

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Caractérisation microbiologique et optimisation de la
dénitrification en milieu marin au Biodôme de Montréal**

Par
Véronique Laurin

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

Jury d'évaluation

Examineur interne	Éric Déziel, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Kim Juniper, Ph.D. Université du Québec à Montréal
Co-directeur de recherche	Serge Parent, Ph.D. Biodôme de Montréal
Directeur de recherche	Richard Villemur, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Le Biodôme de Montréal possède un procédé de dénitrification raccordé au principal système de filtration de son mésocosme de 3 millions de litres d'eau de mer, le Saint-Laurent marin. Depuis la mise en fonction du procédé, la concentration en nitrates dans le mésocosme a grandement diminué. Elle demeure cependant au-dessus du seuil recommandé en aquarium pour assurer la conservation de la faune aquatique. Depuis l'année 2000, une équipe multidisciplinaire composée de chercheurs et d'étudiants de l'école Polytechnique de Montréal et de l'INRS-Institut Armand-Frappier travaille à l'optimisation du procédé de dénitrification. Mon projet de maîtrise s'est inscrit dans le cadre de ces travaux et les différents objectifs ont traité de l'aspect microbiologique du procédé de dénitrification.

Au cours de ce projet, les objectifs de recherche se sont divisés en deux volets: l'optimisation et la caractérisation du procédé de dénitrification. Dans le volet optimisation, le rapport carbone/azote (C/N) optimal pour la dénitrification au méthanol a été déterminé par des essais en fioles. L'impact des divers rapports C/N sur la diversité de la flore microbienne a aussi été déterminé. Le rapport C/N optimal retenu selon les essais a été de 1,5. De plus, il a été démontré que la variation du rapport C/N n'influençait pas la diversité microbienne.


Toujours dans le volet optimisation, le second objectif visait à déterminer une méthode de conservation adéquate de la biomasse du dénitrificateur advenant un arrêt de ce dernier. Les essais effectués à petite échelle ont démontré que la conservation de la biomasse à -80°C avec 15% de glycérol était idéale car celle-ci présentait un excellent rendement de dénitrification même après une période de 17 mois de conservation. Cependant, la méthode de conservation retenue a été la congélation à -20°C avec 15% de glycérol puisque la biomasse a présenté un rendement équivalent à celui de la biomasse conservée à -80°C avec 15% de glycérol. De plus, les installations au Biodôme permettant

la congélation à -20°C sont plus adéquates pour la conservation d'une grande quantité de supports du dénitrificateur.

Dans le volet caractérisation du procédé de dénitrification, trois objectifs ont été atteints. D'abord, la croissance et l'évolution de la flore microbienne ont été étudiées tout au long des essais réalisés sur des unités pilotes reproduisant le procédé de dénitrification à plus petite échelle. Les résultats ont montré que la source de carbone, la présence d'oxygène et le mode d'opération influençaient la croissance et la diversité microbienne.

Les deux derniers objectifs du volet caractérisation visaient l'étude des protozoaires du dénitrificateur. Dans un premier temps les populations de protozoaires ont été identifiées par microscopie. Puis, une génothèque d'ADNr 18S a permis une identification plus approfondie. Les résultats ont révélé que la communauté de protozoaires du dénitrificateur était dominée par les ciliés. D'autre part, des essais sur l'impact des protozoaires sur l'activité de dénitrification ont montré que ces derniers influençaient l'accumulation d'intermédiaires, soit les nitrites, lors de la dénitrification. Les essais ont aussi montré que la présence des protozoaires réduisait la quantité de bactéries en suspension dans le milieu.


Étudiante


Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Richard Villemur, de m'avoir offert la possibilité de réaliser ce projet de maîtrise et de m'avoir encadré et soutenu financièrement. L'ouverture d'esprit qu'il a démontré face aux nouvelles idées ainsi que sa grande disponibilité ont grandement contribué à la réussite de ce projet.

Je remercie mon co-directeur de recherche, Serge Parent, pour son enthousiasme et sa motivation inépuisable face à l'accomplissement de ce projet ainsi que pour ses précieux conseils notamment pour les analyses statistiques.

À tous les membres du laboratoire, merci pour l'entraide que vous avez manifesté à mon égard et pour une ambiance de travail inoubliable. Je voudrais remercier particulièrement Normand Labbé qui m'a enseigné une multitude de techniques et surtout pour ses idées qui ont grandement enrichi ce projet. Merci également à Philippe Constant de m'avoir initialement fait part des intérêts de recherche du laboratoire.

Je remercie les techniciens et les membres du groupe d'environnement de l'INRS-Institut Armand-Frappier pour leurs suggestions et leur soutien technique.

Merci aux techniciens de laboratoire du Biodôme de Montréal, Claire Vasseur et Léandre Côté, pour leur aide précieuse lors de la réalisation des diverses analyses. Sans oublier tous les intervenants des Services techniques du Biodôme de Montréal, merci pour votre collaboration et votre aide technique.

Benoit, merci pour ta confiance, ta patience et surtout de m'avoir encouragée sans relâche.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS	XI
1. INTRODUCTION	1
1.1 Le Saint-Laurent marin	2
1.2 La problématique des nitrates.....	2
1.3 Le procédé de dénitrification.....	5
1.4 Objectifs du projet de recherche.....	5
2. REVUE DE LITTÉRATURE	6
2.1 La dénitrification.....	7
2.1.1 Principe de la dénitrification biologique	7
2.1.2 Microbiologie de la dénitrification	9
2.1.3 Les facteurs influençant la dénitrification.....	9
2.2 Les sources de carbone.....	12
2.2.1 L'effet du rapport carbone/azote (C/N) sur la dénitrification	13
2.2.2 L'effet de la source de carbone sur la diversité microbienne	15
2.3 Les biofilms	16
2.4 Les protozoaires du dénitrificateur.....	17
2.4.1 Taxonomie et classification des protozoaires	18
2.4.2 Diversité des protozoaires	19
2.4.3 Les protozoaires des milieux anoxiques et anaérobiques.....	21
2.5 Les rôles des protozoaires	22
2.5.1 L'effet des protozoaires sur la production de biomasse	22
2.5.2 L'effet des protozoaires sur la dynamique du biofilm	22
2.5.3 Les protozoaires comme bio-indicateurs	23
2.5.4 L'effet des protozoaires sur les matières en suspension	24

2.5.5 L'effet des protozoaires sur la minéralisation	24
2.6 La conservation d'un consortium microbien	24
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	26
3.1 Milieux de culture pour les essais en fioles.....	27
3.2 Échantillonnage de la biomasse des unités pilotes, du dénitrificateur et des fioles	28
3.2.1 Concentration des protozoaires prélevés du dénitrificateur	29
3.3 Mesure de la quantité de biomasse	30
3.3.1 Estimation de la quantité de biomasse par poids sec	30
3.3.2 Estimation de la quantité de biomasse par MES et MVES	30
3.4 Mesure de l'azote provenant des nitrates et des nitrites	32
3.4.1 Mesure des nitrites (N-NO ₂)	32
3.4.2 Mesure des nitrates (N-NO ₃).....	33
3.4.3 Mesure des nitrates et des nitrites par HPLC	33
3.5 Extraction de l'ADN génomique	34
3.5.1 Étude des populations bactériennes	34
3.5.2 Étude des populations de protozoaires	35
3.5.3 Quantification de l'ADN génomique et de l'ADN des gènes ribosomaux	35
3.6 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	36
3.7 Électrophorèse sur gel d'agarose	37
3.8 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide à gradient dénaturant (DGGE).....	38
3.8.1 Fabrication du gel dénaturant.....	38
3.8.2 Migration des échantillons	39
3.9 Identification des protozoaires par microscopie.....	39
3.9.1 Ralentissement et immobilisation des protozoaires	40
3.9.2 Coloration des protozoaires	40
3.10 Élaboration d'une génothèque visant les protozoaires	42
3.10.1 Concentration du produit de PCR	42
3.10.2 Ligation des fragments d'ADNr 18S	42
3.10.3 Transformation des cellules <i>E. coli</i> DH5α avec le produit de ligation.....	43
3.10.4 Criblage des colonies ayant intégrées l'insert	44
3.10.5 Extraction de l'ADN plasmidique pGEM [®] -T Easy/ADNr 18S	44
3.10.6 Criblage des clones par digestion enzymatique	45
3.11 Séquençage des gènes ribosomaux 18S.....	46
3.12 Analyse des séquences	46
3.13 Analyse de raréfaction	46
3.14 Étude phylogénétique.....	47

3.15 Analyses statistiques.....	47
4. RÉSULTATS	51
4.1 Effet des différents rapports carbone/azote sur l'activité de dénitrification et sur la diversité microbienne.....	52
4.1.1 Effet des différents rapports C/N sur l'activité de dénitrification	52
4.1.2 Effet des rapports C/N sur la diversité microbienne	53
4.2 Conservation de la biomasse du dénitrificateur	57
4.3 Étude de la flore microbienne des unités pilotes.....	66
4.3.1 Évolution de la diversité microbienne dans les désoxygénateurs des unités pilotes	66
4.3.2 Évolution de la diversité microbienne dans les dénitrificateurs des unités pilotes	67
4.3.3 Effet des paramètres d'opération sur la diversité microbienne	70
4.4 Caractérisation des protozoaires du dénitrificateur	72
4.4.1 Identification des protozoaires par microscopie.....	72
4.4.2 Identification des protozoaires au moyen d'une génothèque d'ADNr 18S.....	78
4.4.3 Analyse de raréfaction	81
4.4.4 Étude phylogénétique des clones de la génothèque	82
4.5 Impact des protozoaires sur la dénitrification	87
5. DISCUSSION	93
5.1 Le rapport carbone/azote (C/N) optimal pour la dénitrification	94
5.2 La préservation de la biomasse du dénitrificateur.....	95
5.3 L'évolution de la flore microbienne dans les unités pilotes	99
5.4 Les protozoaires du dénitrificateur.....	102
5.5 L'impact des protozoaires sur l'activité de dénitrification.....	107
6. CONCLUSION.....	112
7. BIBLIOGRAPHIE	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Équations stoechiométriques et rapports carbone/azote (C/N) théoriques pour la dénitrification avec l'éthanol, le méthanol et l'acide acétique à titre de substrat.....	15
Tableau 3.1 Amorces utilisées pour les amplifications PCR ainsi que les programmes de réactions utilisés avec chaque appareil.....	48
Tableau 4.1 Rendement de la biomasse dans les essais de dénitrification en fioles avec le méthanol ajouté à divers rapports C/N	55
Tableau 4.2 Suivi de la dénitrification avec la biomasse du dénitrificateur conservée sous différentes conditions pendant 1 semaine, 1 mois, 6 mois et 17 mois....	60
Tableau 4.3 Résultats de la génothèque visant les protozoaires du dénitrificateur.....	79-80

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Système de filtration principal du Saint-Laurent marin au Biodôme de Montréal.....	3
Figure 1.2	Évolution de la concentration en nitrates dans le Saint-Laurent marin.....	4
Figure 2.1.	Réaction et enzymes de la dénitrification.....	8
Figure 3.1	Appareillage pour la réalisation du DGGE.....	49
Figure 3.2	Vecteur pGEM [®] -T Easy utilisé pour le clonage des ADN des gènes ribosomiaux 18S issus de l'amplification PCR.....	50
Figure 4.1	Dénitrification avec le méthanol à divers rapports C/N.....	54
Figure 4.2	Quantité de biomasse dans les milieux aux différents rapports C/N.....	55
Figure 4.3	Profil de la diversité microbienne dans les essais en fioles sur les différents rapports C/N.....	56
Figure 4.4	Suivi de la dénitrification des milieux inoculés avec les supports colonisés du dénitrificateur et conservés en conditions variables pendant 1 semaine.....	61
Figure 4.5	Suivi de la dénitrification des milieux inoculés avec les supports colonisés du dénitrificateur et conservés en conditions variables pendant 1 mois.....	62
Figure 4.6	Suivi de la dénitrification des milieux inoculés avec les supports colonisés du dénitrificateur et conservés en conditions variables pendant 6 mois.....	63
Figure 4.7	Suivi de la dénitrification des milieux inoculés avec les supports colonisés du dénitrificateur et conservés en conditions variables pendant 17 mois.....	64
Figure 4.8	Profil de la diversité microbienne après 17 mois de conservation dans les différentes conditions.....	65
Figure 4.9	Évolution de la diversité microbienne des désoxygénateurs (unités pilotes) alimentés à l'acétate de sodium et au méthanol.....	68
Figure 4.10	Évolution de la diversité microbienne des dénitrificateurs (unités pilotes) alimentés à l'acétate de sodium et au méthanol.....	69
Figure 4.11	Comparaison de la diversité microbienne soumise aux différentes conditions d'opération des unités pilotes.....	71

Figure 4.12 Diversité des protozoaires dans le biofilm du dénitrificateur.....	74
Figure 4.13 Observations microscopiques des ciliés du biofilm appartenant à la classe Oligohymenophorea.....	75
Figure 4.14 Observations microscopiques des ciliés du biofilm appartenant à la classe Spirotrichea.....	76
Figure 4.15 Observations microscopiques des ciliés du biofilm appartenant à la classe Listostomatea.....	76
Figure 4.16 Observations microscopiques des opisthochontes du biofilm.....	77
Figure 4.17 Observations microscopiques des euglénobiontes du biofilm.....	77
Figure 4.18 Observations microscopiques du biofilm.....	77
Figure 4.19 Analyse de raréfaction de la génothèque d'ADNr 18S.....	81
Figure 4.20 Classification phylogénétique des alvéolobiontes.....	84
Figure 4.21 Classification phylogénétique des clones s'apparentant aux différentes lignées de protistes autres que les alvéolobiontes.....	85
Figure 4.22 Classification phylogénétique des clones dont l'affiliation demeure indéterminée.....	86
Figure 4.23 Suivi de la dénitrification dans les milieux avec et sans protozoaires.....	89
Figure 4.24 Accumulation des nitrites dans les milieux avec et sans protozoaires.....	90
Figure 4.25 Matières volatiles en suspension (MVES) dans les milieux avec et sans protozoaires.....	90
Figure 4.26 Comparaison de la densité bactérienne en suspension des milieux avec et sans protozoaires.....	91
Figure 4.27 Profil de la diversité microbienne dans les milieux avec et sans protozoaires.....	92

LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
DIC	Contraste interférentiel différentiel
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
g :	Force gravitationnelle
g :	Gramme
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactoside
L	Litre
MES	Matière en suspension
MVES	Matière volatile en suspension
μ g	Microgramme
mg	Milligramme
μ m	Micromètre
μ L	Microlitre
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimole
mV	Millivolt
min	Minute
M	Mole (concentration molaire)
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
pmol	Picomole
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
Pb	Paire de base
p/v	Poids par volume
RBC	Rotating biological contactor
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Sec	Seconde
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TRH	Temps de rétention hydraulique
U	Unité
UV	Lumière ultraviolette
v/v	Volume par volume
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranoside

1. INTRODUCTION

1.1 Le Saint-Laurent marin

Situé au Biodôme de Montréal, le Saint-Laurent marin est un mésocosme représentatif de l'estuaire et du golfe du fleuve Saint-Laurent. Le mésocosme se divise en deux bassins d'exposition et un bassin médical et contient au total trois millions de litres d'eau de mer artificielle d'une salinité de 28 à 30 g/L (mélange de sel «Instant Océan®» Aquarium systems, Mentor, OH, É-U). Plus d'une soixantaine d'espèces d'oiseaux, de poissons et d'invertébrés typiques de l'estuaire et du golfe du fleuve Saint-Laurent y sont représentés. Le système de filtration principal du Saint-Laurent marin est opéré en circuit fermé (figure 1.1a). Il est constitué de six filtres à sable qui ont pour rôle l'enlèvement des matières en suspension et la dégradation biologique de la matière organique. Ensuite, l'eau est acheminée vers un percolateur aérobie qui a pour fonction principale la nitrification des déchets azotés. Enfin, l'eau est dirigée vers une tour d'ozone qui permet l'enlèvement des microorganismes pathogènes ainsi que la clarification de l'effluent.

1.2 La problématique des nitrates

Depuis la mise en eau du Saint-Laurent marin en 1992, le Biodôme de Montréal est aux prises avec des problèmes d'accumulation des nitrates dans le milieu (figure 1.2). Une concentration maximale en nitrates de 180 mg N-NO₃/L fut atteinte en 1997 dans le bassin alors qu'en milieu naturel, cette concentration n'excède pas 0,7 mg N-NO₃/L (Millero et Sohn, 1992). Les nitrates proviennent de l'oxydation des déchets ammoniacaux générés par la faune du mésocosme et ils s'accumulent graduellement dans le milieu. Une telle accumulation dans le bassin aurait été responsable de la mort de plusieurs invertébrés et poissons ainsi que d'infections parasitaires ou bactériennes induites par un affaiblissement du système immunitaire chez ces derniers (Parent et Morin, 2000).

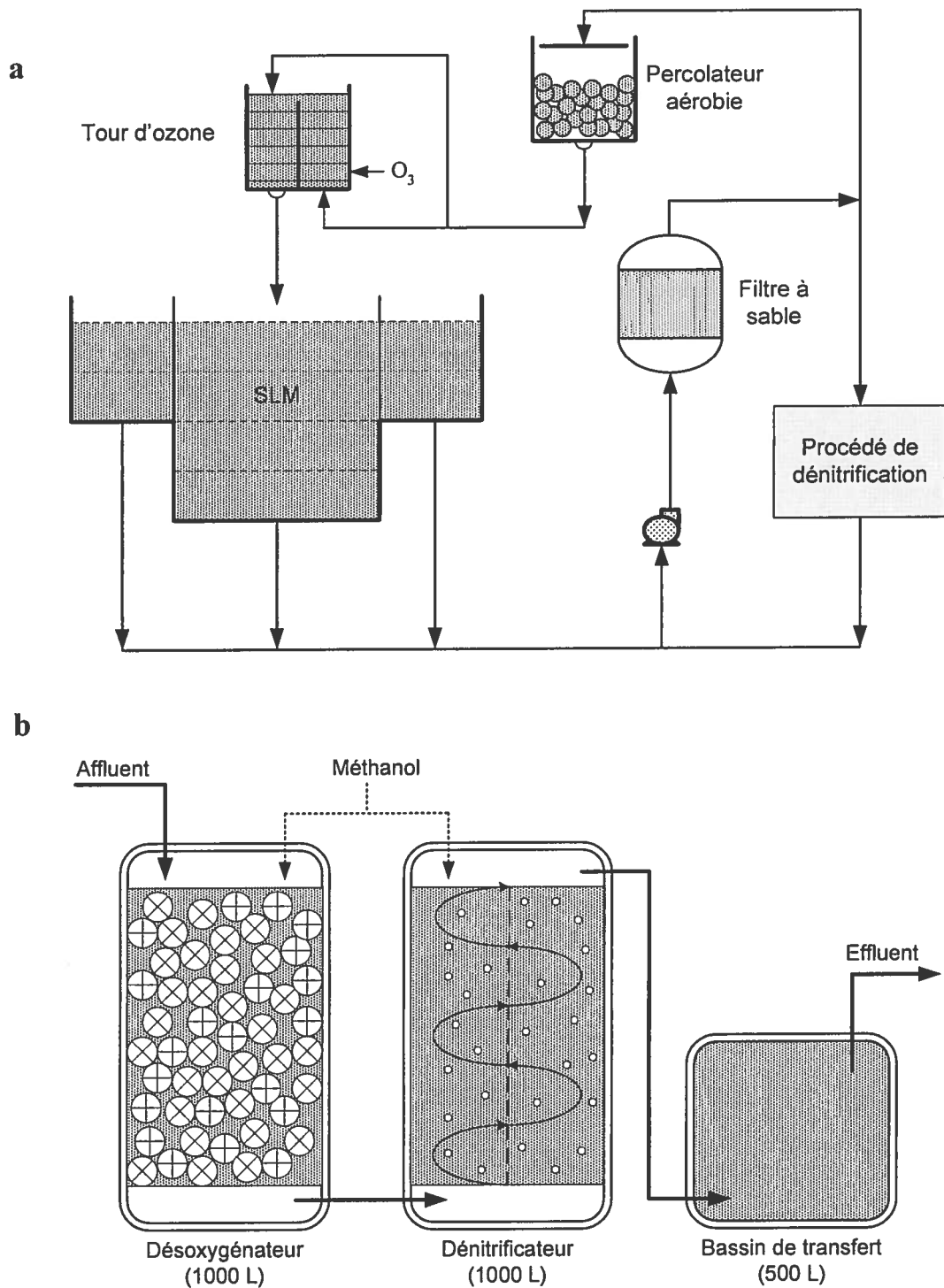


Figure 1.1 Système de filtration principal du Saint-Laurent marin au Biodôme de Montréal. **a.** système de filtration principal. SLM : Saint-Laurent marin. **b.** procédé de dénitrification.

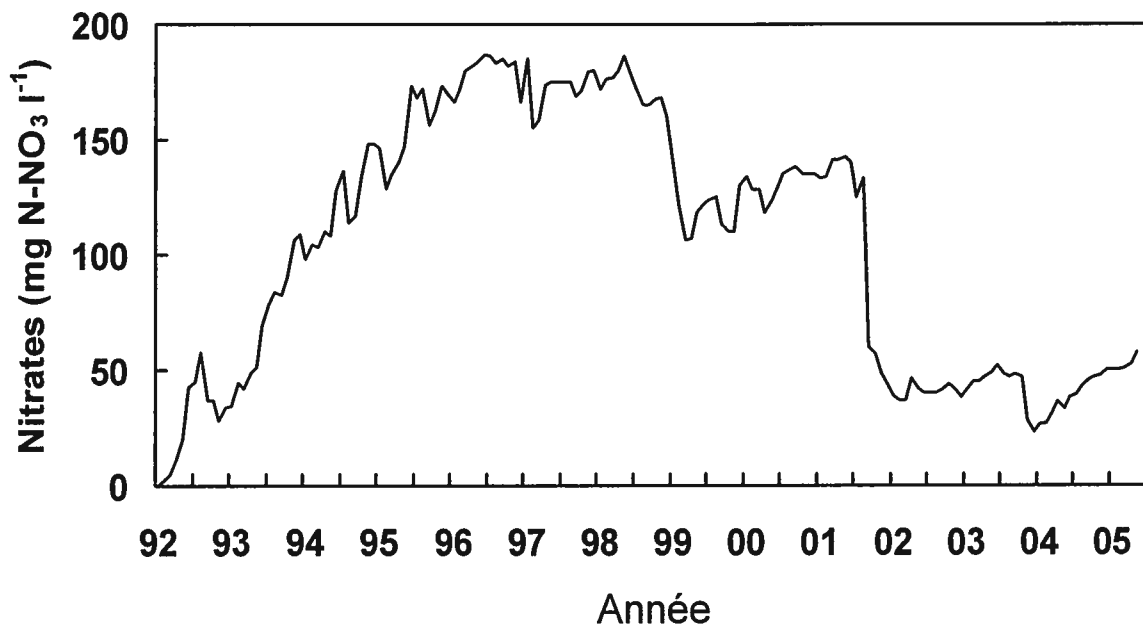


Figure 1.2 Évolution de la concentration en nitrates dans le Saint-Laurent marin (Biodôme de Montréal)

La toxicité des nitrates est reliée entre autres à la réduction *in vivo* des nitrates en nitrites. Ces derniers entraînent la conversion de l'hémoglobine en méthémoglobine, ce qui empêche le transport de l'oxygène dans l'organisme (Cheng et Chen, 2002). Dans la littérature, une concentration maximale de 20 mg N-NO₃/L est recommandée pour la conservation et l'élevage des poissons et des invertébrés en milieu marin (Camargo *et al.*, 2005). Cependant, les lignes directrices émises par Environnement Canada indiquent que la concentration en nitrates dans les milieux marins naturels ne devrait pas excéder 3.61 mg N-NO₃/L pour assurer la protection de la faune incluant les invertébrés les plus sensibles (Environnement Canada, 2003). Plusieurs mesures ont été mises en place par le Biodôme de Montréal pour diminuer les concentrations en nitrates. D'abord la colonie de Fous de Bassan (*Sula bassanus*) fut retirée car les déchets ammoniacaux qu'elle générerait étaient responsables de 33% de l'apport en azote dans le bassin (Parent et Morin, 2000). D'autres mesures quotidiennes telles que la réduction de l'apport en nourriture et le nettoyage manuel du bassin sont également employées. Par contre, ces mesures demeurent insuffisantes à elles seules pour abaisser les concentrations en nitrates à des valeurs acceptables.

