANADA. 1998. Stratégie de recherche sur la gestion du lisier de porc au Canada. Agriculture et Agro-alimentaire Canada. Direction générale de la recherche. Ottawa.

- GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. 2001. Critères environnementaux pour l'élevage de porcs sur fumier solide. Québec : 6 pages.
- GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. 2002. Règlement sur les exploitations agricoles. Québec: 27 pages.
- GRIFFIN, M. E., K. D. McMahon, R. Mackie et L. Raskin. 1998. «Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids». Biotechnology and Bioengineering, vol. 57, no. 3, p. 342-355.
- GROUPE DE TRAVAIL «Transfert Technologique» du Plan agroenvironnemental de la production porcine. 2001. Rapport d'évaluation des technologies de gestion et de traitement du lisier de porc.
- HALL, T.A. 1999. «BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT». Nucl. Acids. Symp. Ser., vol. 41, p. 95-98.
- HANSEN, K. H., B. K. Ahring et L. Raskin. 1999. «Quantification of syntrophic acid- β -oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization». Applied and Environmental Microbiology, vo. 65, no. 11, p. 4767-4774.
- HEMGSTMANN, U., K.-J. Chin, P. H. Janssen et W. Liesack. 1999. «Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil». Applied and Environmental Microbiology, vol 65, no. 11, p. 5050-5058.
- HEUER H., M. Krsek, P. Barker, K. Smalla et E. M. H. Wellington. 1997. «Analysis of *Actinomycete* communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 8, p. 3233-3241.
- HOLLIBAUGH, J. T., P. S. Wong et M. C. Murrell. 2000. «Similarity of particle-associated and free-living bacterial communities in northern San Francisco Bay, California». Aquatic Microbial Ecology, vol. 21, p. 103-114.
- HOLT, J. G. et N. R. Krieg. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. London : Williams et Wilkins, vol. 1, 964 p.
- HOLT, J. G. et P. H. Sneath. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. London : Williams et Wilkins, vol. 2, 635 p.
- HOUGHTON, J. T., L. G. Meira Filho, B. A. Callander, N. Harris, A. Kattenberg et K. Maskell. 2001. Climate Change 2001 : The Scientific Basis. Cambrige : Cambrige University press, 944 p.

- ISHII K., M. Fukui et S. Takii. 2000. «Microbial succession during a composting process as evaluated by gradient gel electrophoresis analysis». Journal of Applied Microbiology, vol. 89, p. 768-777.
- JONGBLOED A. W. et N. O. Lenis. 1998. «Environmental concerns about animal manure ». Journal of Animal Science, vol. 76, p. 2641-2648.
- JOULIAN, C., B. Ollivier, B. K. C. Patel et P. A. Roger. 1998 «Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils». FEMS Microbiological Ecology, vol. 25, no. 2, p. 135-145.
- KAHARABATA, S. K., P. H. Schuepp et R. L. Desjardins. 1998. «Methane emissions from aboveground open manure slurry tanks». Global Biogeochemical Cycles, vol. 12, no. 3, p. 545-554.
- KEARNEY, T. E., M. J. Larkin et P.N. Levett. 1993. «The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria». Journal Applied Bacteriology, vol. 74, p. 86-93.
- KOWALCHUK, G., A. J. R. Stephen, W. De Boer, J. I. Prosser, T. M. Embley et J. W. Woldendorp. 1997. «Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 4, p. 1489-1497.
- KRULWICH, T. A. et A. A. Guffantii. 1989. «Alkalophilic bacteria». Annual Review of Microbiology, vol. 43, 9. 435-463.
- LAPARA, T. M. et J. E. Alleman. 1998. «Thermophilic aerobic biological wastewater treatment». Water Resources, vol. 33, no. 4, p. 895-908.
- LAPARA, T. M., C. H. Nakatsu, L. Pantea et J. E. Alleman. 2000. «Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, no. 9, p. 3951-3959.
- LEADBETTER, J. R., T. M. Schmidt, J. R. Graber et J. A. Breznak. 1999. «Acetogenesis from H₂ plus CO₂ by *Spirochetes* from termite guts». Science, vol. 283, p. 686-689.
- LEE, D.-H., Y.-G. Zo et S.-J. Kim. 1996. «Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, no. 9, p. 3112-3120.