1.3 Le procédé de dénitrification

En 1998, le Biodôme de Montréal a fait l'acquisition d'un procédé de dénitrification pour contrer le problème de l'accumulation des nitrates dans le bassin. Comme le montre la figure 1.1a, le procédé de dénitrification est intégré au système de traitement principal du Saint-Laurent marin. Il est constitué de trois cuves soit le désoxygénateur, le dénitrificateur et le bassin de transfert (figure 1.1b). Le désoxygénateur est un percolateur à lit fixe submergé qui permet l'enlèvement de l'oxygène dissous par les microorganismes. Ensuite, l'effluent du désoxygénateur est acheminé vers le dénitrificateur, un réacteur à lit fluidisé dans lequel se produit la dénitrification biologique, c'est-à-dire la transformation des nitrates en azote gazeux par les microorganismes. Le méthanol est ajouté au désoxygénateur et au dénitrificateur à titre de source de carbone. Finalement, l'eau est acheminée vers le bassin de transfert qui a pour fonction la récupération de la biomasse détachée avant le renvoi de l'eau au début de la chaîne de traitement principale du Saint-Laurent marin. Malheureusement, ce procédé n'offre pas le rendement souhaité et la concentration en nitrates demeure à environ 40 mg N-NO₃/L ce qui est supérieur au seuil de toxicité recommandé en milieu marin pour la protection de la faune (Camargo *et al.*, 2005).

1.4 Objectifs du projet de recherche

Les objectifs du projet de recherche se divisaient en deux volets: (I) l'optimisation du procédé de dénitrification et (II) la caractérisation du procédé de dénitrification. Les deux premiers objectifs visaient l'optimisation du procédé de dénitrification par des essais en fioles. Ces objectifs étaient de déterminer (I) l'effet des différents rapports carbone/azote (C/N) sur l'activité de dénitrification et sur la diversité de la flore microbienne du dénitrificateur; et (II) la méthode de conservation adéquate de la biomasse du dénitrificateur. Ensuite, les trois derniers objectifs de ce projet s'inscrivaient dans le second volet et visaient la caractérisation du procédé de dénitrification. Ces objectifs étaient (III) l'étude de l'évolution de la flore microbienne soumise à différentes conditions d'opération du procédé de dénitrification sur des unités pilotes; (IV) la caractérisation des populations de protozoaires du dénitrificateur; et (V) la détermination de l'impact des protozoaires sur l'activité de dénitrification.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 La dénitrification

Plusieurs méthodes existent actuellement pour l'enlèvement des nitrates en milieu aquatique, dont la méthode d'échange ionique, l'osmose inverse et la dénitrification biologique. Cette dernière méthode est très utilisée en raison de sa grande sélectivité pour l'ion nitrate ainsi que pour son coût relativement faible (Mateju *et al.*, 1992). De plus, la dénitrification biologique est une méthode qui s'est montrée efficace dans le passé pour le traitement des eaux salées (Catalan-Sakairi *et al.*, 1996 ; Park *et al.*, 2001 ; Menasveta *et al.*, 2001).

2.1.1 Principe de la dénitrification biologique

La dénitrification biologique en milieu anoxique est un processus respiratoire dans lequel les microorganismes utilisent les oxydes azotés tels que les nitrates et les nitrites comme accepteurs finaux d'électrons dans leur chaîne respiratoire pour générer de l'adénosine 5' trisphosphate (ATP) (Mateju *et al.*, 1992). La dénitrification biologique hétérotrophique implique l'ajout de composés organiques que les microorganismes utilisent comme source d'électrons pour la dénitrification (Mateju *et al.*, 1992). C'est ce type de dénitrification qui est le plus souvent utilisé par les aquariums publics et les industries aquicoles (Balderston et Sieburth, 1976; Grguric *et al.*, 2000; Menasveta *et al.*, 2001; Sauthier *et al.*, 1998). Un autre type de dénitrification biologique est dit autotrophique et il implique l'utilisation d'hydrogène et de composés sulfurés, ammoniacaux ou ferreux, à titre de donneur d'électrons pour la réduction des oxydes azotés (Mateju *et al.*, 1992). Cependant, il a été démontré que la dénitrification autotrophique, utilisant notamment des composés sulfurés à titre de donneur d'électrons, était moins efficace lorsqu'elle était utilisée en eau de mer plutôt qu'en eau douce (Koenig et Liu, 2004).

Comme le montre la figure 2.1, la réaction de dénitrification biologique est réalisée en quatre étapes successives par différentes métalloenzymes (Philippot, 2002). La réduction des nitrates en nitrites génère une molécule d'ATP et elle est effectuée par une enzyme transmembranaire, la nitrate réductase (Zumft, 1997). La conversion des nitrites en oxyde nitrique est assurée par la nitrite réductase, une enzyme périplasmique (Zumft, 1997). Ensuite, la NO réductase, une enzyme également transmembranaire, réduit l'oxyde nitrique en oxyde nitreux (Zumft, 1997). Enfin, la dernière réaction consiste en la réduction de l'oxyde nitreux en azote gazeux par une enzyme périplasmique, la N₂O réductase (Jetten *et al.*, 1997). Cette dernière réaction génère une deuxième molécule d'ATP (Catalan Sakairi *et al.*, 1996).

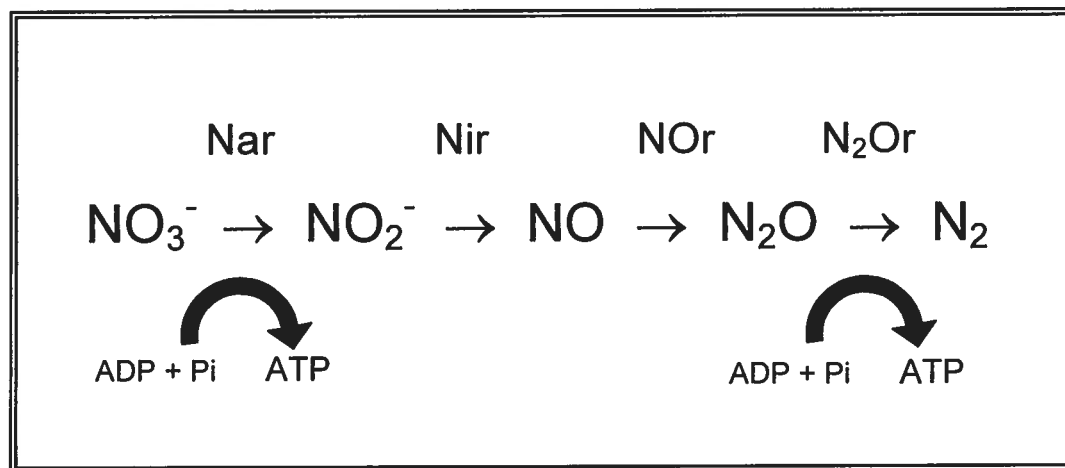


Figure 2.1. Réaction et enzymes de la dénitrification avec la génération de deux molécules d'ATP. Nar: nitrate réductase, Nir: nitrite réductase, NO_r: NO réductase, N₂O_r: N₂O réductase.

2.1.2 Microbiologie de la dénitrification

De nombreux microorganismes capables de dénitrifier ont été isolés en eau douce et parmi ceux-ci une grande majorité sont des bactéries hétérotrophes appartenant aux sous-classes des α et des β -Protéobactéries (Lemmer *et al.*, 1997; Zumft, 1997). Des études en milieu marin ont permis l'identification de bactéries dénitrifiantes faisant aussi partie des sous-classes α , et β des Protéobactéries mais aussi des sous-classes γ et ϵ du même groupe (Catalan Sakairi *et al.*, 1996; Labbé *et al.*, 2003b; Payne, 1981; Tal *et al.*, 2003). Certains genres de bactéries, tels que *Paracoccus* sp. et *Hyphomicrobium* sp., se retrouvent autant dans les procédés de traitement d'eau douce que dans les procédés en eau de mer (Catalan Sakairi *et al.*, 1996; Lemmer *et al.*, 1997; Neef *et al.*, 1996). Ceci témoigne de l'adaptabilité de certains genres microbiens aux différents degrés de salinité dans les milieux aquatiques (Park *et al.*, 2001; Van der Hoek *et al.*, 1987).

Une étude portant sur la caractérisation de la flore microbienne du dénitrificateur du Biodôme de Montréal a permis d'identifier plusieurs espèces capables de dénitrifier telles que *Hyphomicrobium zavarzinii*, *Paracoccus denitrificans* et *Thiomicrospira denitrificans* ainsi qu'une nouvelle espèce capable de réduire le nitrate en nitrite, *Nitratireductor aquibiodomus* (Labbé *et al.*, 2003b; Labbé *et al.*, 2004). De plus, Labbé et ses collaborateurs (2003) ont étudié l'évolution de la colonisation microbienne des supports dans le dénitrificateur et ils ont conclu que la colonisation se faisait sur une période de cinq semaines après quoi la diversité microbienne demeurait inchangée. Également, au cours de cette étude, ils ont constaté que l'espèce *Hyphomicrobium zavarzinii* n'apparaissait qu'à la cinquième semaine de colonisation (Labbé *et al.*, 2003b).

2.1.3 Les facteurs influençant la dénitrification

L'oxygène est un facteur important dans la régulation de la dénitrification car il inhibe celle-ci (Spotte, 1991; Tiedje, 1988). En effet, l'utilisation de l'oxygène par les microorganismes comme accepteur d'électron est beaucoup plus avantageux du point de vue énergétique que l'utilisation des nitrates puisqu'il présente un potentiel d'oxydoréduction plus élevé (Prescott *et al.*, 1995). Par conséquent, lorsque les nitrates et l'oxygène sont

présents dans un milieu, les microorganismes utiliseront préférentiellement l'oxygène pour la production d'énergie. L'oxygène a un impact sur la dénitrification tant au niveau de la synthèse que de l'activité enzymatique et son effet varie selon le genre et l'espèce de bactérie ainsi que selon la concentration en oxygène dans le milieu (Oh et Silverstein, 1999; Tiedje, 1988). Indépendamment du type de microorganisme, l'inhibition de l'activité enzymatique de la N_2O réductase, de la nitrite réductase et de la nitrate réductase se produit à des concentrations d'oxygène différentes soit 2,5 $\mu\text{mole/L}$, 6,5 $\mu\text{mole/L}$ et 11,0 $\mu\text{mole/L}$ respectivement (Tiedje, 1988). L'inhibition de l'une ou l'autre de ces enzymes entraîne l'accumulation d'intermédiaires durant la dénitrification. Oh et Silverstein (1999) ont d'ailleurs observé une telle accumulation d'intermédiaires, notamment des nitrites, lorsque de faibles quantités d'oxygène étaient présentes dans leur réacteur séquentiel en cuvée, employé pour la dénitrification. L'eau de mer du Saint-Laurent marin possède une concentration en oxygène dissous de $8,7 \pm 0,1 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ à l'affluent du procédé de dénitrification, elle doit donc être désoxygénée avant d'entrer dans le dénitrificateur (Labelle *et al.*, 2005).

La littérature rapporte l'existence de certains microorganismes tels que *Paracoccus pantotrophys*, *Alcaligenes faecalis* et *Microvirgula aerodenitrificans* qui ont la capacité de dénitrifier en présence d'oxygène (Otani *et al.*, 2004). Cependant, les taux de dénitrification observés en aérobiose sont si faibles que la dénitrification dans de telles conditions ne serait pas applicable en pratique (Van Loosdrecht et Jetten, 1998). Il est fort probable que la présence d'oxygène entraîne une sélection au niveau de la diversité microbienne puisqu'elle favorise les microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs. On pourrait donc s'attendre à ce que les flores microbiennes soient différentes dans les procédés de dénitrification opérés en continu et dans ceux opérés en cuvée où l'oxygène est présent de façon séquentielle. Cependant aucune étude à ce jour ne traite de cet aspect.

La température est un autre facteur qui influence la dénitrification. Ilies et Mavinic (2001) ont mené une étude portant sur l'effet de la température sur la nitrification et la dénitrification des eaux usées. Ils ont constaté qu'une diminution graduelle de la température de 20°C à 10°C réduisait significativement le taux de dénitrification. Welander et Mattiasson (2003) ont obtenu des résultats similaires avec leur réacteur à lit fluidisé, soit une diminution du taux de dénitrification de 55% lorsque la température passait de 15°C à

3°C. Les microorganismes capables de dénitrifier, tels *Hyphomicrobium* sp. et *Paracoccus denitrificans*, ont des températures de croissance optimales variant de 15°C à 37°C (Holt et Krieg, 1984; Staley *et al.*, 1989). Le dénitrificateur du Biodôme de Montréal maintient une température moyenne de 18,5°C, ce qui est adéquat pour l'activité et la croissance de la flore microbienne dénitrifiante.

Le pH influence également la dénitrification. En effet, un affluent avec un pH inférieur à 7,0 entraîne la diminution de l'activité des enzymes réductases des bactéries dénitrifiantes et en particulier celle de la N₂O réductase (Knowles, 1982). Par conséquent, le taux de dénitrification diminue et une accumulation d'intermédiaire soit l'oxyde nitreux est observée (Knowles, 1982; Welander et Mattiasson, 2003). L'oxyde nitreux est un gaz à effet de serre et une hausse significative de sa concentration dans l'environnement peut entraîner un déséquilibre thermique de l'atmosphère (Baumann *et al.*, 1997). D'autre part, la dénitrification hétérotrophique a l'avantage de générer des ions hydroxydes qui permettent de stabiliser et de maintenir une valeur de pH adéquate, soit entre 7 et 9, lors de la dénitrification (Menasveta *et al.*, 2001).

Le temps de rétention hydraulique (TRH) est un facteur qui peut influencer la dénitrification lorsque cette dernière a lieu dans un réacteur opéré en mode continu comme c'est le cas du dénitrificateur au Biodôme de Montréal. L'effet du (TRH) sur la dénitrification a été étudié en comparant les taux de dénitrification à divers TRH. Mohseni-Bandpi et Elliott (1998) ont conclu que l'efficacité de la dénitrification était proportionnelle au TRH jusqu'à une période de 8,8 heures après quoi l'efficacité se stabilisait. Park et ses collaborateurs (2001) ont observé des résultats similaires, c'est-à-dire une augmentation rapide de l'efficacité de dénitrification entre 2 et 6 heures de rétention hydraulique et ensuite une augmentation beaucoup plus lente jusqu'à un TRH de 12 heures.

La source de carbone employée ainsi que la quantité ajoutée sont des facteurs très importants dans la régulation de la dénitrification hétérotrophique. La prochaine section traite de ces facteurs en détail.

2.2 Les sources de carbone

Lors de la dénitrification biologique, des bactéries, hétérotrophes pour la plupart, métabolisent les composés organiques présents dans le milieu ce qui leur procure une source d'électrons qu'ils utilisent par la suite dans leur chaîne respiratoire pour la production d'ATP (Cervantes *et al.*, 2001; Hallin et Pell, 1998). Une partie du carbone métabolisé est également assimilée pour la croissance de ces bactéries (Constantin et Fick, 1997). Comme démontré à la figure 1.1, l'affluent du système de dénitrification provient des filtres à sable du Saint-Laurent marin. Ces filtres ont pour fonction la rétention des matières en suspension mais aussi la dégradation de la matière organique par la flore microbienne présente (Sauvé, 2000). Ainsi, l'affluent du système de dénitrification est faible en matière organique et ne présente pas une source de carbone suffisante pour la dénitrification, c'est pourquoi une source additionnelle doit être ajoutée.

Les sources de carbone les plus utilisées pour la dénitrification en milieu marin sont l'éthanol et le méthanol (Catalan Sakairi *et al.*, 1996; Grguric *et al.*, 2000; Menasveta *et al.*, 2001; Sauthier *et al.*, 1998). Ces sources de carbone sont employées en milieu marin d'abord parce qu'elles sont très accessibles mais également parce qu'elles sont couramment utilisées dans les procédés de dénitrification en eau douce et elles y sont très efficaces (Aesoy *et al.*, 1998 ; Hallin et Pell, 1998). Quant à la dénitrification appliquée au traitement des eaux usées et de l'eau potable, les sources de carbone utilisées dans les différentes études sont beaucoup plus variées. En plus de l'éthanol et du méthanol, l'acétate et l'acide acétique sont couramment utilisés (Aesoy *et al.*, 1998; Constantin et Fick, 1997; Gomez *et al.*, 2000; Hallin *et al.*, 1996; Mohseni-Bandpi et Elliott, 1998). D'autres sources de carbone plus rarement employées telles que le glucose, l'isopropanol, le propionate de sodium, le glycérol et l'acide lactique permettent aussi la dénitrification (Akunna *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 1994; Karagozoglou *et al.*, 2002; Tam *et al.*, 1994).

Les études qui traitent de la dénitrification avec diverses sources de carbone ne convergent pas toutes vers une même source optimale sans doute en raison des conditions expérimentales qui varient grandement d'une étude à l'autre. Cependant, la plupart favorisent l'utilisation de l'une des sources suivantes, soit le méthanol, l'éthanol, l'acide acétique ou l'acétate (Aesoy *et al.*, 1998; Blaszczyk *et al.*, 1980; Hwang *et al.*, 1994). Il est

également admis dans la littérature que l'éthanol et l'acide acétique (ou l'acétate) entraînent une forte croissance et une adaptation plus rapide de la biomasse ce qui peut être avantageux lors du démarrage d'un système de dénitrification (Christensson *et al.*, 1994; Lemmer *et al.*, 1997; Mohseni-Bandpi et Elliott, 1998; Mycielski *et al.*, 1983). Par contre, l'utilisation de ces sources de carbone peut devenir problématique à long terme en raison du colmatage et de la baisse du taux de dénitrification associés à une croissance excessive de la biomasse (Gomez *et al.*, 2000). Le méthanol est très utilisé malgré le fait qu'il nécessite un long temps d'adaptation car il permet une dénitrification stable et il génère moins de biomasse que l'éthanol et l'acide acétique (ou l'acétate) (Akunna *et al.*, 1993; Gavazza dos Santos *et al.*, 2004; Hallin et Pell, 1998). En fait, seulement un certain nombre d'espèces de bactéries, généralement des méthylotrophes, sont capables d'assimiler les composés à un seul carbone tel le méthanol, ce qui expliquerait la faible production de biomasse générée avec ce type de substrat (Koch et Siegrist, 1997; Lemmer *et al.*, 1997; Lemmer *et al.*, 1997b).

Il est également important de considérer l'aspect économique dans le choix d'une source de carbone. Non seulement le coût et la disponibilité du substrat est à considérer mais aussi les coûts associés à l'élimination de la biomasse et à l'entretien du réacteur dû à la croissance microbienne qui varie selon la source de carbone utilisée (Constantin et Fick, 1997). Le méthanol est reconnu pour être une bonne alternative puisqu'il est normalement moins dispendieux que l'éthanol ou l'acide acétique et il est très accessible (Aesoy *et al.*, 1998; Bilanovic *et al.*, 1999; Koch et Siegrist, 1997).

2.2.1 L'effet du rapport carbone/azote (C/N) sur la dénitrification

En plus du type de source de carbone utilisé, la quantité ajoutée, exprimée en rapport carbone/azote (C/N), a également un impact sur l'activité de dénitrification (Her et Huang, 1995). Le dosage de la source de carbone est crucial puisque dans le cas d'un rapport C/N trop faible ou trop élevé, diverses réactions autres que la dénitrification peuvent donner lieu à la production de composés toxiques pour la flore microbienne dénitrifiante mais aussi pour la faune aquatique du milieu environnant (Lee *et al.*, 2000b). Par exemple, un rapport C/N très élevé est favorable à la réduction dissimilatoire des

nitrate en ammonium (DRNA) ce qui occasionne la production de composés ammoniacaux beaucoup plus toxiques que les nitrates (Gavazza dos Santos *et al.*, 2004; Spotte, 1991). Également la sulfatoréduction peut avoir lieu dans un milieu d'eau de mer artificielle riche en sulfates comme c'est le cas du Saint-Laurent marin au Biodôme de Montréal. Lorsque les nitrates sont totalement épuisés du milieu et qu'une source de carbone est encore disponible, les bactéries sulfatoréductrices utilisent les sulfates comme accepteur final d'électrons (Balderston et Sieburth, 1976). Il en résulte la production de composés toxiques tel que le sulfure d'hydrogène (Mekonen *et al.*, 2001; Spotte, 1979). La toxicité de ces composés envers la flore microbienne dénitrifiante a, par le fait même, un impact négatif sur la dénitrification (Leta *et al.*, 2004). À l'opposé, un rapport C/N trop faible conduit à une dénitrification incomplète et à l'accumulation d'intermédiaires potentiellement toxiques tels que les nitrites et l'oxyde nitreux (Alonso et Camargo, 2003; Gavazza dos Santos *et al.*, 2004; Her et Huang, 1995).

Puisque le rapport C/N idéal diffère d'une source de carbone à une autre, il est possible de déterminer le dosage adéquat par la stoechiométrie. Le tableau 2.1 présente les équations stoechiométriques ainsi que les rapports C/N théoriques disponibles pour le méthanol, l'éthanol et l'acide acétique. Cependant, ces équations ne tiennent pas compte de la quantité de carbone utilisée par la biomasse pour la croissance. En pratique, les rapports C/N optimaux sont de 25 à 30% supérieurs aux valeurs théoriques dû à la croissance microbienne (Constantin et Fick, 1997; Gomez *et al.*, 2000; Mateju *et al.*, 1992). La quantité de carbone ajoutée est d'autant plus élevée dans les systèmes opérés en cuve en raison de la présence séquentielle d'oxygène dissous. (Fuchs *et al.*, 1997).

Source de carbone	Équation stoechiométrique	Rapport C/N
ETOH	$5 \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH} + 12 \text{ NO}_3^- + \rightarrow$ $10 \text{ HCO}_3^- + 9 \text{ H}_2\text{O} + 6 \text{ N}_2 + 2 \text{ OH}^-$	0,71
MEOH	$5 \text{ CH}_3\text{OH} + 6 \text{ NO}_3^- \rightarrow$ $3 \text{ N}_2 + 5 \text{ CO}_2 + 7 \text{ H}_2\text{O} + 6 \text{ OH}^-$	0,71
Acide acétique	$5 \text{ CH}_3\text{COOH} + 8 \text{ NO}_3^- \rightarrow$ $8 \text{ HCO}_3^- + 6 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ N}_2 + 2 \text{ CO}_2$	1,03

Tableau 2.1 : Équations stoechiométriques et rapports carbone/azote (C/N) théoriques pour la dénitrification avec l'éthanol, le méthanol et l'acide acétique à titre de substrat selon Mateju et ses collaborateurs (1992).

2.2.2 L'effet de la source de carbone sur la diversité microbienne

Lors du développement d'un biofilm dénitrifiant, certaines espèces sont favorisées tout dépendant de la source de carbone utilisée (Blaszczyk *et al.*, 1980; Spotte, 1991). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que dans les procédés de dénitrification biologique où le méthanol était employé comme source de carbone, *Hyphomicrobium* sp. et *Paracoccus denitrificans* étaient favorisés et devenaient les espèces dominantes dans le consortium microbien (Akunna *et al.*, 1993; Blaszczyk, 1983; Timmermans et Van Haute, 1983). Ceci serait dû à leur capacité métabolique spécialisée pour l'assimilation des composés organiques à un carbone (Claus et Kutzner, 1985; Lemmer *et al.*, 1997b; Tiedje, 1988). Ces deux espèces sont souhaitables dans les procédés de dénitrification car elles peuvent accomplir la réduction des nitrates en azote gazeux alors que d'autres espèces réduisent seulement les nitrates en nitrites (Jetten *et al.*, 1997; Staley *et al.*, 1989; Tiedje, 1988). D'autre part, les sources de carbone telles que le glucose et le sucrose sont défavorables à la dénitrification puisqu'elles stimulent la croissance des bactéries fermentaires au détriment des bactéries dénitrifiantes (Blaszczyk *et al.*, 1980). Dans le même sens, Gómez et ses collaborateurs (2000) ont montré que la proportion de bactéries dénitrifiantes dans le biofilm était plus importante lorsque le méthanol ou l'éthanol étaient

utilisés par rapport à la proportion observée lorsque le sucrose était ajouté comme source de carbone. De plus, les sucres favorisent la production d'exopolysaccharides (Gomez *et al.*, 2000). Ceci provoque un épaississement important du biofilm et par conséquent la diminution du taux de dénitrification due à une mauvaise diffusion des substrats (Gomez *et al.*, 2000). Dans les systèmes où une biomasse dénitrifiante est bien établie, une source de carbone permettant un taux de croissance limité est souhaitée.

2.3 Les biofilms

Un biofilm est défini comme étant un assemblage de cellules bactériennes entre elles et/ou avec des surfaces ou des interfaces, et ces dernières sont incluses dans une matrice (Costerton *et al.*, 1995). Le biofilm constitue une niche écologique pour les bactéries et il procure plusieurs avantages pour celles-ci tels la protection contre la dessiccation, les agents anti-microbiens et contre les prédateurs (Donlan, 2002; Branda *et al.*, 2005). Le biofilm est principalement formé de bactéries mais aussi d'une diversité de microorganismes comme les protozoaires, les champignons, les levures et les algues (Costerton *et al.*, 1995). Un biofilm peut également être constitué d'une seule espèce de bactéries comme c'est le cas du biofilm formé de *Staphylococcus* sp. qui contamine les équipements médicaux (Donlan, 2002). La matrice du biofilm est surtout composée d'exopolysaccharides (EPS) sécrétés par les bactéries. D'autres éléments sont retrouvés dans la matrice tels des protéines, de l'ADN extracellulaire et des cellules mortes. Enfin le biofilm est constitué de 50 à 90% d'eau (Costerton *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1999). La structure du biofilm est formée de canaux, de façon à favoriser la circulation des nutriments et l'évacuation des déchets métaboliques. La formation et la dynamique du biofilm sont directement influencées par les conditions environnantes. Par exemple, la nature du substrat sur lequel le biofilm se forme, l'hydrodynamique, le pH, la température et les nutriments ont un impact sur le développement du biofilm (Donlan, 2002). Les microorganismes qui composent le biofilm ont également un impact sur la structure et la dynamique de ce dernier. D'abord, les propriétés de la cellule tels la présence de fimbriaes, de flagelles, de lipopolysaccharides (LPS) et d'adhésines à la surface cellulaire ont un impact sur l'attachement des bactéries entre elles ou à une surface (Donlan, 2002). Enfin, la formation et la dynamique du biofilm sont grandement influencées par des signaux

extracellulaires qui font partie d'un mécanisme de communication intercellulaire entre les bactéries, appelé quorum-sensing (Parsek et Greenberg, 2005)

Les biofilms étant ubiquitaires, un grand intérêt est porté à l'étude de ces derniers, puisqu'ils peuvent être nuisibles pour la santé humaine mais dans d'autres cas, ils sont très utiles notamment dans les procédés de décontamination de l'air, du sol et de l'eau (Donlan, 2002; Cox et Deshusses, 1999; Horan, 1990; Morgan et Watkinson, 1989). Dans les procédés de traitement des eaux usées, c'est-à-dire le traitement des rejets domestiques et industriels, les biofilms utilisés se présentent sous forme de flocs bactériens, nommés boues activées. Dans d'autres types de procédés pour le traitement des eaux usées, tels les réacteurs à lit fluidisé et les percolateurs, les biofilms sont fixés sur un substrat (Horan, 1990). Les biofilms sont également présents dans les procédés anaérobies. Par exemple, des réacteurs à boues granulaires sont utilisés pour la décontamination d'effluents pollués. Ce type de biofilm est sous forme de granules et il est composé de plusieurs espèces anaérobies tels des bactéries fermentaires, acétogènes et méthanogènes (FAO, 1997). Dans les procédés de dénitrification, les biofilms se développent en condition d'anoxie et le consortium bactérien est surtout composé de bactéries hétérotrophes appartenants aux sous-classes des α et β -Protéobactéries (Lemmer *et al.*, 1997; Zumft, 1997).

2.4 Les protozoaires du dénitrificateur

Des observations microscopiques préliminaires ont permis de constater la présence d'une grande diversité de protozoaires, notamment des ciliés, dans le bassin du Saint-Laurent marin ainsi que dans le procédé de dénitrification biologique. Ceci n'est pas inattendu puisque les protozoaires sont des intermédiaires primordiaux dans la chaîne trophique des différents écosystèmes (Beaver et Crisman, 1989; Fenchel, 1986). De plus, les protozoaires sont d'importants consommateurs de bactéries que l'on retrouve dans les biofilms ou en suspension (Fried et Lemmer, 2003). La présence de protozoaires dans les systèmes de dénitrification ou dans les systèmes de traitement d'eau est bien documentée (Curds, 1982; Lee *et al.*, 2004; Luna-Pabello *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 1998; Martin-Cereceda *et al.*, 2002).

2.4.1 Taxonomie et classification des protozoaires

La taxonomie des protozoaires est en constante évolution depuis la toute première classification de Bütschli en 1880. Cette classification était basée uniquement sur les observations faites en microscopie sur fond clair et elle divisait les protozoaires en quatre groupes soit les flagellés (Mastigophora), les amibes (Sarcodines), les ciliés (Ciliophora) et les sporozoaires (Lee *et al.*, 2000a). Depuis environ 40 ans, une nouvelle taxonomie basée sur l'observation de l'ultrastructure de la cellule à l'aide de la microscopie électronique a permis une classification beaucoup plus consistante que les précédentes (Patterson, 1999). La venue de la biologie moléculaire a eu pour effet d'apporter plus d'informations à la classification ultrastructurale et ainsi former des lignées. Les lignées tiennent compte de l'aspect phylogénétique et elles rassemblent les groupes de protistes et d'eucaryotes pour lesquels il n'existe pas de groupes-frères (groupes partageants le même ancêtre commun) (Patterson, 1999). En considérant ceci, le terme «protozoaire» n'est plus adéquat au sens de la taxonomie car il ne consiste pas en lui seul un groupe monophylétique (groupe comprenant un ancêtre hypothétique et tous ses descendants) (Lee *et al.*, 2000a). Il est donc plus approprié de parler des protistes comme un groupe d'eucaryotes paraphylétique (groupe comprenant un ancêtre hypothétique mais avec une partie de ses descendants seulement) plutôt que de protozoaire (Patterson, 1999). Le terme «protozoaire» et les bases de la taxonomie de Bütschli qui s'y rattachent sont encore aujourd'hui très évoquées car elles facilitent la transition vers la nouvelle taxonomie ultrastructurale et phylogénétique. Ce terme sera d'ailleurs utilisé dans les sections suivantes de ce mémoire.

Les protistes sont répartis à ce jour dans 75 lignées d'eucaryotes parmi lesquelles les alvéolobiontes, les straménopiles, les euglénobiontes et les opisthochontes sont des lignées majeures (Lee *et al.*, 2000a). Cependant environ 220 genres de protistes ont été décrits mais leur affiliation phylogénétique demeure incertaine (Patterson, 1999, pour la liste exhaustive). Ainsi, les straménopiles forment un groupe très diversifié comprenant des algues, et des organismes avec un ou plusieurs flagelles. Les protistes flagellés appartenant au groupe des straménopiles ont tous des poils tubulaires sur leurs flagelles appelés mastigonèmes (Patterson, 1999). Les alvéolobiontes se distinguent entre autres par la présence de sacs alvéolaires liés à la membrane qui servent notamment de réservoirs

calciques (Lecointre et Le Guyader, 2001). Les alvéolobiontes comprennent trois groupes majeurs soit les ciliés, les apicomplexés (comprenant certains parasites tels que *Plasmodium* sp. et *Toxoplasma* sp.) et les dinoflagellés (Lecointre et Le Guyader, 2001). Les euglénobiontes regroupent des protistes flagellés notamment les kinétoplastides, les euglénophytes et des pseudociliés tel *Stephanopogon apogon* (Lecointre et Le Guyader, 2001). Les opisthochontes comprennent les protistes apparentés aux champignons soit les chytrides ainsi que les protistes apparentés aux animaux tels que les choanoflagellés. Ces protistes sont habituellement flagellés à au moins un stade de leur vie (Patterson, 1999).

2.4.2 Diversité des protozoaires

Des études récentes utilisant la biologie moléculaire pour caractériser la diversité eucaryotique dans les divers milieux ont permis la découverte d'une multitude de microorganismes très divergents, du point de vue phylogénétique, à l'ensemble des eucaryotes connus (Dawson et Pace, 2002; Diez *et al.*, 2001b; Gast *et al.*, 2004; Stoeck et Epstein, 2003; Stoeck *et al.*, 2003). Ceci démontre que malgré les deux siècles d'identification et de caractérisation par les traits morphologiques, nos connaissances sur l'ensemble de la diversité des protistes demeurent restreintes.

Quoique la plupart des protozoaires soient très versatiles, plusieurs facteurs du milieu environnant auront un impact sur leur diversité et leur abondance. Par exemple, le mode d'opération d'un procédé biologique de traitement de l'eau peut influencer la diversité des protozoaires (Luna-Pabello *et al.*, 1996). Dans un procédé opéré en continu, c'est-à-dire un procédé où l'entrée et la sortie de l'eau sont continues, on retrouve surtout des protozoaires mobiles qui nagent dans le milieu ou qui se déplacent à la surface du biofilm. Par contre, lorsque le procédé est opéré en cuvée, soit le traitement discontinu de l'effluent, les protozoaires qui s'attachent au biofilm sont favorisés tels que les pérित्रiches ou les choanoflagellés (Fried et Lemmer, 2003; Luna-Pabello *et al.*, 1996). Également, la quantité d'oxygène dissous influence la diversité des protozoaires. Ainsi dans un système anaérobie ou très pauvre en oxygène, des protozoaires anaérobies facultatifs ou obligés tels que *Metopus* sp., *Plagiopyla* sp. et *Caenomorpha* sp. sont fréquemment observés (Stoeck et Epstein, 2003). D'autres facteurs peuvent influencer la

diversité des protozoaires tels que la température, la quantité de matière organique dissoute, la salinité, le pH et la luminosité (Luna-Pabello *et al.*, 1996).

Les milieux marins anoxiques semblent très prometteurs pour la découverte de nouveaux protozoaires. En effet, les quelques études moléculaires portant sur la diversité dans ces milieux révèlent la découverte d'un grand nombre de nouveaux protozoaires s'apparentant entre autres aux groupes des straménopiles et des alvéolobiontes (Stoeck et Epstein, 2003; Stoeck *et al.*, 2003). Les sédiments marins sont constitués d'une grande diversité de protozoaires faisant partie des lignées des straménopiles, des alvéolobiontes, des euglénobiontes, et des opisthochontes (Stoeck et Epstein, 2003; Stoeck *et al.*, 2003). De façon plus précise, les flagellés y sont très abondants notamment les choanoflagellés, les dinoflagellés et les cryptomonades (Alongi, 1986; Stoeck et Epstein, 2003). Le plancton marin est également constitué d'une grande diversité de flagellés et d'organismes photosynthétiques en plus des ciliés et même des protistes s'apparentant aux champignons (Diez *et al.*, 2001a; Fenchel, 1986; Gast *et al.*, 2004).

Les protozoaires ont également été observés dans des mésocosmes marins similaires à celui du Biodôme de Montréal. Le mésocosme de l'Aquarium National de Baltimore, représentant l'estuaire de la baie de Chesapeake, abrite une grande diversité de protozoaires. Plus de soixante-quinze espèces de protozoaires appartenant aux groupes des ciliés (alvéolobiontes), des flagellés (straménopiles, euglénobiontes, cryptomonades,), des choanoflagellés (opisthochontes) et à divers groupes amiboïdes (eutamoebidae, pélobiontes) ont été identifiés par microscopie (Adey et Loveland, 1998). Cependant, aucune étude n'a été réalisée à ce jour dans un procédé de dénitrification en milieu marin et en condition d'anoxie constante comme c'est le cas au Biodôme de Montréal.

Par ailleurs, la diversité des protozoaires a été très étudiée dans les procédés de traitement des eaux usées (Curds, 1982; Fried et Lemmer, 2003; Horan, 1990; Madoni, 1994; Sudo et Aiba, 1984). Dans ces procédés, plusieurs groupes de protozoaires sont présents, mais dans tous les cas ce sont les ciliés qui dominent en nombre et en espèces. Étonnamment, il existe de nombreux protozoaires communs aux procédés de traitement des eaux usées et aux environnements marins. Par exemples les ciliés *Euplotes* sp. et *Vorticella* sp. ont été observés autant dans le bassin anoxique Cariaco de la mer des

Caraïbes que dans les boues activées d'un réacteur pour le traitement des eaux usées (Fried et Lemmer, 2003; Stoeck *et al.*, 2003). Luna-Pabello et ses collaborateurs (1996) ont étudié la diversité des ciliés dans un réacteur séquentiel en cuvée pour l'enlèvement de l'azote dans les eaux usées. Lors de cette étude, des observations microscopiques ont révélé la présence de 16 espèces différentes distribuées dans les classes de ciliés suivantes: Oligohymenophorea, Nassophorea, Litostomatea, Spirotrichea, Phyllopharyngea et Hymenostomata. Des protozoaires autres que les ciliés ont été observés dans d'autres procédés de traitement des eaux usées notamment *Bodo* sp. et *Rhynchomonas* sp., deux euglénobiontes, ainsi que des eutamoebidaes (Horan, 1990).

2.4.3 Les protozoaires des milieux anoxiques et anaérobiques

De façon générale, les milieux anoxiques se distinguent des milieux aérobiques par l'utilisation du nitrate au lieu de l'oxygène comme accepteur d'électrons pour la production d'énergie et la croissance microbienne. Dans les milieux anaérobiques, d'autres accepteurs d'électrons sont utilisés par les microorganismes tels le sulfate et le CO₂ (Sawyer et al, 1994). Les protozoaires vivant dans les milieux anoxiques ou anaérobiques ont développé des stratégies pour s'adapter à leur environnement. D'abord, certains d'entre eux possèdent des organites appelés hydrogénosomes qui permettent l'utilisation de l'hydrogène comme accepteur final d'électrons dans leur chaîne respiratoire pour la production d'énergie (Hackstein *et al.*, 1999). Ces organites sont répandus chez les mycètes mais ils ont également été observés chez des flagellés parabasaliens et des ciliés anaérobiques soit *Trichomonas vaginalis* et *Nyctotherus ovalis* respectivement (Hackstein *et al.*, 1999). De plus, les protozoaires possédant des hydrogénosomes partagent une relation endosymbiotique avec des bactéries méthanogènes (Fenchel et Ramsing, 1992; Van Hoek *et al.*, 2000). Ces dernières utilisent l'hydrogène moléculaire issu des hydrogénosomes pour la production d'énergie via la réduction du dioxyde de carbone (Van Hoek *et al.*, 2000). Les ciliés hôtes, quant à eux, bénéficient de la baisse de pression en hydrogène pour assurer le bon fonctionnement de leurs hydrogénosomes (Van Hoek *et al.*, 2000).

D'autre part, certains protozoaires microaérophiles ou aérobiques, notamment des ciliés, ont développé des relations symbiotiques avec d'autres eucaryotes ce qui leur permet d'habiter des environnements anoxiques (Finlay *et al.*, 1996). Une relation

endosymbiotique très fréquente chez les ciliés microaérophiles est celle avec des organismes photosynthétiques tels que les microalgues (Finlay *et al.*, 1996). Les endosymbiontes photosynthétiques contribuent à combler les besoins en oxygène de leur hôte tout en bénéficiant d'une source de nutriments issus du métabolisme du protozoaire pour la production d'énergie et la croissance (Duval et Margulis, 1995; Finlay *et al.*, 1996).

2.5 Les rôles des protozoaires

Les protozoaires sont reconnus pour avoir un impact bénéfique dans l'ensemble des procédés de traitement de l'eau (Horan, 1990). Une seule étude rapporte d'un effet direct des protozoaires sur la dénitrification. En effet, il a été montré que des protozoaires très primitifs du genre *Loxodes* sp. possèdent une activité de nitrate réductase ce qui leur confère la capacité de réduire les nitrates en nitrites dans les milieux anoxiques (Finlay *et al.*, 1983). Cependant, la plupart des études attribuent des effets indirects aux protozoaires sur l'ensemble des procédés biologiques pour le traitement de l'eau (Fried et Lemmer, 2003; Luna-Pabello *et al.*, 1996; Madoni, 1994; Ratsak *et al.*, 1994; Sudo et Aiba, 1984).

2.5.1 L'effet des protozoaires sur la production de biomasse

Un des rôles associés aux protozoaires et plus particulièrement aux ciliés, est le contrôle de la production de biomasse par la prédation (Ratsak *et al.*, 1994; Sudo et Aiba, 1984). La production excessive de biomasse est un problème souvent associé aux procédés biologiques de dénitrification car elle entraîne une diminution de l'efficacité des réacteurs ainsi que l'augmentation des coûts liés à l'entretien de ces derniers (Constantin et Fick, 1997). La plupart des ciliés et plusieurs autres genres de protozoaires s'alimentent des bactéries présentes dans le milieu environnant (Fried et Lemmer, 2003). Ce faisant, les protozoaires contribuent à augmenter la capacité métabolique du consortium microbien en maintenant ce dernier dans une phase de croissance exponentielle (Curds, 1982).

2.5.2 L'effet des protozoaires sur la dynamique du biofilm

D'autres avantages à la présence des protozoaires dans les procédés biologiques sont liés à la dynamique du biofilm. Fried et Lemmer (2003) ont étudié le rôle des ciliés dans des procédés pour le traitement des eaux usées. Ils ont observé que les flux

hydrauliques occasionnés par le mouvement des ciliés favorisaient la diffusion des substrats et des nutriments à l'intérieure du biofilm. Ces mêmes auteurs ont également observé que les ciliés tels que *Epistylis* sp., *Opercularia* sp. et *Carchesium* sp. contribuaient à structurer le biofilm puisque la hampe de ces protozoaires procurait un site de croissance pour les autres microorganismes (Fried et Lemmer, 2003). De plus la formation du biofilm serait favorisée par la sécrétion de polysaccharides dans le milieu par certaines espèces de protozoaires tel que *Paramecium caudatum* (Curds, 1982). Ces polysaccharides favoriseraient la formation d'agrégats avec les particules en suspension et permettraient ainsi l'attachement et la croissance des microorganismes (Curds, 1982).

2.5.3 Les protozoaires comme bio-indicateurs

Les protozoaires sont également reconnus comme des bio-indicateurs puisqu'ils réagissent aux changements de conditions dans un milieu (Madoni, 1994). Fried et ses collaborateurs (2000) ont constaté une variation de la diversité au sein de la population de protozoaires dans leurs bancs d'essais pour le traitement des eaux usées lorsqu'ils variaient les conditions d'opération. De façon plus précise, dans une étude sur les communautés de protozoaires dans un procédé de traitement des eaux usées, Lee et ses collaborateurs (2004) ont associé la présence de *Carchesium* sp. à une faible quantité d'oxygène dissous. Toujours dans le traitement des eaux usées, Martin-Cereceda et ses collaborateurs (2002) ont observé que la présence et l'abondance de *Litonotus crystallinus* et d'*Acineria uncinata* étaient associées à une faible concentration de matière organique dans l'affluent et que la présence de *Metopus* sp. était accrue lors d'une concentration élevée en matière organique. Puisque l'efficacité d'un procédé de traitement des eaux usées est directement reliée à l'état des boues activées, Madoni (1994) a proposé un index biologique pour évaluer la qualité de ces dernières, basé sur l'identification de un ou plusieurs groupes dominants de protozoaires. Par exemple il a observé que la présence dominante de petits flagellés hétérotrophiques tels que *Bodo* sp., et *Polytoma* sp. dans un biofilm mature était associée à une forte concentration de matière organique et à de faibles concentrations en oxygène dissous (Madoni, 1994). L'observation microscopique des populations de protozoaires est donc un moyen simple de détecter des anomalies au niveau des procédés de traitement des eaux et d'évaluer sommairement la qualité de l'effluent traité (Sudo et Aiba, 1984).

2.5.4 L'effet des protozoaires sur les matières en suspension

Une étude sur des unités pilotes pour le traitement des eaux usées a permis de constater l'effet des protozoaires sur la qualité des effluents (Curds *et al.*, 1968). Les résultats de cette étude montrent que la présence des protozoaires a pour effet de diminuer les bactéries en suspension ainsi que l'ensemble des matières en suspension ce qui améliore la qualité de l'effluent. Le rôle des protozoaires dans la clarification des effluents a également été rapporté ailleurs dans la littérature (Horan, 1990; Sudo et Aiba, 1984).

2.5.5 L'effet des protozoaires sur la minéralisation

Certains protozoaires sont saprozoïques, c'est-à-dire qu'ils se nourrissent de matière organique dissoute (Horan, 1990). Ils contribuent donc de cette façon à augmenter la minéralisation du carbone dans le milieu (Curds *et al.*, 1968; Ratsak *et al.*, 1996). Cependant, ceci s'applique seulement lorsque le rapport C/N est élevé et qu'il n'y a pas de compétition pour la source de carbone avec le consortium microbien car ce dernier a plus d'affinité pour l'assimilation du carbone à des rapports C/N faibles (Horan, 1990). La présence des protozoaires dans les biofilms ou dans les boues activées augmente la minéralisation de façon indirecte en stimulant l'activité microbienne. D'abord, la prédation exercée par les protozoaires sur la flore microbienne assure le maintien de cette dernière dans une phase de croissance exponentielle, et par le fait même induit une activité métabolique maximale pour la minéralisation microbienne des substrats et des nutriments dans l'environnement (Curds *et al.*, 1968). Ensuite, les protozoaires sécrètent des nutriments, issus de leur métabolisme, facilement assimilables par les bactéries pour la production d'énergie et la croissance (Ratsak *et al.*, 1996). Aussi, les protozoaires sécrètent des facteurs de croissance tels les co-enzymes, les acides aminés et les vitamines, qui ont pour effet de stimuler la croissance et l'activité métabolique des bactéries (Ratsak *et al.*, 1996).

2.6 La conservation d'un consortium microbien

Il existe plusieurs méthodes pour la conservation des microorganismes et celles-ci diffèrent selon le temps de préservation et l'espèce à conserver (Gerhardt *et al.*, 1981). Les méthodes de conservation à court terme, comme par exemple le repiquage, ou tout autres

méthodes qui nécessitent la culture des microorganismes, sont inadéquates dans le cas d'un consortium microbien. En effet, de nombreuses espèces d'un consortium ne peuvent être cultivées en laboratoire et la mise en culture de ce dernier diminue grandement la diversité microbienne (Yoshie *et al.*, 2001). Une méthode alternative pour la conservation d'un consortium à court et à long terme est la congélation. Le principe de cette méthode est basé sur le fait que lorsque l'eau dans un milieu gèle, elle n'est plus disponible pour la croissance et l'activité métabolique des microorganismes (Kirsop et Snell, 1984). Les cellules demeurent ainsi dans un état de dormance jusqu'à ce que le milieu soit réhydraté. Cependant des dommages peuvent être causés à la cellule lors de la congélation soit par l'augmentation de la concentration d'électrolytes suite à la transformation de l'eau en glace ou par la formation de cristaux de glace qui perforent la membrane des cellules (Kirsop et Snell, 1984). Pour contrer l'endommagement des cellules, des agents cryoprotectants peuvent être ajoutés avant la congélation. Il existe deux types de cryoprotectants soit ceux qui pénètrent la cellule et offre une protection intra et extracellulaire tels le glycérol et le diméthylsulfoxyde (DMSO), et ceux qui offrent seulement une protection externe à la cellule tels le glucose, le sucrose et le mannitol (Gerhardt *et al.*, 1981). La congélation à des températures de -140°C à -196°C avec l'azote gazeux et liquide respectivement est la méthode donnant les meilleurs résultats quant à la viabilité des cellules et à la diversité d'organismes pouvant être conservés ainsi (Kirsop et Snell, 1984). Cependant cette méthode demande plus de préparation avant la congélation et l'équipement nécessaire est dispendieux (Gerhardt *et al.*, 1981; Kirsop et Snell, 1984). Par contre, la congélation à -20°C ou à -80°C avec des cryoprotectants est couramment utilisée pour la conservation des cellules à plus court terme.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Milieux de culture pour les essais en fioles

Lors des essais en fioles, les conditions présentes dans le dénitrificateur ont été reproduites. Le milieu utilisé a été fait à partir d'un mélange de sels «Instant Ocean® salt mix» (Aquarium systems, Mentor, OH, É-U) à raison de 30 g/L, de 18 mg/L de P-KH₂PO₄ et d'un mélange de métaux en traces, soit, 180 µg/L de Fe-FeSO₄.7H₂O, 10 µg/L de Cu-CuSO₄.5H₂O et 82 µg/L Mn-MnSO₄.4H₂O (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U). À cette solution ont été ajoutés 300 mg N-NaNO₃/L (Fisher Scientific). La solution a été distribuée à raison de 200 mL dans des fioles de 250 mL. Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes puis ils ont été refroidis à la température de la pièce. Les milieux ont ensuite été barbotés sept minutes à l'hélium pour enlever l'oxygène dissous. Le méthanol (VoPac, Richmond, BC, Canada) a été ajouté à titre de source de carbone dans un rapport C/N de 0,5 à 2,0 g de carbone/g d'azote selon l'expérience. L'ajustement du pH n'a pas été nécessaire avant le début des essais puisqu'il était à 8,0 ce qui correspond au pH dans le dénitrificateur à grande échelle. L'inoculation des milieux de culture a été fait à partir de la biomasse en suspension homogénéisée du bassin de transfert du système de dénitrification. Ensuite, 15 mL de cette biomasse ont été ajoutés à chaque milieu. Lorsque les supports du dénitrificateur de type «Bioflow 9 mm» (Rauschert, Steinwiessen, Allemagne) ont été utilisés pour inoculer les fioles, 60 supports ont été ajoutés à chaque fiole. Ces supports de polyéthylène ont une surface totale de 855 m²/m³ et une densité de 1,02 (http://www.rauschertus.com/process_technologies/biological.html). Les essais en fioles ont été réalisés en triplicata et ils se sont échelonnés sur une période variant entre 96 à 136 heures, selon l'expérience. Tout au long des essais, les fioles ont été agitées sur une plaque agitatrice à une vitesse de 150 RPM et ce à une température constante de 24°C.