- LESER, T. D., J. Z. Amenuvor, T. K. Jensen, R. H. Lindecrona, M. Boye et K. Moller. 2002. «Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited». Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, no. 2, p. 673-690.
- LIN, C. and T. L. Miller. 1998. «Phylogenetic analysis of *Methanobrevibacter* isolated from feces of humans and other animals». Archives of Microbiology, vol. 169, p. 397-403.
- LOUHELAINEN, K., J. Kangas, A. Veilanen et P. Viilos. 2001. «Effect of in situ composting on reducing offensive odors and volatile organic compounds in swineries». AIHAJ, vol. 62, no. 2, p. 159-167.
- LUXMY, B. S., F. Nakajima et K. Yamamoto. 2000. «Analysis of bacterial community in membrane-separation bioreactors by fluorescent in situ hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques». Water Science and Technology vol. 41, no. 10-11, p. 259-268.
- MAESTROJUÁN, G. M., D. R. Boone, L. Xun, R. A. Mah et L. Zhang. 1990. «Transfer of *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanogenium olentangyi*, and *Methanogenium thermophilicum* to the genus *Methanoculleus* gen. nov., emendation of *Methanoculleus marisnigri* and *Methanogenium*, and description of new strains of *Methanoculleus bourgense* and *Methanoculleus marisnigri*». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 40, p. 117-122.
- MARCHESI, J. R., A. J. Weightman, B. A. Cragg, R. J. Parkes et J. C. Fry. 2001. «Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis». FEMS Microbiological Ecology, vol. 34, no. 3, p. 221-228.
- MASSÉ, D. I. 1998. Compte-rendu de «Évaluation des technologies existantes et en développement pour le traitement du lisier de porc à la ferme». Travaux de l'atelier commun du Conseil canadien du porc (CCP) et d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) sur les porcs et l'environnement (Etobicoke 26 au 29 avril 1998): 8 pages.
- MASSÉ, D. I. 1999. «Low temperature anaerobic treatment of swine manure». In R. Morgesin et F. Schemmer. *Biotechnology applications of cold adapted organisms*, p. 257-269.
- MASSÉ, D. I. et R. L. Droste. 2000. «Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor ». Water Resources, vol. 34, no. 12, p. 3087-3106.

- MASSÉ, D. I., D. Lu, L. Masse et D. L. Droste. 2000a. «Effect of antibiotics on psychrophile anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors». Bioresource Technology, vol. 75, no. 3, p. 205-211.
- MASSÉ, D. I., L. Masse, A. Verville et S. Bilodeau. 2001. «The start-up of anaerobic sequencing batch reactors at 20 °C and 25 °C for the treatment of slaughterhouse wastewater ». Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 76, no. 4, p. 393-400.
- MASSÉ, D. I., N. K. Patni, R. L. Droste et K. J. Kennedy. 1996. «Operation strategies for psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors». Canadian Journal of Civil Engineering, vol. 23, p. 1285-1294.
- MILLER, K. M., T. J. Ming, A. D. Schulze et R. E. Withler. 1999. «Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): a rapide and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations». BioTechniques, vol. 27, p. 1016-1030.
- MILLER, T. L. et M. J. Wolin. 1985. «*Methanosphaera stadtmanae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen». Archives of Microbiology, vol 141, p. 116-122.
- MORÉ, M. I., J. B. Herrick, M. C. Silva, W. C. Ghiorse et E. L. Madsen. 1994. «Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, no. 5, p. 1572-1580.
- MOTER, A. et U. B. Göbel. 2000. «Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms». Journal of Microbiological Methods, vol. 41, p. 85-112.
- MUYZER, G. 1999. «DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems». Current Opinion in Microbiology, vol. 2, no. 3, p. 317-322.
- MUYZER, G. et K. Smalla. 1998. «Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology». Antonie van Leeuwenhoek, vol. 73, p. 127-141.
- MUYZER, G., E. C. D. Waal et A. G. Uitterlinden. 1993. «Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59, no. 3, p. 695-700.
- MYERS, R. J., S. G. Fischer, T. Maniatis et L. S. Lerman. 1985. «Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis». Nucleic Acids Research, vol. 13, no. 9, p. 3111-3129.

- MYERS R. M., V. C. Sheffield et D. R. Cox. 1989. «Mutation detection by PCR, GC-clamps, and denaturing gradient gel electrophoresis». In. H.A. Erlich. PCR Technology, Principles and applications for DNA amplification. Chapitre 7. New York : Stockton Press, p. 71-88.
- NG, Wun-Jern. 1989. «A sequencing batch anaerobic reactor for treating piggery wastewater». Biological Wasters, vol. 28, p. 39-51.
- NOZHEVNIKOVA, A. N., O. R. Kotsyurbenko et S. N. Parshina. 1999. «Anaerobic manure treatment under extreme temperature conditions». Water Science and Technology, vol. 40, no. 1, p. 215-221.
- ONUKI, M., N. Satoh, T. Mino et T. Matsuo. 2000. «Application of molecular methods to microbial community analysis of activated sludge ». Water Science and Technology, vol. 42, no. 3-4, p. 17-22.
- OUDE ELFERINK, S. J. W. H., R. van Lis, H. G. H. I. Heilig, A. D. L. Akkermans et A. J. M. Stams. 1998. «Detection and quantification of microorganisms in anaerobic bioreactors». Biodegradation, vol. 9, p. 169-177.
- ØVREAS, L., L. Forney, F. L. Daae, et V. Torsvik. 1997. «Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 9, p. 3367-3373.
- PAGILLA, K. R., H. Kim, et T. Cheunbarn. 2000. «Aerobic thermophilic and anaerobic mesophilic treatment of swine waste ». Water Resources, vol. 34, no. 10, p. 2747-2753.
- PINAR, G., C. Gurtner, W. Lubitz et S. Rolleke. 2001. «Identification of archaea in objects of art by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and shotgun cloning». Microbial Growth in Biofilms, Pt A R Biological Aspects, vol. 336, no. 366, p. 356-366.
- RASKIN, L., L. K. Poulsen, D. R. Noguera, B. E. Rittmann et D. A. Stahl. 1994. «Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization ». Applied and Environmental Microbiology, vol 60, no. 4, p. 1241-1248.
- RASKIN, L., J. M. Stromley, B. E. Rittmann et D. A. Stahl. 1994a. «Group-specific 16 S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, no. 4, p. 1232-1240.