Le milieu utilisé pour l'étude de l'impact des protozoaires sur la dénitrification a été fait en quadruplicata à partir de 400 mL d'eau du dénitrificateur filtrée sur une membrane en cellulose de 0,22 µm (Fisher Scientific) et recueillie dans des fioles stériles de 500 mL. Le milieu a été additionné de nitrate de sodium (Fisher Scientific) à raison de 2000 mg N-NaNO₃/L puis il a été barboté avec un mélange de gaz composé de 80% d'azote et de 20% d'hydrogène. Le méthanol (Fisher Scientific) a ensuite été ajouté dans un rapport C/N de 2,0 mg C-CH₃OH/mg N-NaNO₃. Lorsqu'il était nécessaire d'ajouter des inhibiteurs

d'eucaryotes pour les expériences, 250 mg/L de cycloheximide et 125 mg/L de nystatine (Sigma, St-Louis, MO, É-U) ont été ajoutés aux milieux. Le premier inhibiteur agit sur la synthèse protéique des eucaryotes alors que le second est un anti-fongique. L'inoculation des milieux a été fait à partir des supports colonisés de type «Tri-Pack 1» (Jaeger Inc., Houston, TX, É-U) provenant du dénitrificateur. Ces supports sphériques fait de polyéthylène ont un diamètre de 2,5 cm, une densité de 0,89 et une surface totale de 279 m²/m³ (Jaeger Tri-Packs product bulletin 600, <http://www.jaeger.com>). Cinq supports ont été ajoutés dans chaque fiole.

3.2 Échantillonnage de la biomasse des unités pilotes, du dénitrificateur et des fioles

Au cours des différentes expériences, l'échantillonnage de la biomasse a été réalisé pour faire le suivi de la diversité et de la croissance de la flore microbienne. L'échantillonnage dans les unités pilotes a été effectué en prélevant au hasard trois supports colonisés de type «Tri-Pack 1» (Jaeger Inc.). Ces supports ont été déposés dans 100 mL d'eau provenant des unités pilotes et le tout a été agité fortement à l'aide d'un barreau magnétique pendant 5 minutes. Après avoir retiré les supports, la biomasse en suspension a été centrifugée à 13 000 x g pendant 5 minutes. Le surnageant a été retiré et remplacé par 1 mL de tampon TEN (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 150 mM à pH 8,0). Les échantillons de biomasse ont été congelés à -20°C jusqu'au moment de l'extraction de l'ADN génomique.

L'échantillonnage de la biomasse du dénitrificateur a été fait en prélevant trois à cinq supports colonisés de type «Bioflow 9 mm» (Rauschert). La biomasse sur les supports a été recueillie à l'aide d'une fine spatule. La biomasse a ensuite été centrifugée à 13 000 x g pendant 5 minutes puis le surnageant a été remplacé par 1 mL de tampon TEN. Le tout a été congelé à -20°C.

Pour échantillonner la biomasse en suspension lors des essais en fioles, 1 mL du milieu a été prélevé puis centrifugé 5 minutes dans un tube de 1,5 mL à 13 000 x g. Le surnageant a ensuite été remplacé par 1 mL de tampon TEN et l'échantillon a été congelé à -20°C jusqu'au moment de l'extraction de l'ADN génomique.

L'échantillonnage des protozoaires et des autres eucaryotes a été effectué dans l'écumoire du dénitrificateur. Un sac de nylon en filet contenant les supports colonisés «Tri-Pack 1» (Jaeger Inc.) a été submergé dans l'écumoire du dénitrificateur pour la croissance et le maintien de la biomasse. Au moment de l'échantillonnage, le sac en nylon a été extrait de l'écumoire et plongé dans environ 2 L d'eau provenant du dénitrificateur. Une forte agitation manuelle du sac de nylon a permis de détacher une partie de la biomasse fixée aux supports à l'intérieur. Le sac de nylon, toujours immergé, a ensuite été ouvert et 500 mL d'eau avec la biomasse en suspension ont été prélevés et transférés dans un contenant de polypropylène hermétique de 500 mL. Le sac de nylon avec les supports a ensuite été refermé et replacé dans l'écumoire.

3.2.1 Concentration des protozoaires prélevés du dénitrificateur

Deux méthodes de concentration des protozoaires ont été utilisées. La première a consisté à concentrer par centrifugation. Un échantillon de 200 mL, prélevé tel que décrit en 3,2, a d'abord subi une préfiltration par gravité sur un tamis en acier inoxydable de 150 µm (Fisher Scientific) pour retirer une partie des agrégats de biomasse. Le filtrat a ensuite été réparti dans quatre tubes coniques de 50 mL. Les tubes ont été centrifugés à 11 000 x g pendant 2 minutes. Les quatre culots obtenus ont été regroupés puis dispersés dans 2 mL de surnageant. La suspension a été distribuée dans deux tubes de 1,5 mL à raison de 1 mL dans chacun. Une deuxième centrifugation a été effectuée à 13 000 x g pendant 2 minutes. Le surnageant a ensuite été remplacé par 0,5 mL de tampon TEN. Les échantillons, ainsi enrichis en protozoaires, ont été congelés à -20°C jusqu'au moment de l'extraction d'ADN.

La deuxième méthode de concentration utilisée a été la filtration. Un échantillon de biomasse a été prélevé et dilué par un facteur de deux (500 mL de biomasse dans 500 mL d'eau du dénitrificateur). Une forte agitation manuelle a été appliquée pour fragmenter les agrégats de biomasse. L'échantillon a ensuite subi deux préfiltrations par gravité sur deux tamis en acier inoxydable (Fisher Scientific) dont les ouvertures avaient une taille de 175 µm et 150 µm respectivement. Le filtrat a ensuite été filtré de nouveau par gravité sur une série de cinq membranes superposées fait de soie de type «Swiss Nitex Nylon Monofilament» dont la taille des pores faisait 100 µm, 75 µm, 45 µm, 20 µm, et 10 µm (B&SH Thompson & Co Ltd, Montréal, Canada). Le filtrat a été récupéré dans un bécher

de 1 L. La biomasse retenue par les membranes de 100 µm et de 75 µm a été recueillie dans un flasque de 200 mL avec de l'eau du dénitrificateur préalablement filtrée sur une membrane en cellulose de 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA, É-U) pour la débarrasser de tout eucaryotes. Le filtrat de la membrane de 10 µm, susceptible de contenir les protozoaires dont la taille est très petite, a également été récupéré. Afin de concentrer les protozoaires sur une petite surface, chacune des portions récupérées a subi séparément une dernière filtration sous un vacuum de 4,0 PSI sur une membrane de cellulose de 0,8 µm (Millipore Corporation). La membrane a ensuite été lavée dans un tube conique de 50 mL avec 1 mL d'eau du dénitrificateur. Ces suspensions concentrées en protozoaires ont été transférées dans des tubes de 1,5 mL. Un examen au binoculaire avec un grossissement de 8 à 40 fois a permis de confirmer la présence d'une grande quantité de protozoaires. Les suspensions de 1 mL, riches en protozoaires, provenant donc de la biomasse retenue par les membranes de 100 µm, de 75 µm ainsi que le filtrat de la membrane de 10 µm ont été centrifugés à 13 000 x g pendant 2 minutes. Le culot de chacune de ces suspensions a ensuite été dispersé dans 0,5 mL de tampon TEN puis il a été congelé à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

3.3 Mesure de la quantité de biomasse

3.3.1 Estimation de la quantité de biomasse par poids sec

Lors des essais en fioles sur les rapports C/N, la croissance de la biomasse a été estimée par la méthode du poids sec. Un mL de suspension a été prélevé puis centrifugé à 13 000 x g pendant 5 min. dans un tube de 1,5 mL. Le surnageant a été retiré et le tube a été placé dans un four à 105°C pendant 24 heures. À sa sortie du four, l'échantillon a été refroidi dans un dessiccateur puis pesé à l'aide d'une balance à précision.

3.3.2 Estimation de la quantité de biomasse par MES et MVES

Lors des expériences sur l'impact des protozoaires sur la dénitrification, la croissance de la flore microbienne a été estimée par la mesure des matières en suspension (MES) et des matières volatiles en suspension (MVES), sur les supports de type «Tri-Pack 1» (Jaeger Inc.). Ces mesures ont été déterminées au début et à la fin de l'expérience.

Au début de l'expérience, trois supports ont été prélevés du milieu et égouttés. L'enlèvement des sels extérieurs a été effectué en plaçant chaque support à tour de rôle dans un bécher avec 100 mL d'eau MilliQ et en agitant légèrement. Une sonde à conductivité a été placée dans le bécher et lorsque la conductivité se stabilisait, le déssalage était complet. Le support a été retiré et déposé dans une nacelle d'aluminium préalablement passée à 550°C 1 heure et prépesée (m_n). Le déssalage a été répété de la même façon avec les deux autres billes. Les fractions de 100 mL de surnageant utilisées pour le déssalage de chaque support ont été réunies et filtrées sur une membrane en fibre de verre de porosité 1,2 μm (Fisher Scientific) préalablement passée à 550°C 1 heure et prépesée (m_2). Les supports et le filtre ont ainsi été incubés à 105°C pendant 24 heures. Le tout a ensuite été refroidi au dessiccateur puis pesé sur une balance de précision ($m_3 =$ supports + biomasse, $m_4 =$ filtre + biomasse). La biomasse a ensuite été détachée des supports manuellement avec une fine spatule et elle a été récupérée dans la même nacelle d'aluminium utilisée pour le séchage à 105°C et dont le poids était connu (m_n). Par la suite, les supports ont été lavés à l'eau pour les débarrasser de tout résidu puis ils ont été séchés 1 heure à 105°C. Les supports ainsi lavés ont été pesés (m_5). Les MES ont été déterminées selon le calcul suivant:

Équation 1.

$$\text{MES/support} = ((m_3 - m_5) - m_n) + (m_4 - m_2) / \text{nombre de supports}$$

Pour déterminer les MVES, les matières détachées des supports et recueillies dans la nacelle d'aluminium ont d'abord été pesées (m_6) avant d'être mises dans un four à 550°C pendant 1 heure. Les matières inertes ainsi obtenues ont été refroidies au dessiccateur avant d'être pesées (m_{inertes}). Les MVES ont été obtenues par l'équation suivante:

Équation 2.

$$\text{MVES} = (m_6 - m_n) - (m_{\text{inertes}} - m_n)$$

Afin de combler l'erreur sur la perte possible de biomasse séchée à 105°C lors du détachement de la biomasse, un rapport MVES/MES a été fait. Comme le montre l'équation 3, la valeur des MES utilisée ici a été celle obtenue en soustrayant le poids de la

nacelle (m_n) à la valeur m_6 . Ceci indiquait donc le rapport de matières volatilisées à 550°C sur la quantité de matières en suspension totale. Ce rapport a ensuite été multiplié à la valeur obtenue à l'équation 1 pour obtenir la valeur des MVES/support.

Équation 3.

$$\text{MVES/support} = \text{MVES} / (m_6 - m_n) * \text{MES/support}$$

Comme la biomasse en suspension était abondante à la fin de l'expérience, la totalité du surnageant de la fiole a été filtré sur des membranes en fibre de verre de porosité 1,2 μm (Fisher Scientific) préalablement passées à 550°C 1 heure et prépesées. Comme mentionné ci-dessus, les membranes avec biomasse ont été passées à 105°C puis à 550°C pour déterminer les MES et les MVES. La valeur de MVES obtenue a été divisée par le nombre de supports dans le milieu soit cinq. Les supports contenus dans les fioles ont été traités de la même façon qu'en début d'expérience à l'exception que les cinq supports du milieu ont été utilisés plutôt que trois. Les valeurs de MVES/support obtenues pour la portion de la biomasse en suspension et pour la portion de biomasse sur les supports ont été additionnées.

3.4 Mesure de l'azote provenant des nitrates et des nitrites

3.4.1 Mesure des nitrites (N-NO₂)

Le suivi de l'azote provenant des nitrites a été réalisé immédiatement après la prise d'échantillon par une méthode colorimétrique. Le principe de la méthode consistait en la formation d'un complexe coloré entre les nitrites, le sulfanilamide (Laboratoires MAT, Beauport, QC, Canada) et le N-(1-naphthyl)-éthylènediamine dihydrochlorique (Fisher Scientific) dont l'intensité variait selon la concentration en nitrites.

Dans une fiole de 50 mL, les échantillons ont été dilués de 100 à 400 fois, selon l'expérience, avec de l'eau MilliQ dans un volume final de 25 mL. Ensuite, 500 μL d'une solution composée de sulfanilamide 58 mM (Laboratoires MAT), et de HCl 10% (v/v) ont été ajoutés. Après 2 minutes un second réactif a été ajouté soit 500 μL de N-(1-naphthyl)-éthylènediamine dihydrochlorique à 3,9 mM (Fisher Scientific). Une brève agitation

manuelle a été effectuée et les solutions ont été laissées à réagir pendant 10 minutes. Une lecture au spectrophotomètre a ensuite été faite à une longueur d'onde de 543 nm.

3.4.2 Mesure des nitrates (N-NO₃)

Le suivi de l'azote provenant des nitrates a été effectué par la méthode standard de réduction au cadmium automatisée (Burlage *et al.*, 1998). Un analyseur de type «Tecator FIAStar 5010 analyser» (Tecator AB, Hoganas, Suède) combiné à un contrôleur «Tecator FIAStar 5032 controller» (Tecator AB) a été utilisé. L'analyse a été réalisée selon la méthode 136-01/91 émise par le manufacturier. Le principe de la méthode consiste d'abord à réduire les nitrates en nitrites par la colonne de cadmium. Ensuite, tout comme à la section 3.4.1, l'ajout des réactifs permet la formation d'un complexe coloré avec les nitrites dont l'intensité est évaluée au spectrophotomètre (intégré à l'appareil) à 540 nm. Les échantillons ont d'abord été centrifugés à 13 000 x g pendant 5 minutes, puis le surnageant a été récupéré. Dans une éprouvette de 10 mL, les échantillons ont été dilués 50 fois avec de l'eau MilliQ dans un volume final de 5 mL. Les échantillons dilués ont été prélevés de façon automatisé par l'appareil «Tecator FIAStar 5027 sampler» (Tecator AB) pour leur analyse subséquente. Les résultats ont été exprimés en azote total (N-NO_x) provenant des nitrites et des nitrates. Pour déterminer la quantité de nitrates (N-NO₃), la concentration en nitrites (N-NO₂) avant la réduction au cadmium a été soustraite à celle de l'azote total. Cette valeur de nitrites (N-NO₂) a été déterminée par la méthode décrite à la section 3.4.1.

3.4.3 Mesure des nitrates et des nitrites par HPLC

Lors des essais sur l'impact des protozoaires sur la dénitrification, la mesure des nitrates (N-NO₃) et des nitrites (N-NO₂) a été réalisée par chromatographie en phase liquide (HPLC (High performance liquid chromatography)) conjointement avec le logiciel Millennium 32 (Waters, Milford, MA, É-U) pour la saisie et l'interprétation de données. Pour les analyses, un échantillonneur de modèle «717 plus autosampler», un contrôleur de type «600 controller» et d'un détecteur de type «486 tunable absorbance detector» tous du même manufacturier (Waters) ont été utilisés. Une colonne de 4,6 x 50 mm de type IC-PakA (Waters) dont les particules avaient une dimension de 10 µm a été utilisée. Une

solution de lithium borate/gluconate préparée selon les recommandations du manufacturier a été utilisée à titre d'éluant.

3.5 Extraction de l'ADN génomique

3.5.1 Étude des populations bactériennes

Lors de l'étude des populations bactériennes du dénitrificateur, des unités pilotes et de la biomasse contenue dans les fioles pour les essais à petite échelle, la méthode d'extraction d'ADN génomique par broyage avec billes de verre a été employée.

Les échantillons ont d'abord été centrifugés à 13 000 x g puis les culots ont été lavés avec du tampon TEN. Suite à une seconde centrifugation à 13 000 x g, les culots ont été dispersés dans 250 µL de TEN. Puis, 250 mg de billes de verre (0,4 – 0,5 mm) (Fisher Scientific) ont été ajoutés aux échantillons et ces derniers ont été refroidis sur glace. Les échantillons ont ensuite été broyés à l'aide de l'appareil «FastPrep FP120» (Thermo Savant, Holbrook, NY, É-U) deux fois 20 secondes à une puissance de 4,0. Les tubes ont de nouveau été refroidis sur glace avant d'être centrifugés 15 minutes à 13 000 x g. Les surnageants ont été déposés dans des tubes de 1,5 mL et 250 µL de phénol/chloroforme (Fisher Scientific)/alcool isoamylique (AetC Produits Chimiques Américains, Montréal, Qc, Canada) (25:24:1) ont été ajoutés. Par la suite, une centrifugation de 2 minutes à 13 000 x g a été appliquée. Les phases aqueuses ont été prélevées des échantillons et elles ont été déposées dans des tubes de 1,5 mL. À ces phases aqueuses ont été ajoutés 250 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24:1) (Fisher Scientific, AetC Produits Chimiques Américains) et les tubes ont de nouveau été centrifugés pendant 1 minute à 13 000 x g. Les phases aqueuses ont été prélevées et déposées dans des tubes de 1,5 mL contenant chacun 500 µL d'éthanol 100% (Fisher Scientific) et 50 µL d'acétate de d'ammonium 10 M (AetC Produits Chimiques Américains). Les échantillons ont ainsi été incubés à -20°C pendant 30 minutes pour permettre la précipitation de l'ADN. Par la suite, les échantillons ont été centrifugés 15 minutes à 13 000 x g puis les culots ont été lavés avec de l'éthanol 70% (v/v) et ils ont été centrifugés de nouveau à 13 000 x g pendant 2 minutes. L'éthanol a été retiré délicatement des tubes et les culots d'ADN ont été séchés à l'air libre sous une hotte chimique. Les culots d'ADN ont finalement été dissout dans 200 µL d'eau MilliQ et 1 µL

de RNase 10 mg/mL (USB Co., Cleveland, Ohio, É-U). L'ADN ainsi extrait des échantillons a été conservé à 4°C.

3.5.2 Étude des populations de protozoaires

Deux méthodes d'extraction de l'ADN génomique ont été utilisées lors de l'étude des populations de protozoaires dans le système de dénitrification soit l'extraction par sonification et l'extraction par la méthode de Mini-Prep (voir section 3.10.5). Ces méthodes d'extraction, moins agressives que le broyage avec des billes de verre, ont donné de meilleurs résultats lors de l'amplification de l'ADNr 18S quant à la quantité d'ADN extrait et amplifié.

L'extraction de l'ADN génomique par sonification a été réalisée avec l'appareil «Sonicator ultrasonic processor XL» (Mandel Scientific Company, Guelph, ON, Canada). L'échantillon de biomasse a d'abord été dispersé à l'aide d'un vortex puis la sonde a été insérée au centre du tube contenant la biomasse. Une sonification de 1 fois 30 secondes a été appliquée à une intensité de 2. L'échantillon a été refroidi sur glace avant d'être centrifugé 15 minutes à 13 000 x g. La procédure de l'extraction avec broyage par billes de verre a ensuite été employée à partir de l'étape de l'ajout de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Fisher Scientific, AetC Produits Chimiques Américains) (voir section 3.5.1). La seconde méthode d'extraction d'ADN génomique a été la même que celle employée pour l'extraction de l'ADN plasmidique (Mini-prep) (voir section 3.10.5) à l'exception de l'étape de l'extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique qui a été répété deux fois.

3.5.3 Quantification de l'ADN génomique et de l'ADN des gènes ribosomaux

La quantification de l'ADN génomique et de l'ADN des gènes ribosomaux a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose. L'intensité des bandes d'ADN révélées par la solution de bromure d'éthidium (voir section 3.7) a été comparée avec celle du marqueur dont la concentration en ADN était connue pour chaque bande révélée.

3.6 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification des différentes régions du gène codant pour l'ARNr 16S a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour l'étude des populations bactériennes du dénitrificateur, des unités pilotes et lors des essais en fioles. Les amorces utilisées (tableau 3.1) pour les amplifications PCR ont été synthétisés par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Chaque réaction PCR de 50 μL a été réalisée dans un tube de 0,5 mL avec 5 à 10 ng/ μL d'ADN génomique dilué, un tampon *Taq* polymérase (Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, É-U), des déoxynucléosides triphosphates à une concentration finale de 200 μM chacun (Amersham Biosciences), environ 10 pmoles de chacune des deux amorces, de l'albumine bovine 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Sigma) et 2,5 U d'enzyme *Taq* polymérase (Amersham Biosciences). Le volume des réactifs a été complété à 50 μL avec de l'eau MilliQ. Les tubes ont ensuite été refroidis sur glace.

Lorsque l'amplification PCR était réalisée par l'appareil « DNA Thermal Cycler 480 » (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn, É-U), 40 μL d'huile minérale ont été nécessaires pour éviter toute évaporation. De plus, l'ADN a été ajouté aux réactifs seulement lorsque ces derniers avaient atteint une température de 94°C (démarrage à chaud). Le détail des programmes qui ont été employés est inscrit au tableau 3.1.

L'appareil « Geneamp® PCR System 2700 » (Applied Biosystems Streetsville, ON, Canada) a également été utilisé pour l'amplification PCR. La préparation des réactifs et de l'ADN a été la même que mentionné ci haut à l'exception que les produits de PCR ont été préparés dans un tube de 0,2 mL (Fisher Scientific) et l'ajout d'huile minérale n'a pas été requis. Le programme d'amplification différait également (tableau 3.1).

Lors de l'étude de la diversité eucaryotique dans le dénitrificateur, l'amplification d'une section du gène ARNr 18S a été réalisée. Mise à part les amorces, les mêmes réactifs aux mêmes concentrations que pour l'amplification du gène ARNr 16S ont été employés. L'appareil « Geneamp® PCR System 2700 » (Applied Biosystems) a été utilisé avec les amorces et le programme listés au tableau 3.1. Les fragments d'ADN résultants de cette amplification PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (voir section 3.7).

3.7 Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose a été utilisée pour la séparation des échantillons d'ADN. Des gels de 1 à 2% (p/v) d'agarose (Invitrogen, Grand Island, NY, É-U) dissous dans du tampon TAE (1 mM EDTA, 40 mM Tris-acétate à pH 8,0) ont été utilisés. Avant d'être appliqués au gel, les échantillons d'ADN ont été additionnés d'un tampon de charge d'une concentration de 6X (30% (v/v) glycérol (Fisher Scientific), 0,25% (p/v) de xylène cyanol (Sigma) et de 0,25% de bleu de bromophénol (Sigma). Les gels d'agarose ont été insérés dans une cuve à électrophorèse de type « BIO-Rad mini-sub™ DNA cell ou Bio-Rad wide mini-sub™ DNA cell » (Bio-Rad, Hercules, CA, É-U) contenant du Tampon TAE. Une fois les puits des gels chargés des échantillons d'ADN, un courant de 70 à 80 V a été appliqué pendant 30 à 90 minutes selon l'expérience pour permettre la migration de l'ADN. La co-migration d'un marqueur de poids moléculaire a été utilisée pour estimer la longueur des fragments d'ADN. Plusieurs marqueurs ont été employés selon le type d'expérience. Les marqueurs de type « Gene Ruler™ 50 pb DNA ladder » (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Allemagne), « FullRanger DNA Marker (100 bp – 5000 bp) » (Norgen Biotek Corporation, St. Catherines, ON, Canada) et le λ *StyI* (500 ng) obtenus à partir de la digestion de l'ADN du phage λ par l'enzyme de restriction *StyI* (Amersham Biosciences) ont été utilisés.

Suite à la migration, les gels ont été plongés dans une solution sous agitation de bromure d'éthidium 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma) pour une durée de 10 à 20 minutes. Les gels ont ensuite été lavés dans l'eau MilliQ sous agitation constante pendant 15 à 20 minutes. L'ADN sur les gels a été visualisé par rayonnement ultraviolet (UV) avec l'appareil «Bio-Rad gelDoc » (Bio-Rad Laboratories) utilisé conjointement avec le logiciel d'analyse «Molecular Analyst » version 1.3 (Bio-Rad Laboratories). Un second appareil à rayonnement UV a également été utilisé, soit le «AlphaImager™3400 » (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, É-U) avec le logiciel «AlphaImager 3400 » (Alpha Innotech).

3.8 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide à gradient dénaturant (DGGE)

Le DGGE a été employé dans plusieurs expériences pour déterminer l'évolution de la diversité microbienne soit dans les fioles, les unités pilotes ou dans le dénitrificateur comme tel. Cette méthode a aussi été utilisée dans le but de comparer la flore microbienne soumise à différentes conditions telles que la source de carbone et son dosage, ainsi que le mode d'opération du système. Pour la réalisation du gel à gradient dénaturant, le « DCode™ universal mutation detection system » combiné à un bloc d'alimentation modèle 250/2.5 (Bio-Rad Laboratories) a été utilisé.

3.8.1 Fabrication du gel dénaturant

Le gel a été réalisé à partir de deux solutions à 8% (v/v) d'acrylamide:bis (19:1) (Bio-Rad Laboratories), soit l'une avec 0% (v/v) de dénaturant et l'autre avec 80% de dénaturant. Le formamide (Fisher Scientific) et l'urée (Bio-Rad Laboratories) ont été utilisés à titre de dénaturant. D'abord, une solution concentrée d'acrylamide:bis (19:1) 40% (p/v) a été effectuée à partir de 38 g d'acrylamide et de 2 g de bis-acrylamide (Bio-Rad Laboratories) dissous dans un volume total de 100 mL. Cette solution a été filtrée sur une membrane de cellulose de 0,45 µm (Millipore Co.).

La solution d'acrylamide 0% (v/v) dénaturants a été faite en ajoutant 10 mL de solution concentrée d'acrylamide:bis (19:1) 40% (p/v) et 1 mL de tampon TAE 50X à 39 mL d'eau MilliQ. La solution d'acrylamide 80% (v/v) de dénaturants a été faite en mélangeant 10 mL de solution concentrée d'acrylamide:bis (19:1) 40% (p/v) et 1 mL de tampon TAE 50X à 16 mL de formamide déionisé (Fisher Scientific). Ensuite 16,8 g d'urée (Bio-Rad Laboratories) ont été dissous à cette solution et le volume final a été ajusté à 50 mL avec de l'eau MilliQ. Ces deux solutions (0 et 80% (v/v) dénaturants) ont été filtrées sur une membrane de cellulose de 0,45 µm puis elles ont été dégazées par agitation dans une chambre anaérobie sous vide pendant 15 minutes. Les solutions ont ensuite été refroidies sur glace.

Une chambre à gradient modèle 385 (Bio-Rad Laboratories) a été utilisée pour la formation du gradient dénaturant dans le gel (figure 3.1). Pour réaliser un gel à gradient de

0 à 80% de dénaturants, 20 mL de solution à 0% de dénaturants ont été ajoutés à la chambre de gauche alors que 20 mL de la solution à 80% de dénaturants ont été ajoutés à la chambre de droite, soit celle directement reliée au tuyau. Ensuite, 10 µL de Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Fisher Scientific) et 100 µL de persulfate d'ammonium (Bio-Rad Laboratories) 10% (p/v) refroidis ont été ajoutés à chacune des chambres. En abaissant le levier de la chambre à gradient, les solutions se mélangeaient graduellement dans la chambre de droite, et ce mélange s'écoulait entre les deux vitres du montage en sandwich (Bio-Rad Laboratories). Une fois le gel coulé, un peigne a été inséré dans la partie supérieure du montage, entre les deux vitres. Le gel a été laissé à polymériser pendant 2 heures.

Ensuite le peigne a été retiré et les puits du gel ont été rincés avec du tampon TAE. Le montage en sandwich a ensuite été inséré dans le support de migration inclus dans l'appareil «DCode™ universal mutation detection system ». Par la suite, le support a été placé dans la cuve à migration contenant 7 L de tampon TAE agités et maintenus à une température de 60°C. Le gel a ensuite été laissé à équilibrer pendant 1 heure.

3.8.2 Migration des échantillons

Les échantillons d'ADN ont été préparés en ajoutant un volume égale de tampon de chargement (100% (v/v) glycérol avec 0,25% (p/v) xylène cyanol et 0,25% (p/v) de bleu de bromophénol à titre de colorant). Les échantillons ont ensuite été appliqués au gel et le tout a été mis sous tension à 100 V pendant 16 heures. La coloration du gel ainsi que sa visualisation a été fait tel que décrit dans la section 3.7.

3.9 Identification des protozoaires par microscopie

Des observations microscopiques ont été réalisées pour l'identification des protozoaires à l'aide d'un microscope de type «Nikon eclipse E600» (Nikon Inc, Melville, NY, É-U) muni d'une caméra de type «Coolpix 990» (Nikon Inc). Les observations ont été faites en contraste de phase ou sur fond clair à des grossissements de 100 à 1000 fois.

Un microscope de type «TE-2000» (Nikon Inc) a également été utilisé pour l'identification. Une camera de type «Sensys 1401E» (Roper Scientific photometrics, Tucson, AZ, É-U) a été utilisée avec ce microscope et les images ont été traitées à l'aide du logiciel «MetaMorph imaging system » version 6.1r2 (Universal Imaging corporation, Downingtown, PA, É-U) Les observations ont été faites avec le contraste interférentiel différentiel (DIC) (communément nommé contraste de Nomarski) à des grossissements de 400, 600 et 1000 fois. Le DIC permet d'accentuer les contrastes dus au relief sur la surface de l'échantillon observé. Ainsi, un effet tridimensionnel est donné à l'image.

L'identification des protozoaires a été fait selon la littérature (Lee *et al.*, 2000a) (Patterson, 2003) (Levine *et al.*, 1980) et ainsi que selon la base de donnée «Protist information server» (http://protist.i.hosei.ac.jp/Protist_menuE.html). La classification taxonomique utilisée est celle proposée et approuvée par la société de protozoologie (Lee *et al.*, 2000a) ainsi que celle de Patterson (1999).

3.9.1 Ralentissement et immobilisation des protozoaires

Pour faciliter leur observation, les protozoaires ont parfois été immobilisés à l'aide d'une solution de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) d'une concentration de 40 mg/L. Les protozoaires ont également été ralentis dans leurs mouvements avec une solution à haute viscosité soit le «Detain™» (Ward's natural science establishment, Rochester, NY, É-U). Dans les deux cas, ces solutions ont été ajoutées à volume égal avec la suspension à observer sur la lame de microscope et les observations ont été faites dans un délai maximal de quinze minutes après lequel l'éclatement des cellules eucaryotiques avait lieu.

3.9.2 Coloration des protozoaires

Diverses colorations ont été utilisées pour permettre une meilleure identification. Le vert de méthyl pyronine (Sigma) a été utilisé pour la coloration du noyau (violet) et du cytoplasme (rose). Pour ce faire, le vert de méthyl pyronine a été mélangé avec l'échantillon à observer directement sur la lame microscopique à raison d'une goutte de colorant pour une goutte d'échantillon. Ce colorant a également permis l'immobilisation

des protozoaires. Les échantillons ont été observés dans un délai de 10 minutes suite à l'ajout du colorant après quoi les cellules éclataient.

Une méthode d'imprégnation au carbonate d'argent pour les échantillons marins a également été utilisée pour la coloration des noyaux et de l'infrastructure (Foissner et Berger, 1996). Pour ce faire, une solution de carbonate d'argent ammoniacal a été préparée avant de commencer la coloration. Cette solution a été faite en ajoutant graduellement 50 mL d'une solution de nitrate d'argent 0.59 M (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, É-U) à 150 mL d'une solution de carbonate de sodium décahydrate 5% (p/v) (Fisher Scientific). A cette solution laiteuse, de l'hydroxide d'ammonium concentré (AetC Produits Chimiques Américains) a été ajouté goutte à goutte jusqu'à ce que la solution devienne claire. Le volume a ensuite été complété à 800 mL avec une solution de carbonate de sodium décahydrate 5% (p/v) (Fisher Scientific).

Pour réaliser la coloration comme tel, 10 mL d'échantillon ont été fixés dans un tube de verre à bouchon vissé par l'ajout de 0,5 mL de formaldéhyde 4% (v/v) (Mallinckrodt Canada, Québec, Canada). Une centrifugation de 1600 RPM a été appliquée pendant 5 minutes. Par la suite, le culot a été lavé trois fois avec 10 mL d'eau MilliQ en centrifugeant entre chaque lavage. Le culot a ensuite été transféré dans un bécher de 50 mL puis 5 mL d'eau MilliQ ainsi que trois gouttes de formaldéhyde 4% (v/v) (Mallinckrodt Canada) ont été ajoutés. La solution a été placée sous agitation à partir de cette étape. Vingt-cinq gouttes d'une solution de bactopeptone 5% (p/v) (Difco Laboratories, Détroit, MI, É-U) additionnée de formaldéhyde 0,04% (v/v) (Mallinckrodt Canada) ont été ajoutés. Ensuite, 10 gouttes de pyridine (Sigma) ainsi que 2 mL de la solution de carbonate d'argent ammoniacal et 20 mL d'eau MilliQ ont été ajoutés. Par la suite, le bécher a été incubé à une température de 58 à 62°C dans un bain-marie. Au fur et à mesure que la solution se colorait d'une couleur brune, des fractions d'environ 1 mL ont été prélevées en visant les agrégats de biomasse au fond du bécher. De cette façon, plusieurs intensités de coloration ont été obtenues. Pour arrêter la coloration, les fractions ont été transférées immédiatement après leur prélèvement dans un Pétri de verre contenant 30 mL d'eau MilliQ. Les agrégats avec les protozoaires ainsi colorés ont été laissés à sédimenter dans le Pétri. Finalement, les agrégats ont été prélevés pour leur observation au microscope sur fond clair (voir section 3.9)

3.10 Élaboration d'une génothèque visant les protozoaires

3.10.1 Concentration du produit de PCR

En vue d'optimiser la ligation, il était nécessaire de concentrer l'ADNr 18S obtenu par amplification PCR. Pour ce faire, deux volumes d'éthanol 95% (v/v) ont été ajoutés aux tubes contenant les produits de PCR ainsi que ¼ de volume d'acétate d'ammonium 10 M (AetC Produits Chimiques Américains). Les échantillons d'ADN ont ensuite été congelés à -20°C pendant 30 minutes. Par la suite, les tubes ont été centrifugés à 13 000 x g pendant 15 minutes. Les surnageants ont été jetés puis un lavage avec deux volumes d'éthanol 70% (v/v) a été effectué suivi d'une centrifugation de 2 minutes. Les surnageants ont été encore éliminés et les culots ont été séchés à l'air libre sous une hotte chimique. Les culots ont ensuite été dissous dans 10 µL de tampon TE (Tris-HCl à 10 mM et EDTA.2Na 1 mM à pH 8.0). La quantité d'ADNr 18S a finalement été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

3.10.2 Ligation des fragments d'ADNr 18S

La ligation des fragments d'ADNr 18S a été réalisée à l'aide du vecteur pGEM[®]-T inclus dans la trousse «pGEM[®]-T easy vector system» (Promega, Madison, WI, É-U). Tel que montré à la figure 3.2, ce vecteur possède plusieurs propriétés utiles à l'élaboration d'une génothèque. D'abord le vecteur possède, à chacune des extrémités 3' du site d'insertion, des résidus thymidine qui facilitent la ligation du produit de PCR en empêchant la recircularisation du vecteur. Le site d'insertion multiple se situe dans la région codante de l' α -peptide de l'enzyme β -galactosidase. Cette enzyme permet le clivage du X-GAL ce qui donne une coloration bleue aux colonies lors de la croissance. Lorsque la β -galactosidase ne peut être exprimée due à l'interruption de sa région codante par l'insertion du produit de PCR, le X-GAL n'est pas clivé et les colonies demeurent blanches. Ce type de vecteur permet donc de repérer les cellules ayant intégré avec succès le produit de PCR au plasmide simplement par la couleur des colonies. Le vecteur pGEM[®]-T comprend les gènes de résistance à l'ampicilline permettant la croissance sélective des cellules transformées. Finalement le vecteur pGEM[®]-T comprend de nombreux sites

propices au clivage par différentes enzymes de restrictions telles que EcoR I, BstZ I et Not I, ce qui permet d'extraire l'insert suite au clonage.

Dans un tube de 0,5 mL, 1 μ L du vecteur pGEM[®]-T (Promega) a été ajouté ainsi que 5 μ L de tampon «2X rapid ligation» et 1 μ L de ligase T4 d'ADN chacun inclut dans la trousse «pGEM[®]-T easy vector system» (Promega). Trois μ L d'ADNr 18S concentré ont ensuite été ajoutés. La quantité d'ADN ajouté était en excès par rapport au vecteur ce qui a permis un meilleur rendement de la réaction de ligation. Le mélange de réactifs a été agité à l'aide d'une micropipette et ensuite il a été incubé 1 heure à la température de la pièce. Le tube a finalement été incubé à 4°C pendant 16 heures.

3.10.3 Transformation des cellules *E. coli* DH5 α avec le produit de ligation

Le produit de ligation a d'abord été centrifugé et déposé sur la glace. Un tube contenant 100 μ L de cellules compétentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen) a aussi été déposé sur la glace. À ce tube, 5 μ L de produit de ligation ont été ajoutés, puis une agitation délicate a été appliquée par des mouvements circulaires de l'embout de la micropipette. Le tube a ensuite été placé sur la glace pour une période de 30 minutes. Par la suite, une incubation de 45 secondes dans un bain à 42°C a été appliquée au tube suivi d'une seconde incubation sur la glace d'une durée de 2 minutes. Ensuite, les cellules transformées ont été ajoutées à 900 μ L de SOC préchauffé à 37°C et le tout a été agité à 225 RPM pendant 1 heure à une température de 37°C. Le milieu SOC a été fait à partir d'un milieu SOB auquel a été ajouté du glucose à une concentration finale de 0.1 M. Quant au milieu SOB, il a été fait avec 2% (p/v) de bacto tryptone (Difco laboratories), 0,5% (p/v) d'extrait de levure (Difco laboratories), 0,05% de NaCl et 2,5 mM de chlorure de potassium (J.T. Baker Chemical). Le pH a été ajusté à 7,0 avec du NaOH 10 N. Suite à la stérilisation de ce milieu 0,01 M de chlorure de magnésium (AetC Produits Chimiques Américains) a été ajouté.

Après l'incubation d'une heure sous agitation de la culture de cellules transformées, 50 à 200 μ L de cette culture ont été étalés sur des milieux sélectifs SOB. Ces milieux ont été faits à partir du bouillon SOB auquel a été ajouté 1,5% d'agar et après stérilisation, 100 mg/L d'ampicilline (ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio, É-U) ont été ajoutés ainsi que 40 mg/L de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranoside (X-GAL) (Roche

Diagnostics, Laval, QC, Canada) et 120 mg/L d'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) (Amersham Pharmacia Biotech). Ces milieux ne contenaient toutefois pas de chlorure de magnésium comme c'est le cas pour les milieux SOB liquides. Les géloses ainsi inoculées, ont été incubées à 37°C environ 16 heures.

3.10.4 Criblage des colonies ayant intégrées l'insert

La croissance des cellules compétentes *E. coli* DH5 α sur le milieu sélectif décrit précédemment a permis la croissance des cellules transformées dont l'insert a été intégré à leur plasmide ainsi que celles qui n'ont pas l'insert intégré au plasmide. Celles-ci ont induit des colonies blanches et bleues respectivement. Seules les colonies blanches ont été sélectionnées.

3.10.5 Extraction de l'ADN plasmidique pGEM[®]-T Easy/ADNr 18S

Les colonies blanches ont été sélectionnées au hasard et repiquées individuellement dans des éprouvettes de 10 mL contenant 3 mL de milieu SOB liquide avec 100 mg/L d'ampicilline. Ces cultures ont été incubées 16 heures à 37°C sous agitation. Une colonie bleue a aussi été repiquée et cultivée à titre de témoin négatif.

L'extraction de l'ADN plasmidique a été faite par la méthode de Mini-prep. Pour chacune des suspensions obtenues, 1 mL a été prélevé et centrifugé dans un tube de 1,5 mL à 13 000 x g pendant 30 secondes. Le culot a ensuite été lavé avec 500 μ L de tampon TEN. Le tube a été de nouveau centrifugé 30 secondes à 13 000 x g puis le culot a été mis en suspension dans 200 μ L de tampon TEN. À cette suspension ont été ajoutés 300 μ L de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) (Fisher Scientific, AetC Produits Chimiques Américains) et le tout a été agité au vortex pendant 30 secondes à une puissance maximale jusqu'à l'obtention d'une émulsion. Le tube a ensuite été centrifugé 5 minutes à 13 000 x g. Le surnageant (200 μ L) a été récupéré puis ajouté à 50 μ L d'acétate d'ammonium 10 M (AetC Produits Chimiques Américains) et 500 μ L d'éthanol 95% (v/v). Le tout a été incubé à -20°C pendant 15 minutes. Le tube a ensuite été centrifugé 10 minutes à 13 000 x g puis le culot a été lavé à l'éthanol 70% (v/v) et de nouveau centrifugé

à la même vitesse pendant 1 minute. Le surnageant a été vidangé et le culot a été asséché à l'air libre sous une hotte chimique pendant 30 minutes. Par la suite, le culot a été dissous dans 50 μL de RNase 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (USB Co.).

La présence de l'ADN plasmidique avec l'insert a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Suite à la migration, l'ADN extrait de chaque clone a été comparé à l'ADN extrait du témoin négatif ainsi qu'au standard de poids moléculaire λ *StyI*. L'ADN plasmidique qui possédait l'insert avait un poids moléculaire plus élevé que l'ADN extrait du témoin négatif. Ce criblage permettait d'éliminer les faux positifs soit l'ADN issu de colonies blanches n'ayant pas intégrées l'insert d'ADNr 18S.

3.10.6 Criblage des clones par digestion enzymatique

Afin de différencier les clones entre eux et de regrouper ceux étant identiques, un criblage par digestion enzymatique a été réalisé sur l'ensemble de la génothèque de clones en excluant les faux positifs.

Deux enzymes ont été utilisées conjointement pour le criblage soit *EcoRI* (Amersham Biosciences) et *AfaI* (Amersham Biosciences) ou *RsaI* (Promega). Les enzymes ont été ajoutées à des concentrations de 12 à 15 U/ μL pour *EcoRI* et de 10 U/ μL pour *AfaI* et *RsaI*. Pour chacune des réactions de digestion, 1 μL de chaque enzyme a été utilisé. Le tampon de digestion « One-Phorr-All Buffer Plus » (Amersham Biosciences) a été utilisé à une concentration finale de 1,5X. Ce tampon était composé de Tris-acétate 100 mM à pH de 7,5, d'acétate de magnésium 100 mM et d'acétate de potassium à 500 mM. Pour chacun des clones à cribler, 7 à 15 μL d'ADN issu des Mini-prep (voir section 3.10.5) ont été ajoutés aux réactifs (enzymes et tampon) de digestion pour un volume total de 15 à 20 μL . Ce volume a été complété avec de l'eau MilliQ. Lorsque les profils de digestion étaient ambigus, une deuxième digestion a été effectuée avec d'autres enzymes, soient *Sau3A* 10 U/ μL (Amersham Biosciences) ou *HhaI* 10 U/ μL (Amersham Biosciences). Les tubes contenant les réactifs de digestion ainsi que l'ADN des clones à digérer ont été incubés à 37°C pendant quatre heures. La séparation des fragments d'ADN issus de la digestion a été fait par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (voir section 3.7).

3.11 Séquençage des gènes ribosomaux 18S

Un représentant choisi au hasard de chaque groupe de clone a été séquençé par l'entreprise Centre d'innovation Génome Québec (Montréal, QC, Canada). La préparation des échantillons sous forme de produits de PCR a été fait selon les exigences de la compagnie (Centre d'innovation Génome Québec) avec les amorces 82f et 1415r.

3.12 Analyse des séquences

Les séquences obtenues ont d'abord été corrigées avec le logiciel «Chromas» version 2.23 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Les séquences ont ensuite été comparées à celles des banques de données à l'aide du logiciel «BLASTn» (National Center for Biotechnology information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et aussi avec le programme «FASTA» (EMBL-EBI European bioinformatics institute, <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>). La détection de séquences chimériques a été réalisée avec les programmes «CHIMERA_CHECK» (ribosomal database project II, <http://35.8.164.52/cgis/chimera.cgi?su=SSU>) et «BELLEROPHON» (Bellerophon Server, <http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>) (Huber *et al.*, 2004). L'alignement des séquences entre elles ou avec d'autres séquences issues des banques de données a été effectuée avec le programme «Clustalw» version 1.4 inclus dans le logiciel «BioEdit» version 6.0.6 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, É-U).

3.13 Analyse de raréfaction

L'analyse de raréfaction sur la génothèque a été réalisée avec le programme «Rarefact Win» version 1.3 (<http://www.uga.edu/~strata/software>) (Heck *et al.*, 1975; Hurlbert, 1971). Cette analyse tient compte du nombre de clones observés pour chaque groupe de clones dans le but d'estimer la diversité de la génothèque. Les résultats sont exprimés sous forme de courbe avec un intervalle de confiance. Ils indiquent le nombre présumé de clones ou d'espèces différents obtenus par rapport au nombre de clones total générés d'après le calcul de probabilité. Ainsi, lorsque la courbe tend vers un plateau ceci

indique que le nombre de clones générés est suffisant pour bien représenter la diversité du milieu étudié.

3.14 Étude phylogénétique

La classification phylogénétique des clones séquencés a été réalisée avec les divers programmes du logiciel «PHYLIP» version 3.5c (PHYLIP, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) De ce logiciel, le programme «SEQBOOT» a été utilisé pour faire une analyse bootstrap générant 1000 répliqués des séquences. Ensuite, le programme «DNADIST» a été utilisé pour la comparaison des séquences entre elles afin d'évaluer le nombre de changements par nucléotide comparé. Les résultats étaient exprimés sous forme de matrices de distances. Ensuite le programme «FITCH» a été utilisé pour générer le meilleur arbre à partir de chaque matrice de distances issues de l'analyse avec «DNADIST». Finalement, le programme «CONSENSE» a été utilisé pour générer un arbre phylogénétique consensus.

3.15 Analyses statistiques

Les différentes analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel «JMP in» version 4.0.4 (Academic) (SAS institute inc. NC, É-U).

Amplification visant l'ADNr 16S				
Amorce	Séquence (5'→3')	Position	Appareil PCR	Programme
341F-GC ¹	CGCCCGCCGCGCGGGCG GGCGGGGCGGGGGCACG GGGGG CCTACGGGAGG CAGCAG	341-357	DNAThermalCycler 480	94°C, 5 min. } 55°C, 5 min. } 1 cycle 72°C, 1 min. } 94°C, 40 sec. } 30 cycles 55°C, 1 min. } 72°C, 10 min. } 1 cycle
534R ¹	ATTACCGCGGCTGCTGG	518-534	Geneamp®PCR System 2700	94°C, 3 min. } 55°C, 3 min. } 1 cycle 72°C, 40 sec. } 94°C, 40 sec. } 30 cycles 55°C, 40 sec. } 72°C, 10 min. } 1 cycle
Amplification visant l'ADNr 18S				
Amorce	Séquence (5'→3')	Position	Appareil PCR	Programme
82F ²	GAAACTGCGAATGGCTC	82-98	Geneamp®PCR System 2700	94°C, 5 min. } 53°C, 5 min. } 1 cycle
1415r ³	GGGCATCACWGACCTGTT ATTGCC	1415-1435		72°C, 45 sec. } 94°C, 45 sec. } 30 cycles 53°C, 45 sec. } 72°C, 10 min. } 1 cycle

Tableau 3.1. Amorces utilisées pour les amplifications PCR ainsi que les programmes de réactions utilisés avec chaque appareil. 1. Muyzer *et al.*, 1993, 2. Takishita *et al.*, 2005, 3. position relative au gène ribosomal 18S de *Saccharomyces cerevisiae*.