- RASKIN, L., D. Zheng, M. E. Griffin, P. G. Stroot et P. Misra. 1995. «Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes ». Antonie van Leeuwenhoek, vol. 68, p. 297-308.
- ROUVIÈRE, P., L. Mandelco, S. Winker et C. R. Woese. 1992. «A detailed phylogeny for the *Methanomicrobiales*». System Applied Microbiology, vol. 15, no. 3, p. 363-371.
- ROZICH, A. F. et R. J. Colvin. 1997. «Biological : Aerobic thermophilic systems. Design and operational considerations for thermophilic aerobic reactors treating high strength wastes and sludges». 52nd Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Chelsea, Michigan, 5 pages.
- SAMBROOK, J., E. F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2^{ème} édition, New York: Cold Spring Harbor Press.
- SCHINK, B. 1997. «Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation». Microbiology and Molecular Biological Reviews, vol. 61, no. 2, p. 262-280.
- SEKIGUCHI, H., N. Tomioka, T. Nakahara et H. Uchiyama. 2001. «A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis». Biotechnology Letters, vol. 23, no. 15, p. 1205-1208.
- SERIGUCHI, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi et H. Harada. 1999. «Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no. 3, p. 1280-1288.
- SHEFFIELD, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman et R. M. Myers. 1989. «Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes». Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 86, no. 1, p. 232-236.
- SUAOU, A., R. Bonnet, M. Sutren, J.-J. Godon, G. R. Gibson, M. D. Collins et J. Doré. 1999. «Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut». Applied and Environmental Microbiology vol. 65, no. 11, p. 4799-4807.
- THOMPSON, J. D., D. G. Higgins, et T. J. Gibson. 1994. «CLUSTALW :improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positive-specific gap penalties and weight matrix choice». Nucleic Acids Research, vol. 22, p. 4673-4680.

- TOP, B. 1992. «A simple method to attach a universal 50-bp GC-clamp to PCR fragments used for mutation analysis by DGGE». PCR Methods and Applications, vol. 2, no. 1, p. 83-85.
- VETRIANI, C., H. W. Jannasch, B. J. MacGregor, D. A. Stahl et A.-L. Reysenbach. 1999. «Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no. 10, p. 4375-4384.
- WATANABE, K., Y. Kodama et S. Harayama. 2001. «Desing and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting». Journal of Microbiological Methods, vol. 44, no. 3, p. 253-262.
- WHITEHEAD, T. R. et M. A. Cotta. 2001. «Characterisation and comparaison of microbial populations in swine faeces and manure storage pits by 16S rRNA gene sequence analyses». Anaerobe, vol. 7, p. 181-187.
- WHITFORD, M. F., R. M. Teather et R. J. Forster. 2001. «Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen». BMC Microbiology, vol. 1, no. 5.
- WU, Y., V. M. Hayes, J. Osinga, I. M. Mulder, M. W. G. Looman, C. H. C. M. Buys et R. M. W. Hofstra. 1998. «Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis». Nucleic Acids Research, vol. 26, no. 23, p. 5432-5440.
- ZELLNER, G., D. R. Boone, J. Keswani, W. B. Whitman, C. R. Woese, A. Hagemstein, B. J. Tindall et E. Stackebrandt. 1999. «Reclassification of *Methanogenium tationis* and *Methanogenium liminatans* as *Methanofollis tationis* gen. nov., comb. nov. and *Methanofollis liminatans* comb. nov. and description of a new strain of *Methanofollis liminatans*». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 49, no. 1, p. 247-255.
- ZELLNER, G., E. Stackebrandt, P. Messner, B. J. Tindall, E. Conway de Macario, H. Kneifel, U. B. Sleytr et J. Winter. 1989. «*Methanocorpusculaceae* fam. nov., represented by *Methanocorpusculum parvum*, *Methanocorpusculum sinense* spec. nov. and *Methanocorpusculum bavaricum* spec. nov.». Archives of Microbiology vol. 151, no. 5, p. 381-390.
- ZHANG, R. H., Y. Yin, S. Sung et R. R. Dague. 1997. «Anaerobic treatment of swine waste by the anaerobic sequencong batch reactor». Trans ASAE, vol. 40, no. 3, p. 761-767.
- ZHANG, T. et H. H. P. Fang. 2000. «Digitization of DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) profile and cluster analysis of microbial communities». Biotechnology Letters, vol. 22, no. 5, p. 399-405.

- ZHENG, D. et L. Raskin. 2000. «Quantification of *Methanosaeta* species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes». Microbial Ecology, vol. 39, p. 246-262.
- ZHU, J. 2000. «A review of microbiology in swine manure odor control». Agriculture, Ecosystems and Environment, vol. 78, p. 93-106.