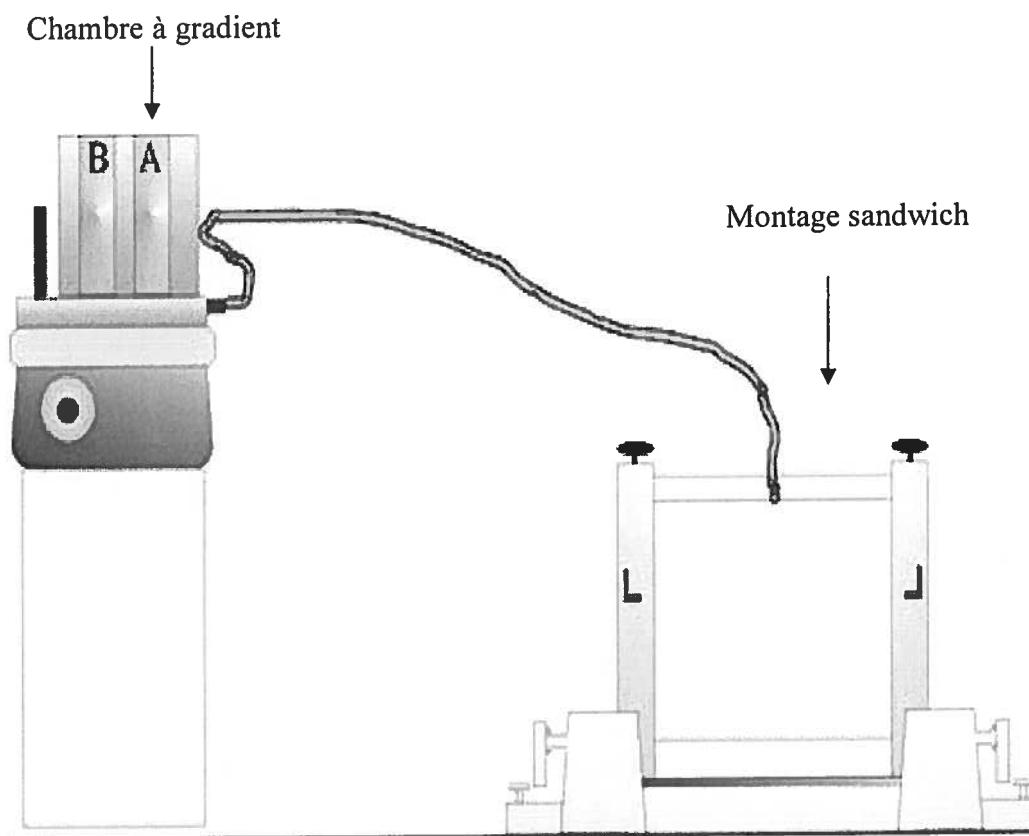


Figure 3.1. Appareillage pour la réalisation du DGGE. Montage pour réaliser le gel à gradient dénaturant.

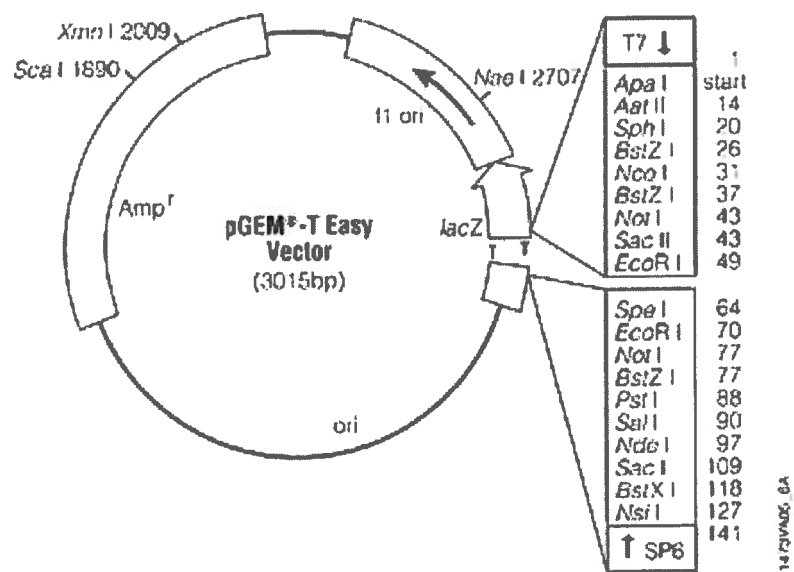


Figure 3.2. Vecteur pGEM[®]-T Easy utilisé pour le clonage des ADN des gènes ribosomiaux 18S issus de l'amplification PCR.

4. RÉSULTATS

Lors de la présente étude, différents essais ont été réalisés dans le but d'optimiser et de caractériser le procédé de dénitrification du Biodôme de Montréal. La section suivante décrit les résultats obtenus lors de ces essais.

4.1 Effet des différents rapports carbone/azote sur l'activité de dénitrification et sur la diversité microbienne

Depuis la mise en opération du système de dénitrification, la source de carbone ajoutée est le méthanol. Cet objectif visait à déterminer le dosage optimal de méthanol, sous forme de rapport carbone/azote (C/N), à ajouter pour la dénitrification des eaux du mésocosme. Aussi, l'effet des divers rapports C/N sur la diversité microbienne du dénitrificateur a été étudié.

4.1.1 Effet des différents rapports C/N sur l'activité de dénitrification

Les conditions du dénitrificateur ont été reproduites en fioles mais avec une quantité de nitrates supérieure, soit 300 mg N- NaNO_3 /L. Les fioles ont ensuite été inoculées avec la biomasse prélevée du dénitrificateur. Le méthanol a été ajouté aux rapports C/N variants de 0,5 à 2,0 C- CH_3OH / N- NaNO_3 . L'activité de dénitrification avec les différents rapports C/N a été suivie par la mesure de l'azote provenant des nitrates et des nitrites (N- NO_x) et des nitrites seuls (N- NO_2) aux intervalles de temps de huit et seize heures. Le suivi de la concentration en biomasse a également été réalisé.

La figure 4.1a montre qu'à un rapport C/N de 0,5, la dénitrification n'a pu être complétée due à une quantité insuffisante de la source de carbone dans le milieu. À un rapport C/N de 1,0, 96,5% des nitrates et des nitrites (N- NO_x) ont été réduits après 96 heures d'incubation (tableau 4.1). Cependant, un ralentissement de la dénitrification a été observé à partir de 48 heures d'incubation. Ensuite, aux rapports C/N de 1,5 et plus, la dénitrification a été complétée en 56 heures. Comme le montre le tableau 4.1, les taux de dénitrification étaient similaires quel que soit le rapport C/N appliqué. Les taux de dénitrification ont été calculés sur la portion linéaire des courbes du graphique de la figure 4.1a. La mesure de la biomasse lors des essais a démontré une augmentation de 1% à 2% seulement ce qui indique une croissance non significative (statistiquement) et ce pour tous les rapports C/N (figure 4.1c). De plus, selon le test statistique de Tukey, les moyennes des

mesures de la biomasse ne sont pas significativement différentes d'un rapport carbone/azote à l'autre (figure 4.2). Enfin, aucune accumulation de nitrites (N-NO_2) n'a été observée pour chacun des rapports C/N (figure 4.1b).

4.1.2 Effet des rapports C/N sur la diversité microbienne

À la fin des essais sur les les rapports C/N, un échantillon de biomasse a été prélevé de chaque fiole, l'ADN total a été extrait et le profil migratoire sur DGGE des ADN ribosomiaux a été déterminé. Ce profil représente la diversité microbienne présente dans les fioles respectives. La figure 4.3 montre les profils de la diversité microbienne en culture avec le méthanol à divers rapports C/N. Ces profils se sont montrés identiques d'un rapport C/N à l'autre.

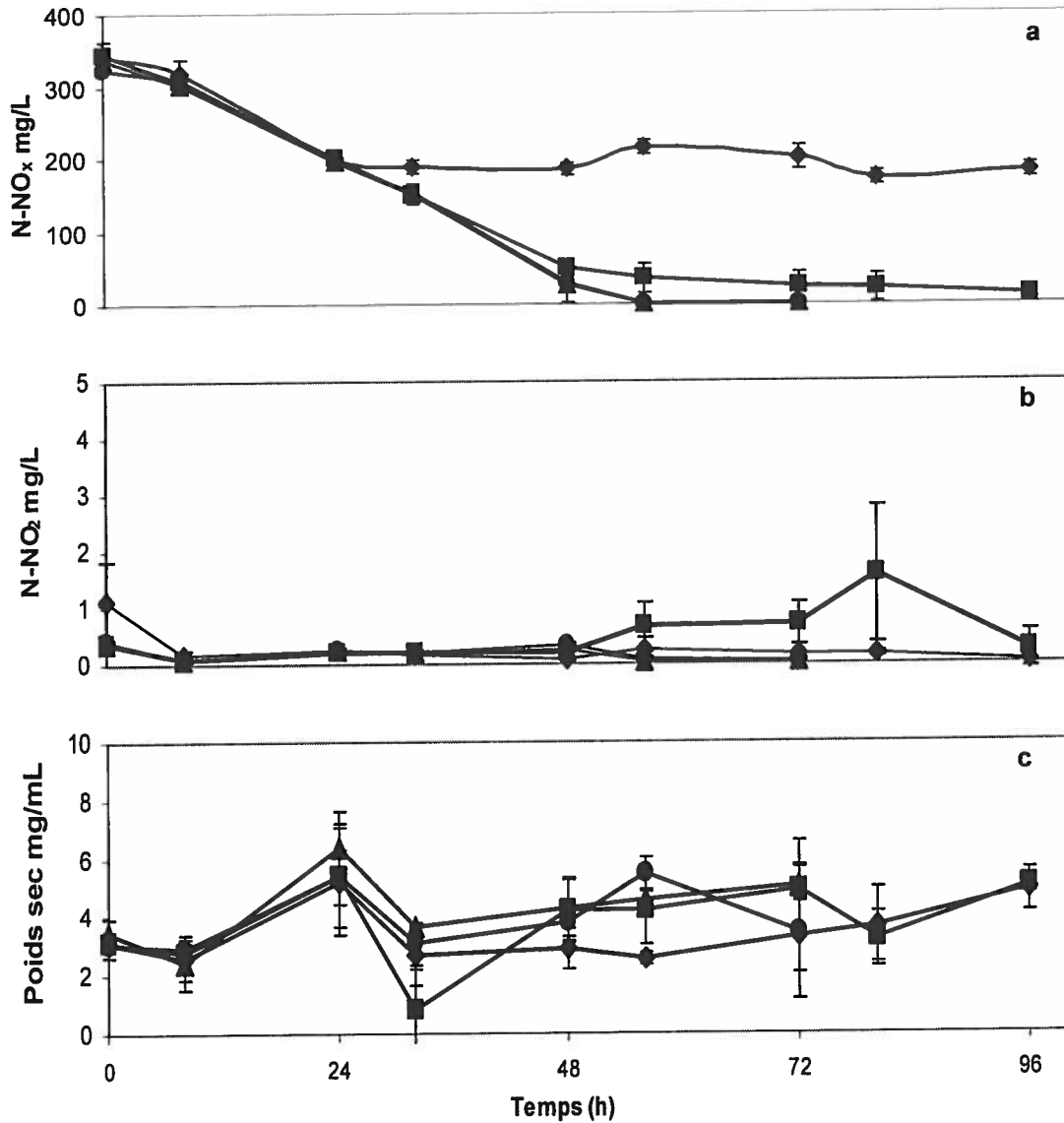


Figure 4.1 Dénitrification avec le méthanol à divers rapports C/N.
a: suivi des nitrates et des nitrites (N-NO_x), **b:** suivi des nitrites (N-NO₂),
c: poids sec du biofilm.
 ◆ C/N 0,5 ■ C/N 1,0 ▲ C/N 1,5 ● C/N 2,0

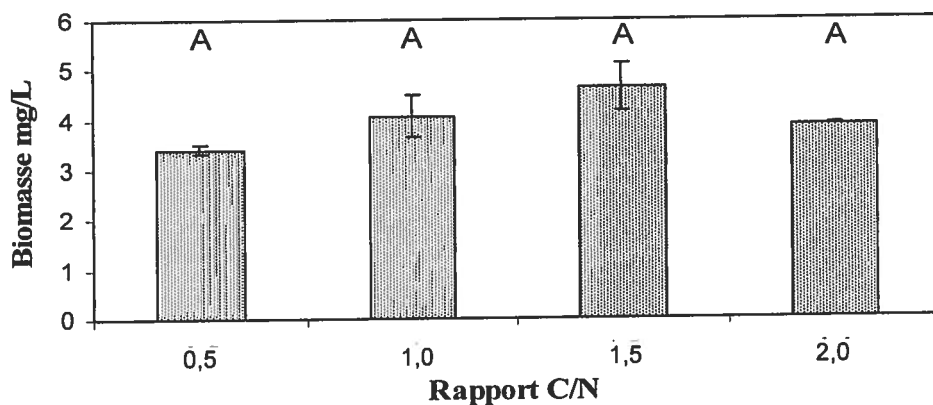


Figure 4.2 Quantité de biomasse dans les milieux aux différents rapports C/N. Les lettres « A » indiquent qu'il n'y a aucune différence significative entre les moyennes selon le test de Tukey

Rapport carbone/azote	Taux de dénitrification ¹		N-NO _x réduit (%)
	mg N-NO _x /L/h	Erreur-type	
0,5	6,16	0,64	47,1
1,0	6,20	0,14	96,5
1,5	6,48	0,24	99,9
2,0	6,94	0,19	99,8

1: Taux calculé sur la portion linéaire des courbes du graphique de la figure 4.1a

Tableau 4.1 Rendement de la biomasse dans les essais de dénitrification en fioles avec le méthanol aux rapports C/N variants de 0,5 à 2,0 C-MeOH/ N-NO₃.

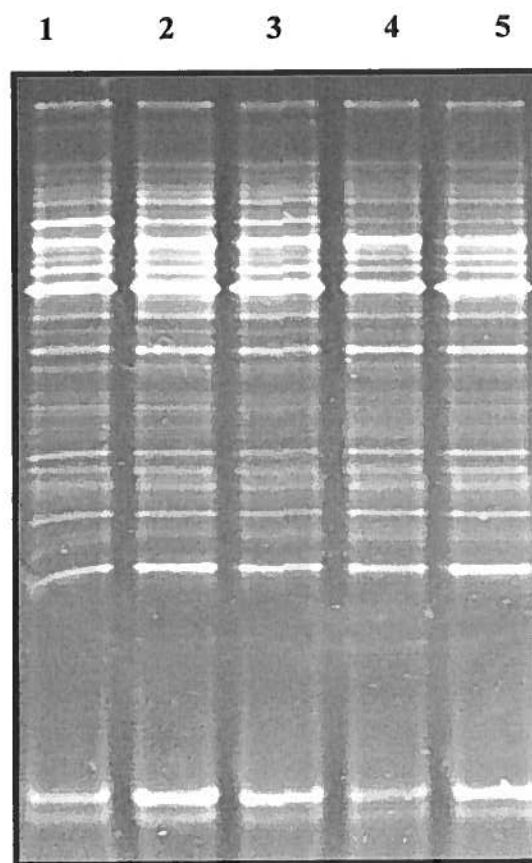


Figure 4.3 Profil de la diversité microbienne dans les essais en fioles sur les différents rapports C/N. L'ADN génomique des échantillons a été extrait et les gènes 16S ribosomiaux ont été amplifiés par PCR. Les amplicons ont ensuite été séparés par DGGE (gel 8 % acrylamide avec un gradient de 20% à 70% de dénaturants) et révélés par coloration au bromure d'éthidium. **1:** biomasse au temps 0h, **2:** C/N 0,5, **3:** C/N 1,0, **4:** C/N 1,5 et **5:** C/N 2,0.

4.2 Conservation de la biomasse du dénitrificateur

Dans le but de déterminer une méthode de conservation adéquate de la biomasse du dénitrificateur, des essais ont été menés à petite échelle. Des supports «Bioflow 9mm» colonisés ont été prélevés du dénitrificateur et conservés dans de l'eau de mer artificielle sans nitrates ni phosphates, sous différentes conditions. Ces conditions étaient: la congélation à -20°C avec ou sans glycérol 15% (v/v), la congélation à -80°C avec ou sans glycérol 15% (v/v) et la réfrigération à 4°C sans agent cryoprotectant. La biomasse a été maintenue dans ces conditions pendant différentes périodes de temps, soit 1 semaine, 1 mois, 6 mois et 17 mois. La biomasse ainsi conservée a ensuite été décongelée à la température ambiante et exposée aux conditions du dénitrificateur mais à l'échelle fioles. Pour mieux observer l'effet de la méthode de conservation de la biomasse sur l'activité de dénitrification, la quantité de nitrates ajoutée aux fioles, 300 mg N-NaNO₃/L, était bien supérieure à celle du dénitrificateur. La dénitrification a été suivie par la mesure des nitrates et des nitrites (N-NO_x) ainsi que des nitrites seuls (N-NO₂).

Les figures 4.4 à 4.7 montrent en détail les résultats obtenus et le tableau 4.2 en fournit un résumé. Après une semaine de conservation, les nitrates et les nitrites ont été réduits complètement peu importe la condition de conservation de la biomasse (figure 4.4a). De plus, aucune accumulation de nitrites n'a été observée dans les fioles. Cependant, les taux de dénitrification pour la biomasse conservée sans cryoprotectant à -20°C et à -80°C se sont avérés plus faibles que ceux dans les autres fioles. Aussi, une forte odeur de sulfure d'hydrogène a été détectée dans les échantillons de biomasse conservés à 4°C, et ce, après seulement 24 heures d'incubation à cette température.

Après un mois de conservation, les taux de dénitrification ont été très similaires dans les milieux avec la biomasse conservée avec 15% de glycérol à -80°C et à -20°C ($3,73 \pm 0,10$ et $3,80 \pm 0,19$ mg N-NO_x/L/h respectivement) comparativement au taux dans le milieu avec la biomasse fraîche ($3,71 \pm 0,16$ mg N-NO_x/L/h). Par contre, comme le montre la figure 4.5a, la dénitrification a été ralentie dans les milieux avec la biomasse conservée à 4°C, à -20°C sans glycérol et à -80°C sans glycérol. Dans ce dernier milieu, la

dénitrification a été incomplète (88,6% des N-NO_x réduits). Une accumulation de nitrites de 145,1 mg N-NO₂/L a été observée avec la biomasse conservée à 4°C. Dans les milieux avec la biomasse conservée sans glycérol à -80°C et à -20°C cette accumulation a été beaucoup plus faible soit de 31,1 et 35,4 mg N-NO₂/L (figure 4.5c).

Les résultats obtenus après six mois de conservation (figure 4.6) ont montré que les fioles avec la biomasse congelée à -20°C et à -80°C avec glycérol ont encore une fois présenté des taux de dénitrification comparables à la biomasse fraîche (tableau 4.2). Une réduction des nitrates et des nitrites incomplète accompagnée d'une accumulation des nitrites ont été observées avec biomasse congelée sans glycérol à -80°C. Le taux de dénitrification dans le milieu avec la biomasse conservée à 4°C s'est avéré très faible (1,56 ± 0,12 mg N-NO_x/L/h) comparé à la biomasse fraîche (4,62 ± 0,21 mg N-NO_x/L/h) et l'accumulation des nitrites a été très importante soit d'une concentration maximale de 185,3 mg N-NO₂/L (tableau 4.2). Les figures 4.6b et 4.6c montrent que la biomasse conservée à 4°C a réduit les nitrates préférentiellement et lorsque ceux-ci se sont épuisés, la biomasse a initié la réduction des nitrites.

C'est après la plus longue période de conservation, soit 17 mois, que les différences au niveau des rendements de la biomasse sont les plus évidentes selon la méthode de conservation (figure 4.7). Les résultats du milieu avec la biomasse conservée à 4°C ont démontré un impact négatif de cette méthode de conservation sur la dénitrification. En effet, seulement 30% des nitrites et des nitrates ont été réduits et une accumulation maximale de 140,7 mg N-NO₂/L a été atteinte (tableau 4.2). Les taux de dénitrification de la biomasse congelée sans glycérol à -20°C ou à -80°C ont encore une fois été plus faibles que la biomasse congelée avec glycérol.

Pour toute période de temps de conservation, ce sont les milieux avec la biomasse conservée avec glycérol à -20°C ou à -80°C qui ont présenté les taux de dénitrification les plus similaires à ceux de la biomasse fraîche. Par contre, seuls les milieux avec la biomasse congelée à -80°C avec 15% de glycérol n'ont jamais présenté une accumulation des nitrites et ce peu importe la période de conservation (tableau 4.2).

La diversité microbienne a également été étudiée après la plus longue période de conservation dans les différentes conditions, soit 17 mois. Les résultats présentés à la figure 4.8 montrent que la diversité de la biomasse conservée à -80°C avec ou sans glycérol (colonnes 4 et 6) est comparable en nombre d'espèces à la biomasse fraîche (colonne 2). Les profils de la biomasse conservée dans ces conditions montrent également la présence de certaines espèces que l'on retrouve dans le dénitrificateur soit les Planctomycétales, *Methylophaga* sp., les Candidate *OP11* et *Hyphomicrobium* sp. (figure 4.8, colonne 1). Une réduction de la diversité microbienne de la biomasse conservée à -20°C avec ou sans glycérol a été observée (figure 4.8, colonnes 3 et 5). Enfin, la conservation de la biomasse à 4°C a eu pour effet la diminution de la diversité microbienne et un changement des populations dans le biofilm (figure 4.8, colonne 7). Par exemple, les Planctomycétales et les Candidate *OP11* n'ont pas été détectés dans la biomasse conservée à 4°C (figure 4.8, colonne 7).

Condition	Temps de conservation	Taux de dénitrification et erreur-type (mg N-NO _x /L/h)	% de N-NO _x réduit	Accumulation des nitrites (mg N-NO ₂ /L)
-20°C + glycérol 15% (v/v)	1 sem.	5,07 ± 0,09	100	0
	1 mois	3,80 ± 0,19	100	0
	6 mois	5,12 ± 0,18	100	31,7
	17 mois	3,60 ± 0,19	100	158,7
-20°C	1 sem.	2,98 ± 0,32	100	9,7
	1 mois	2,72 ± 0,07	99,7	35,4
	6 mois	2,65 ± 0,07	97,6	93,4
	17 mois	2,41 ± 0,08	100	145,8
-80°C + glycérol 15% (v/v)	1 sem.	5,40 ± 0,31	100	0
	1 mois	3,73 ± 0,10	99,9	0
	6 mois	3,92 ± 0,14	100	0
	17 mois	3,76 ± 0,09	100	0
-80°C	1 sem.	2,78 ± 0,07	100	0
	1 mois	2,01 ± 0,05	88,6	31,1
	6 mois	2,14 ± 0,05	91,5	44,0
	17 mois	2,18 ± 0,07	93,8	35,5
4°C	1 sem.	4,74 ± 0,15	100	0
	1 mois	2,84 ± 0,10	99,7	145,1
	6 mois	1,56 ± 0,12	73,7	185,3
	17 mois	0,54 ± 0,08	30	140,7
Biomasse fraîche	1 sem.	5,18 ± 0,17	100	14,9
	1 mois	3,71 ± 0,16	98,6	0
	6 mois	4,62 ± 0,21	99,8	0
	17 mois	4,46 ± 0,36	98,6	0

Tableau 4.2 Suivi de la dénitrification avec la biomasse du dénitrificateur conservée sous différentes conditions pendant 1 semaine, 1 mois, 6 mois et 17 mois. La dénitrification est considérée comme étant complète lorsque plus de 95% des nitrates et des nitrites sont réduits. À titre de référence des milieux inoculés avec de la biomasse fraîche ont été utilisés dans les essais. La biomasse pour ces milieux de références a été prélevée du dénitrificateur 1 heure avant le début des essais. Les taux de dénitrification ont été calculés sur la portion linéaire des courbes aux figures 4.4a, 4.5a, 4.6a, et 4.7a.

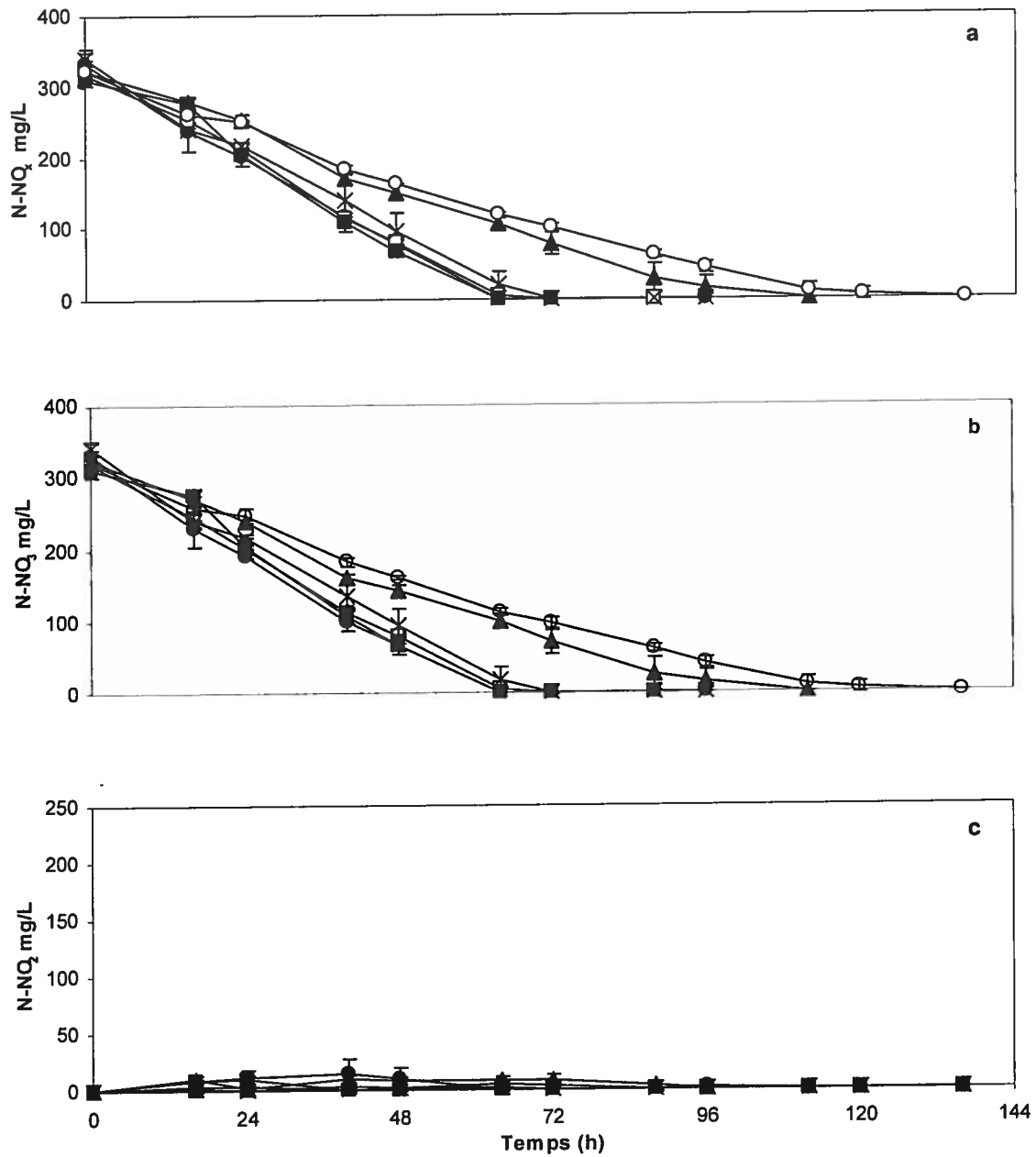


Figure 4.4 Suivi de la dénitrification des milieux inoculés avec les supports colonisés du dénitrificateur et conservés en conditions variables pendant 1 semaine. a: suivi des nitrates + nitrites (N-NO_x), b: suivi des nitrates (N-NO₃), c: suivi des nitrites (N-NO₂).

—●— Frais —□— -20°C + glycérol —▲— -20°C —■— -80°C + glycérol —○— -80°C —×— 4°C

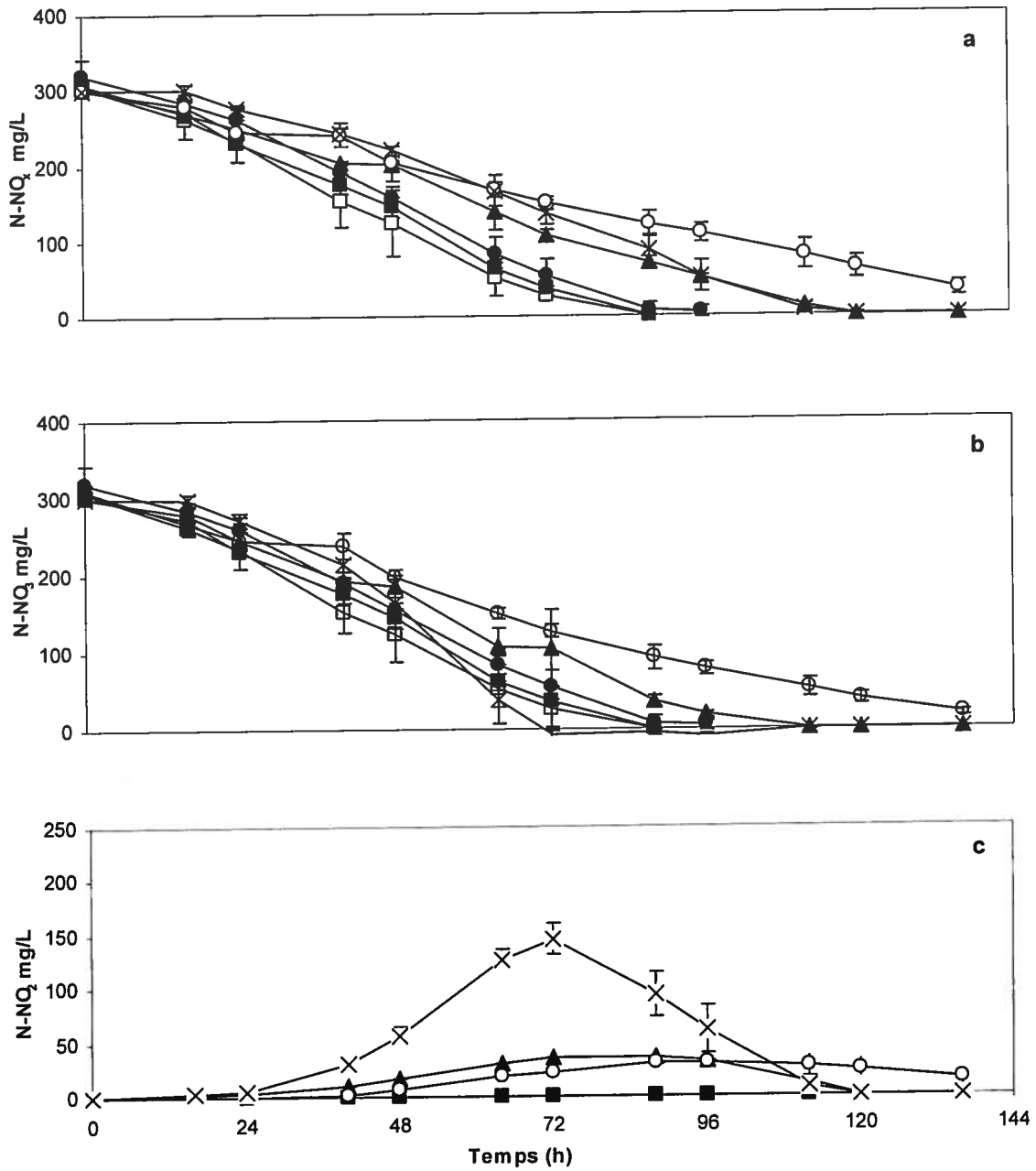


Figure 4.5 Suivi de la dénitrification dans les milieux inoculés avec les supports colonisés du dénitrificateur et conservés en conditions variables pendant 1 mois. a: suivi des nitrates + nitrites (N-NO_x), b: suivi des nitrates (N-NO₃), c: suivi des nitrites (N-NO₂).

● Frais □ -20°C + glycérol ▲ -20°C ■ -80°C + glycérol ○ -80°C × -4°C

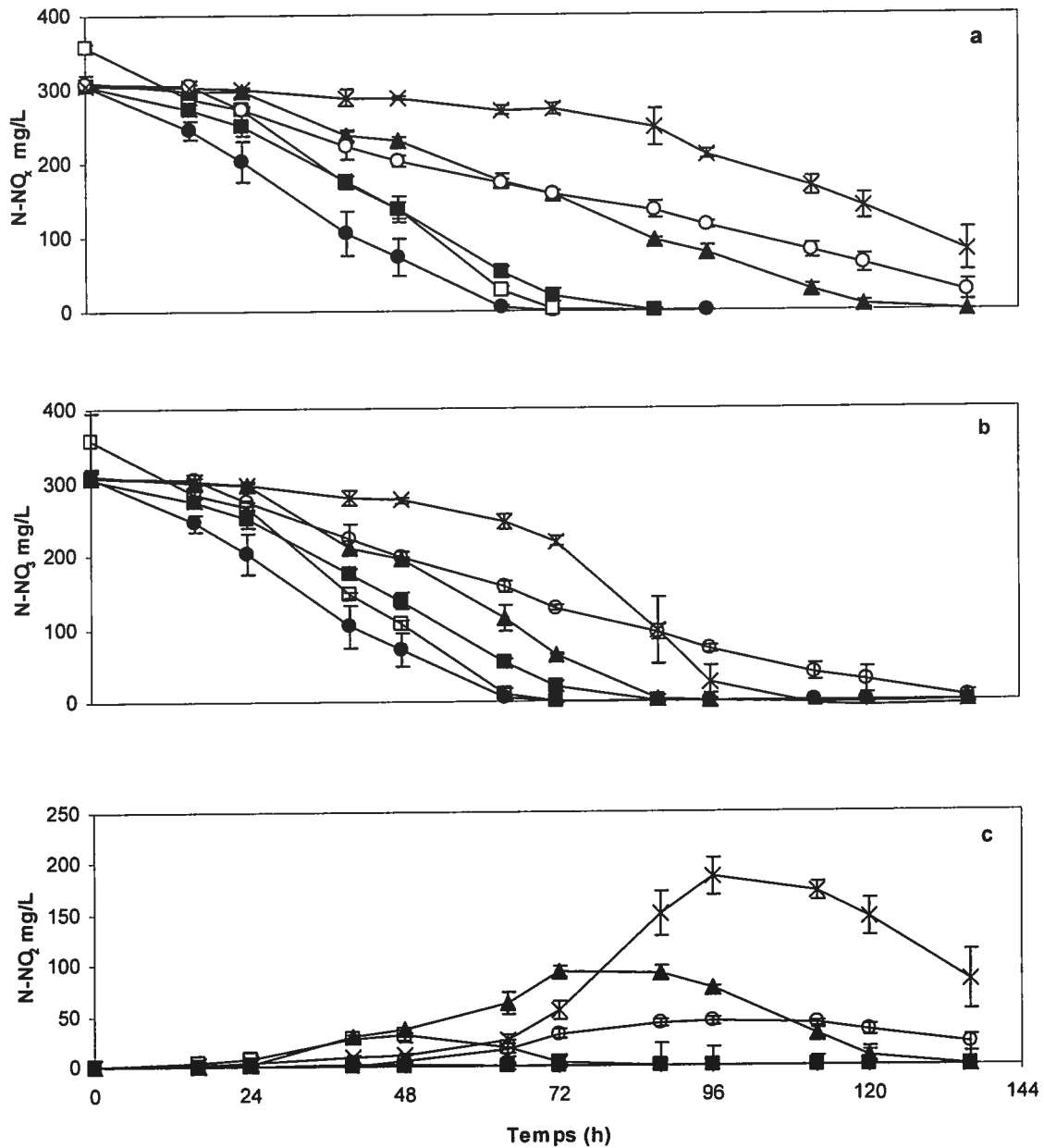


Figure 4.6 Suivi de la dénitrification des milieux inoculés avec les supports colonisés du dénitrificateur et conservés en conditions variables pendant 6 mois. **a:** suivi des nitrates + nitrites (N-NO_x), **b:** suivi des nitrates (N-NO₃), **c:** suivi des nitrites (N-NO₂).

● Frais □ -20°C + glycérol ▲ -20°C ■ -80°C + glycérol ○ -80°C × 4°C

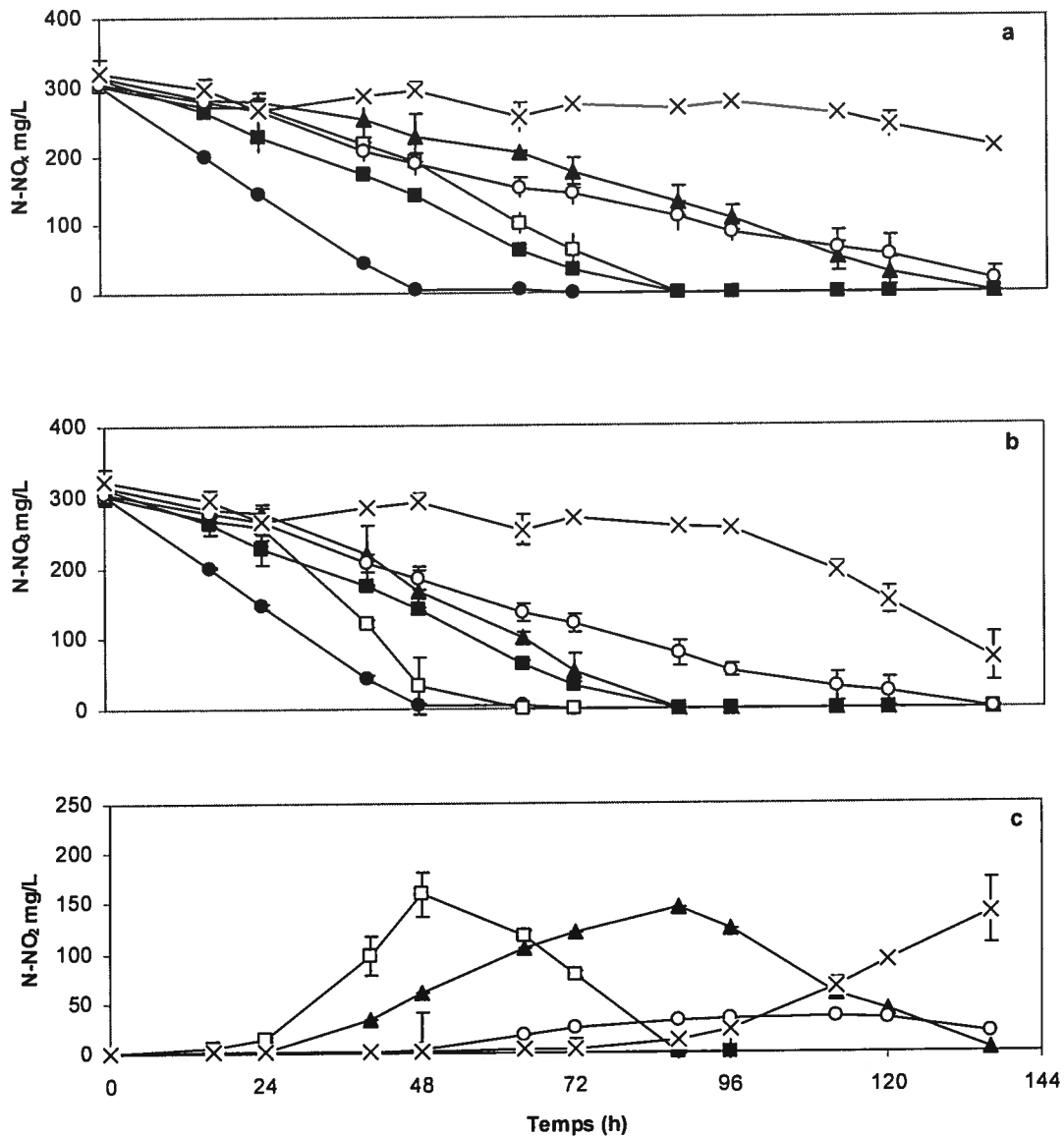


Figure 4.7 Suivi de la dénitrification dans les milieux inoculés avec les supports colonisés du dénitrificateur et conservés en conditions variables pendant 17 mois. a: suivi des nitrates + nitrites (N-NO_x), b: suivi des nitrates (N-NO₃), c: suivi des nitrites (N-NO₂).

● Frais □ -20°C + glycérol ▲ -20°C ■ -80°C + glycérol ○ -80°C × -4°C

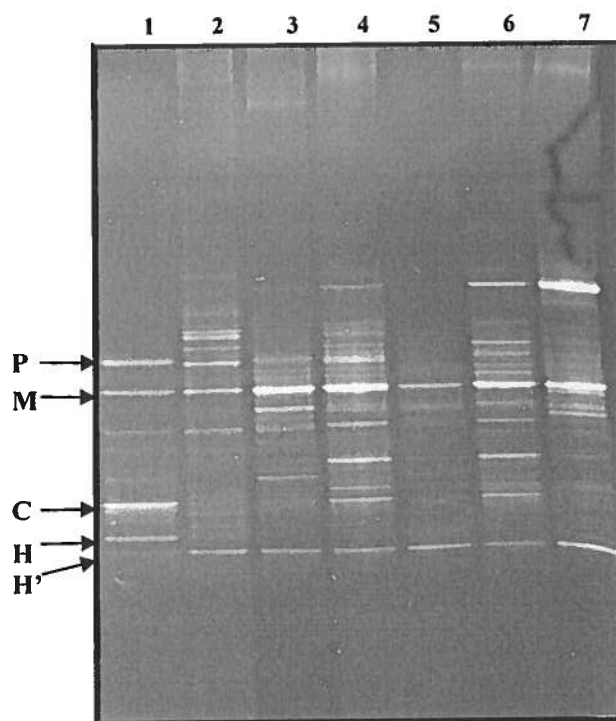


Figure 4.8. Profil de la diversité microbienne après 17 mois de conservation dans les différentes conditions. L'ADN total a été extrait de la biomasse prélevée des supports à la fin des essais. Les gènes 16S ribosomaux ont été amplifiés par PCR avant d'être séparés sur DGGE (gel 8 % acrylamide avec un gradient de 20% à 70% de dénaturants) et révélés par coloration au bromure d'éthidium. **Colonne 1:** ADN des bactéries identifiées dans le dénitrificateur, **P:** Planctomycétales, **M:** *Methylophaga* sp., **C:** Candidate *OP11*, **H** et **H':** *Hyphomicrobium* sp., **colonne 2:** biomasse à l'état frais, **colonne 3:** biomasse conservée à -20°C avec 15% (v/v) glycérol, **colonne 4:** -80°C avec 15% (v/v) glycérol, **colonne 5:** -20°C, **colonne 6:** -80°C, **colonne 7:** 4°C

4.3 Étude de la flore microbienne des unités pilotes

Afin de mieux exploiter la capacité de la flore microbienne à réduire les nitrates en azote gazeux, il est impératif de connaître l'effet des conditions d'opération du dénitrificateur sur cette flore. Quatre unités pilotes de 100 L, alimentés à partir du mésocosme du Saint-Laurent marin ont été construites en collaboration avec des étudiants et des chercheurs de l'école Polytechnique de Montréal afin d'optimiser les paramètres d'opération du système de dénitrification. Les unités pilotes ont permis l'étude des paramètres hydrauliques et microbiologiques du procédé de dénitrification. Au cours de ce projet, les microorganismes ayant colonisé ces unités pilotes ont été étudiés afin de mieux comprendre la variabilité des rendements observée.

Lors du démarrage des unités pilotes, les réacteurs étaient opérés en continu avec du méthanol ou avec de l'acétate de sodium comme source de carbone. Deux réacteurs composaient le procédé soit un désoxygénateur et un dénitrificateur. Afin d'étudier leur colonisation par la flore microbienne indigène du mésocosme, des échantillons de biomasse ont été prélevés de façon hebdomadaire dans chaque réacteur dès leur mise en opération. L'ADN génomique a été extrait de ces échantillons puis les gènes ribosomiaux 16S ont été amplifiés par PCR. Les fragments d'ADN ainsi obtenus ont été séparés par DGGE afin de visualiser la diversité microbienne au fil des semaines.

4.3.1 Évolution de la diversité microbienne dans les désoxygénateurs des unités pilotes

La diversité microbienne dans le désoxygénateur alimenté à l'acétate de sodium était estimée à 14 espèces au début de la colonisation et elle a évolué jusqu'à la semaine 5, où 17 espèces ont été détectées (figure 4.9). Le nombre d'espèces a été évalué d'après le nombre de bandes sur le profil DGGE (figure 4.9). En principe, une bande équivaut à une espèce mais l'interprétation d'un profil DGGE doit demeurer une estimation et non une valeur absolue du nombre d'espèce. La comparaison des profils du désoxygénateur alimenté à l'acétate de sodium et des espèces témoins à colonne B de la figure 4.9, montre la présence des Planctomycétales, de *Methylophaga* sp. et d'*Hyphomicrobium* sp. dès la

deuxième semaine alors que les Candidate *OP11* ne sont apparues qu'à la semaine 5. Dans le désoxygénateur alimenté au méthanol, la diversité microbienne a très peu évolué au cours des six semaines d'opération. Les Candidate *OP11* ont été détectées après trois semaines d'opération. Les espèces *Methylophaga* sp., *Hyphomicrobium* sp. et les Planctomycétales ont colonisé le réacteur dès la première semaine. Une évolution minimale a été observée au niveau de la diversité dans le désoxygénateur alimenté au méthanol. Quant au nombre d'espèces (14), il est demeuré le même au cours des six semaines d'opération.

4.3.2 Évolution de la diversité microbienne dans les dénitrificateurs des unités pilotes

Dans le dénitrificateur alimenté à l'acétate de sodium, la diversité microbienne a varié tout au long des quatre semaines d'opération (figure 4.10). À la première semaine, 15 espèces ont été révélées alors qu'à la semaine quatre, le nombre d'espèces s'élevait à 18. Les espèces témoins soit *Methylophaga* sp., les Candidate *OP11* et les Planctomycétales, sont toutes apparues dès la première semaine. Par contre, *Hyphomicrobium* sp. n'a été détecté qu'à la semaine trois. Après quatre semaines d'opération, le dénitrificateur alimenté à l'acétate de sodium était complètement colmaté par la biomasse et a dû être arrêté. La figure 4.10 montre également les résultats obtenus avec le dénitrificateur alimenté au méthanol. Les profils de la diversité microbienne observés ont varié jusqu'à la semaine cinq après quoi ils sont demeurés inchangés. Après une semaine d'opération, 19 espèces différentes ont été observées et ce nombre a diminué à 18 après sept semaines d'opération. Les espèces témoins (figure 4.10, colonne B) ont toutes été révélées à la première semaine sauf les Candidate *OP11* qui sont apparues à la semaine trois.

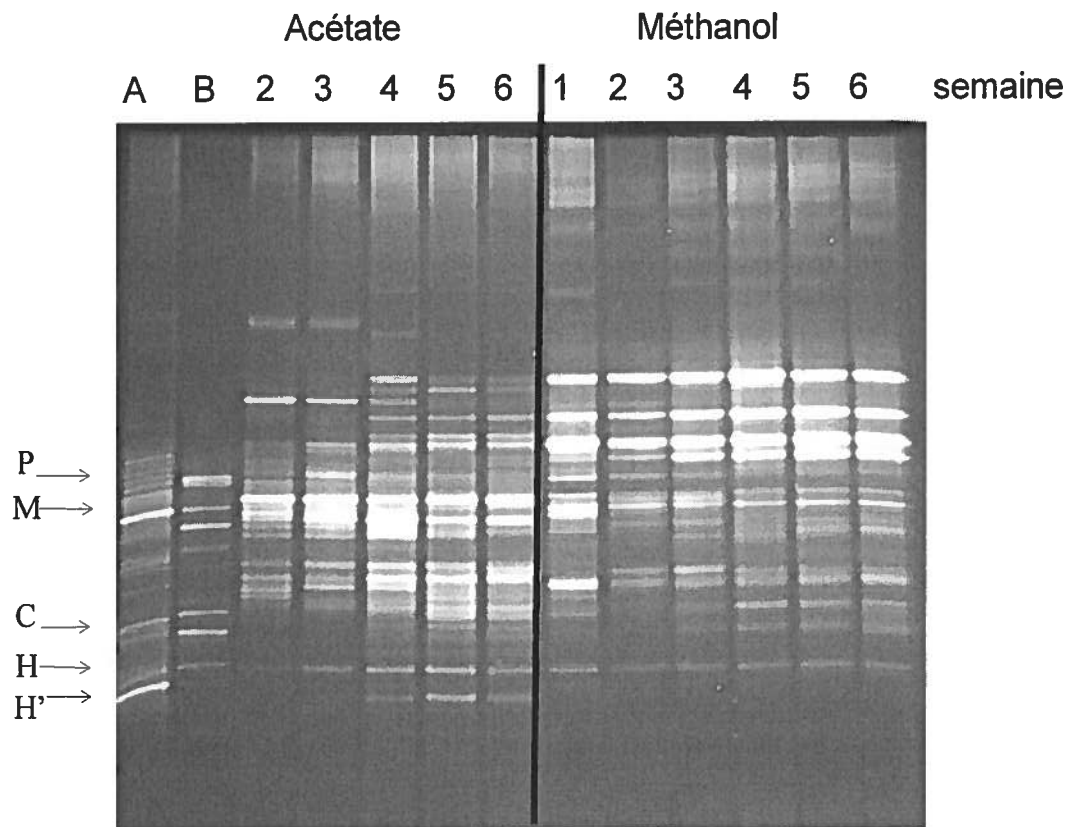


Figure 4.9 Évolution de la diversité microbienne dans les désoxygénateurs des unités pilotes alimentés à l'acétate de sodium et au méthanol pendant six semaines. L'ADN total a été extrait de la biomasse prélevée à chaque semaine. Les gènes 16S ribosomaux ont été amplifiés par PCR avant d'être séparés sur DGGE (8 % acrylamide avec un gradient de 20% à 70% de dénaturants) et révélés par coloration au bromure d'éthidium. L'échantillonnage du désoxygénateur à l'acétate de sodium a débuté qu'à la deuxième semaine d'opération. **A:** profil de la diversité microbienne du dénitrificateur, **B:** clones identifiés dans le consortium du dénitrificateur à pleine échelle **P:** Planctomycétales, **M:** *Methylophaga* sp., **C:** Candidate *OP11*, **H** et **H':** *Hyphomicrobium* sp.

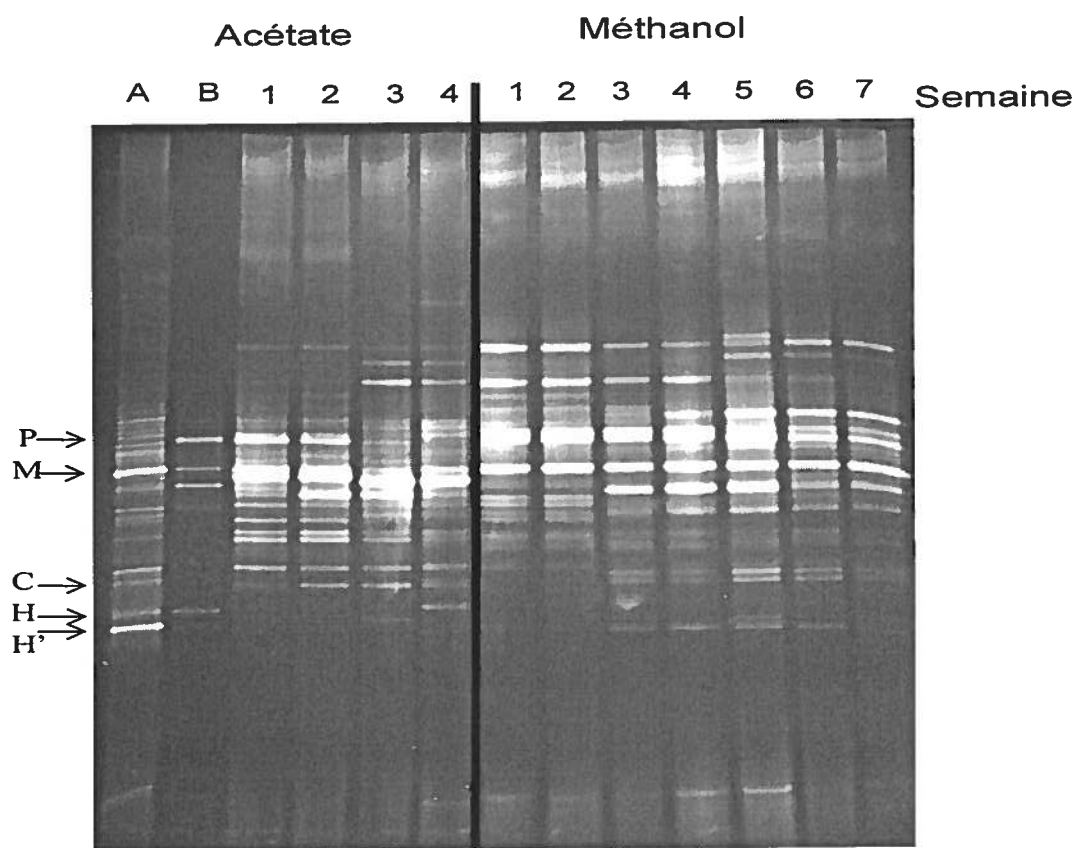


Figure 4.10 Évolution de la diversité microbienne dans les dénitrificateurs des unités pilotes alimentés à l'acétate de sodium et au méthanol pendant quatre et sept semaines respectivement. La méthode d'analyse est la même que celle décrite à la figure 4.9. **A**: profil de la diversité microbienne du dénitrificateur, **B**: clones identifiés dans le consortium du dénitrificateur à pleine échelle. **P**: Planctomycétales, **M**: *Methylophaga* sp., **C**: Candidate *OP11*, **H** et **H'**: *Hyphomicrobium* sp.

4.3.3 Effet des paramètres d'opération sur la diversité microbienne

L'effet des différents paramètres d'opération des unités pilotes sur la diversité microbienne a été étudié. Des échantillons de biomasse ont été prélevés dans les différents chémostats tout au long des essais sur les unités pilotes. L'ADN génomique de ces échantillons a été extrait puis les gènes ribosomaux 16S ont été amplifiés par PCR. La migration des fragments amplifiés sur DGGE a permis de déterminer le profil de la diversité microbienne de chaque échantillon.

L'effet de la source de carbone utilisée sur la diversité a été étudié en comparant la flore microbienne des chémostats alimentés à l'acétate de sodium à ceux alimentés au méthanol. Ainsi, les diversités microbiennes des désoxygénateurs nourris au méthanol et à l'acétate (figure 4.11, colonnes 1 et 2) étaient différentes, de même que celles des dénitrificateurs alimentés avec ces deux sources de carbone (figure 4.11, colonnes 4 et 5). La diversité du désoxygénateur et celle du dénitrificateur nourris à l'acétate étaient également différentes avec peu de bandes sur le DGGE qui ont comigré (figure 4.11, colonnes 2 et 5). La même comparaison a été faite avec les chémostats alimentés au méthanol (figure 4.11, colonnes 1 et 4). Quoique les profils soient différents, un nombre plus élevé de bandes ont comigré dans les chémostats au méthanol. L'étude de la biomasse du dénitrificateur alimenté au méthanol a permis de déterminer si la biomasse en suspension était constituée des mêmes espèces que la biomasse attachée. Les profils observés aux colonnes 3 et 4 de la figure 4.11 ont démontré des différences surtout dans la partie supérieure du DGGE. Cependant, de nombreuses espèces se retrouvaient autant attachés aux supports qu'en suspension (figure 4.11, colonne 3 et 4). Enfin, l'effet du mode d'opération sur la diversité microbienne a été étudié dans les unités pilotes alimentés au méthanol. Les résultats obtenus indiquent une variation des profils de la diversité microbienne selon le mode d'opération soit en continu ou en cuvée (figure 4.11, colonne 4 et 6). On peut également noter des variations importantes entre le profil microbien du dénitrificateur à pleine échelle, nourris au méthanol (figure 4.11, colonne 7), et ceux des dénitrificateurs des unités pilotes (figure 4.11, colonnes 3-6).

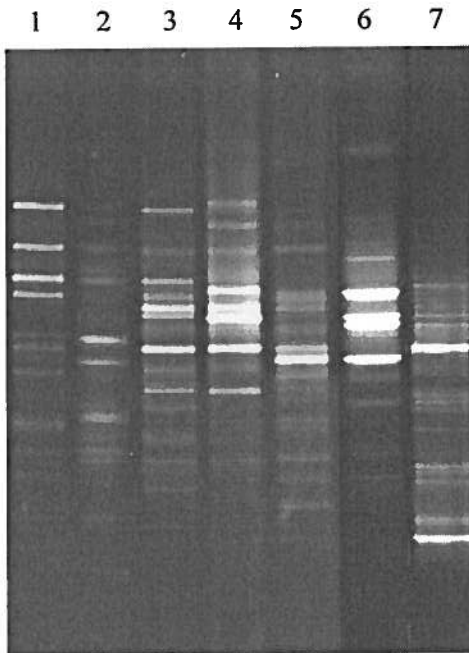


Figure 4.11 Comparaison de la diversité microbienne soumise aux différentes conditions d'opération des unités pilotes. L'ADN total a été extrait de la biomasse prélevée. Les gènes 16S ribosomiaux ont été amplifiés par PCR avant d'être séparés sur DGGE (gel 8 % acrylamide avec un gradient de 20% à 70% de dénaturant) et révélés par coloration au bromure d'éthidium. 1: désoxygénateur alimenté au méthanol, 2: désoxygénateur alimenté à l'acétate de sodium, 3: biomasse en suspension du dénitrificateur alimenté au méthanol, 4: biomasse attachée du dénitrificateur alimenté au méthanol, 5: dénitrificateur alimenté à l'acétate de sodium, 6: dénitrificateur alimenté au méthanol et opéré en mode cuvée, 7: dénitrificateur à pleine échelle alimenté au méthanol.

4.4 Caractérisation des protozoaires du dénitrificateur

Le biofilm du dénitrificateur a été échantillonné et les observations microscopiques de ce dernier ont révélé une grande diversité de protozoaires (figure 4.12). Deux méthodes ont été employées pour l'identification des populations de protozoaires soit l'identification par des observations microscopiques et grâce à la séquence des gènes ribosomiaux 18S.

4.4.1 Identification des protozoaires par microscopie

Une partie de la communauté de protozoaires a été caractérisée et identifiée par des observations microscopiques. Seuls les protozoaires avec des traits morphologiques distinctifs ont été identifiés au niveau taxonomique de la classe, de la sous-classe et dans certains cas jusqu'au genre. Les petits protozoaires (< 5 μm) et ceux se confondants au biofilm n'ont pu être identifiés par cette méthode.

L'embranchement des ciliés (lignée des alvéolobiontes) est de loin le groupe le mieux représenté tant au niveau de la diversité que de l'abondance dans le biofilm observé au microscope. À l'intérieur de ce groupe, la classe des oligohymenophorea est représentée par des protozoaires appartenant aux sous-classes des péritriches et des scuticociliés. Ainsi, le genre *Vorticella* sp. de la sous-classe des péritriches a été identifié selon certains traits morphologiques typiques soit l'attachement au biofilm par une hampe sans ramifications, le noyau en forme de fer à cheval, et les stries horizontales à sa surface (figure 4.13 a et b). Des différences mineures de ces traits morphologiques ont été observées ce qui laisse présumer la présence de plusieurs espèces de *Vorticella* sp. ou de péritriches en général (figure 4.12 a et b). Les scuticociliés sont la deuxième sous-classe des oligohymenophorea représentée dans le biofilm du dénitrificateur. Les scuticociliés identifiés *Cyclidium* sp. et *Uronema* sp. se distinguent par leur petite taille soit 15 à 25 μm , par une ciliature non somatique (ne recouvre pas la cellule en entier) ainsi que par un long cil caudal (figure 4.13c et d). Les déplacements très sporadiques de *Cyclidium* sp. permettent de le différencier d'*Uronema* sp.. Toujours dans l'embranchement des ciliés, le genre *Euplotes* sp. de la classe des spirotriches a été identifié et s'est avéré abondant dans le biofilm

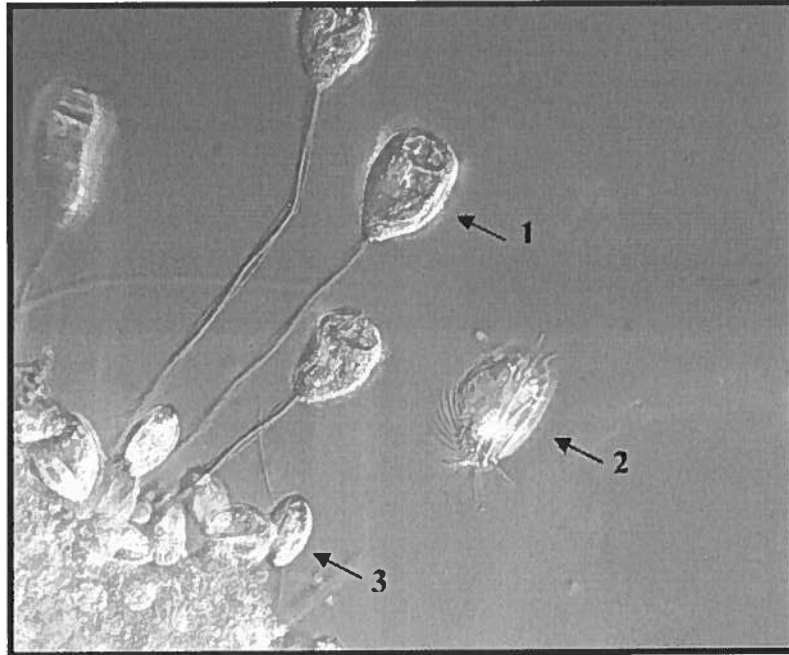
(figure 4.12a:2 et 4.14a). Dans la même classe, le genre *Aspidisca* sp. a été observé. Ce dernier est plus petit et a une forme plus arrondie que *Euplotes* sp. (figure 4.14b et c). De plus, sa trajectoire de déplacement est différente de celle de *Euplotes* sp. Différents ciliés qui semblent appartenir à la classe des Litostomatea de par leur forme allongée, leur ciliature somatique ainsi que leur mouvement ont également été observés (figure 4.15a et b).

Des choanoflagellés ont été observés sur le biofilm et sur la hampe des *Vorticella* sp. Ces protozoaires appartiennent à la lignée des opisthochontes. Les choanoflagellés sont reconnaissables au flagelle émergeant de leur collerette ainsi qu'à leur petite taille (5-7 μm) (figure 4.16a). Ils se regroupent souvent pour former des colonies (figure 4.16b).

Des protozoaires flagellés appartenant à la lignée des euglénobiontes ont été identifiés par microscopie. D'abord *Entosiphon* sp. se distingue par la présence de sillons à la surface de la cellule, mais aussi par la présence d'une structure d'ingestion très développée (figure 4.12a:3 et 4.17a). Ensuite, *Peranema* sp. a été observé et identifié entre autres par son énorme flagelle dirigé vers l'avant et son mouvement de glissement (gliding) (figure 4.17b).

Finalement, des organismes amiboïdes de différentes tailles ont été remarqués mais leur identification par observation microscopique reste indéterminée (figure 4.18a). D'autres eucaryotes ont également été observés tels que des nématodes (figure 4.18b) mais également différentes espèces de diatomées (lignée des straménopiles).

a



b

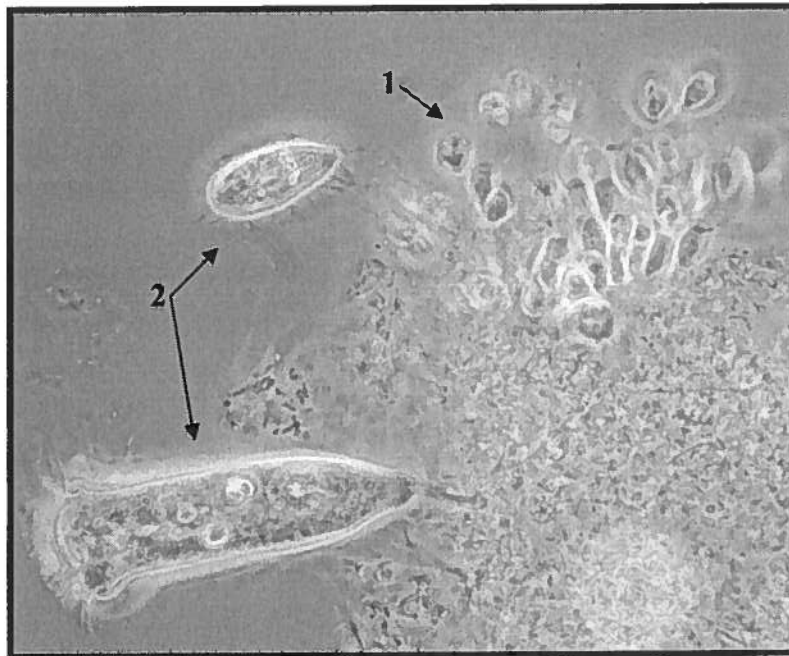


Figure 4.12 Diversité des protozoaires dans le biofilm du dénitrificateur.
a: contraste de Nomarski 600X, 1: *Vorticella* sp., 2: *Euplotes* sp., 3: *Entosiphon* sp. **b:** contraste de phase 600X, 1: colonie de choanoflagellés, 2: diversité de ciliés.

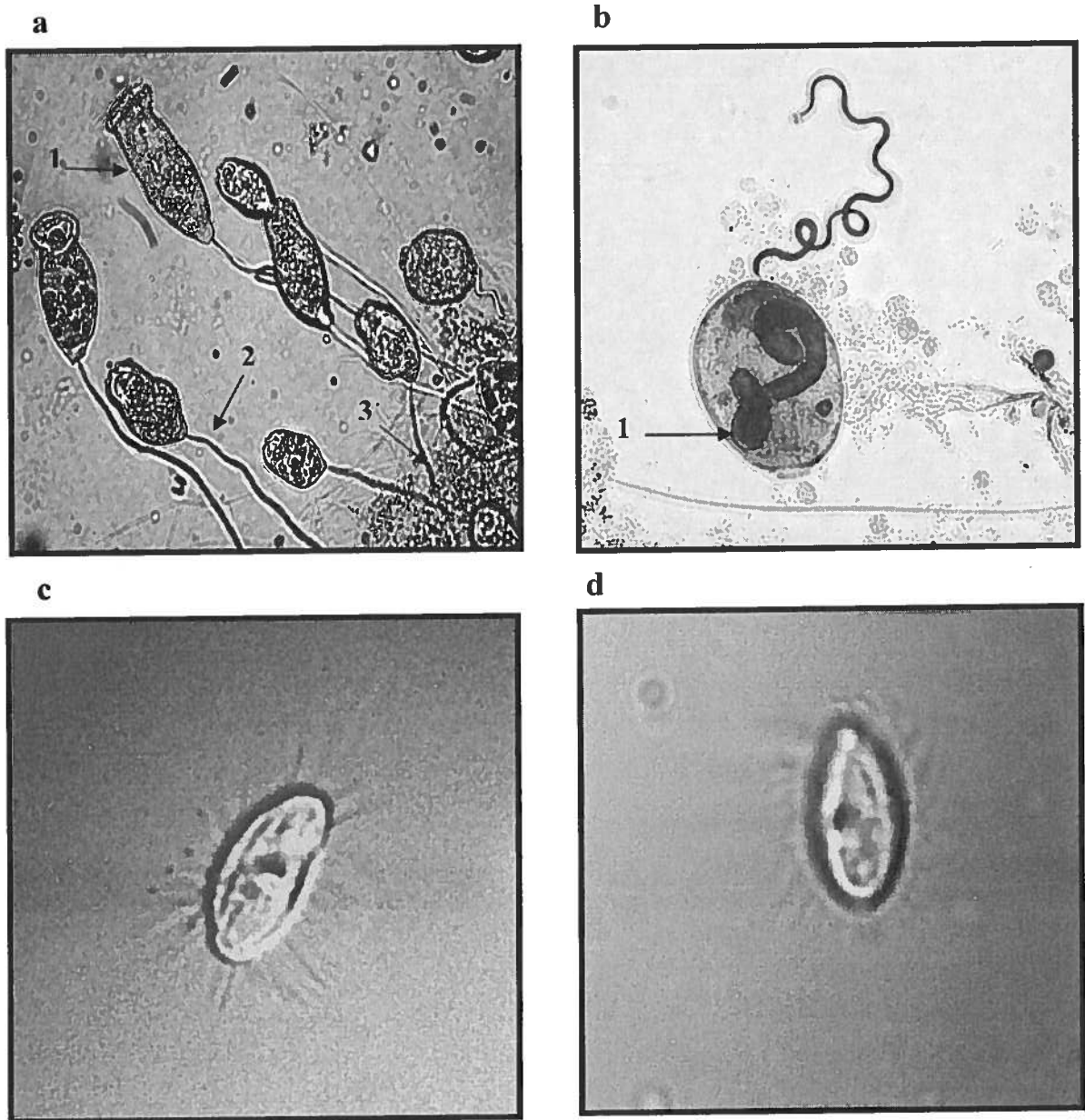


Figure 4.13 Observations microscopiques des ciliés du biofilm appartenant à la classe des oligohymenophorea. a: *Vorticella* sp., contraste de phase, 400X, 1: stries horizontales, 2: hampe, 3: biofilm, **b:** *Vorticella* sp., contraste de phase, 400X, 1: noyau, **c:** *Cyclidium* sp., contraste de Nomarski, 600X, **d:** *Uronema* sp., contraste de Nomarski, 600X. *Vorticella* sp. (a et b) s'inscrit dans la sous-classe des péritriches alors que *Cyclidium* sp. et *Uronema* sp. (c et d) s'inscrivent dans la sous-classe des scuticociliés.

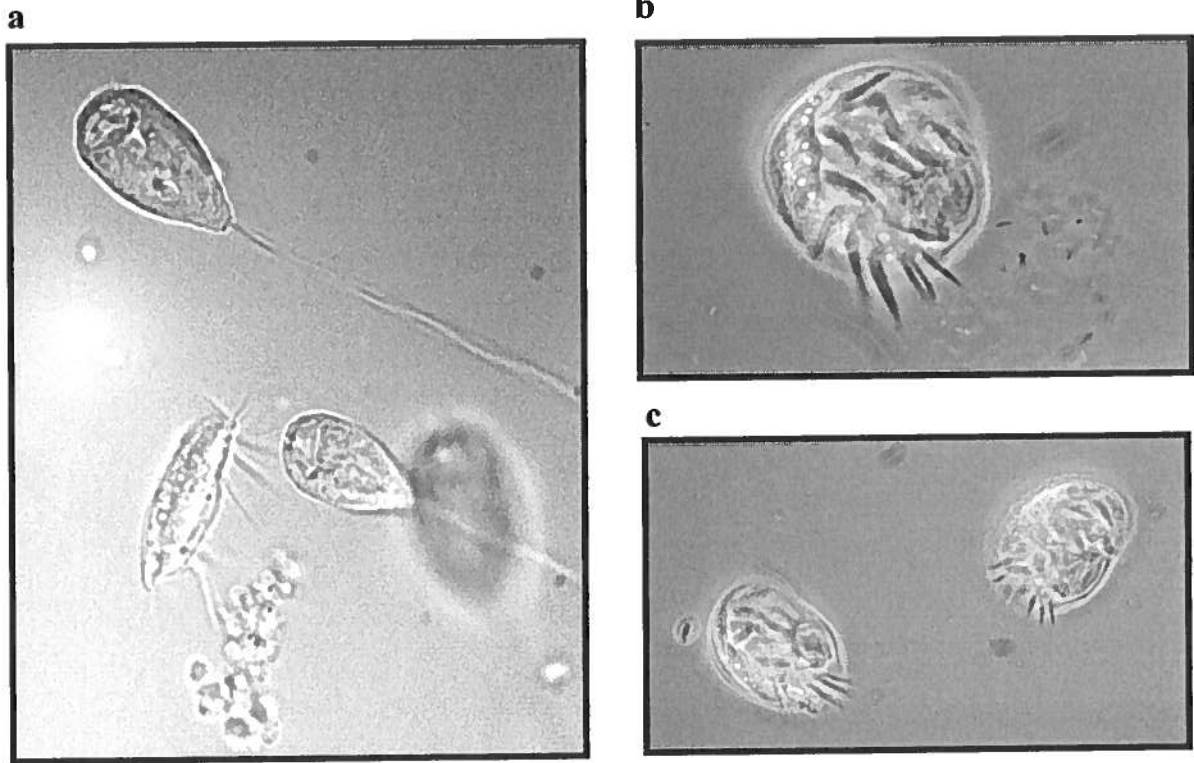


Figure 4.14 Observations microscopiques des ciliés du biofilm appartenant à la classe des spirotriches. a: *Euplotes* sp. marche sur le biofilm, contraste de Nomarski 600X. b et c: *Aspidisca* sp., Contraste de phase 600X

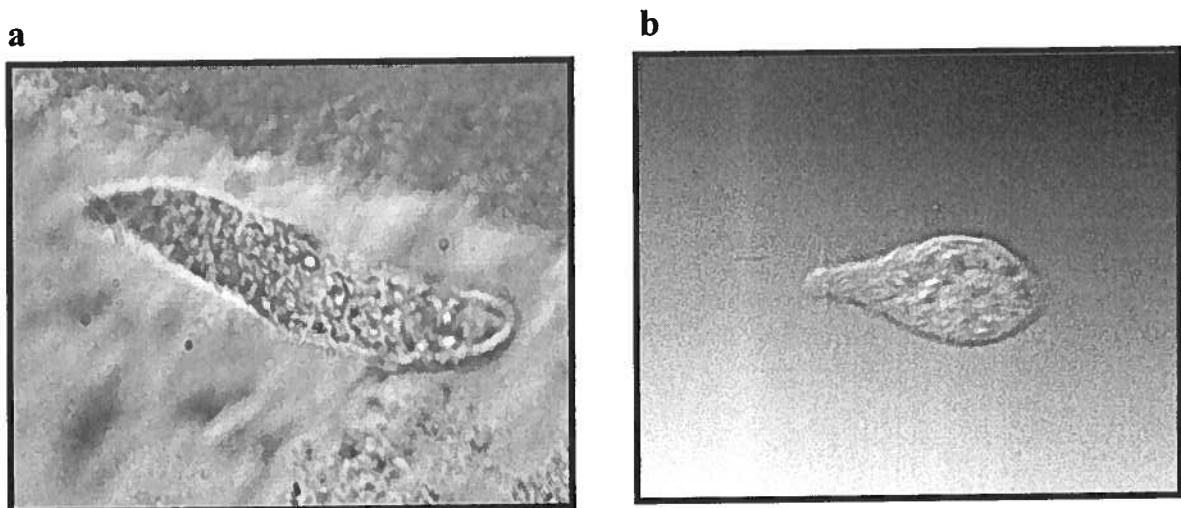


Figure 4.15 Observations microscopiques des ciliés du biofilm appartenant à la classe des Litostomatea. a: contraste de phase 100X. b: contraste de Nomarski 600X

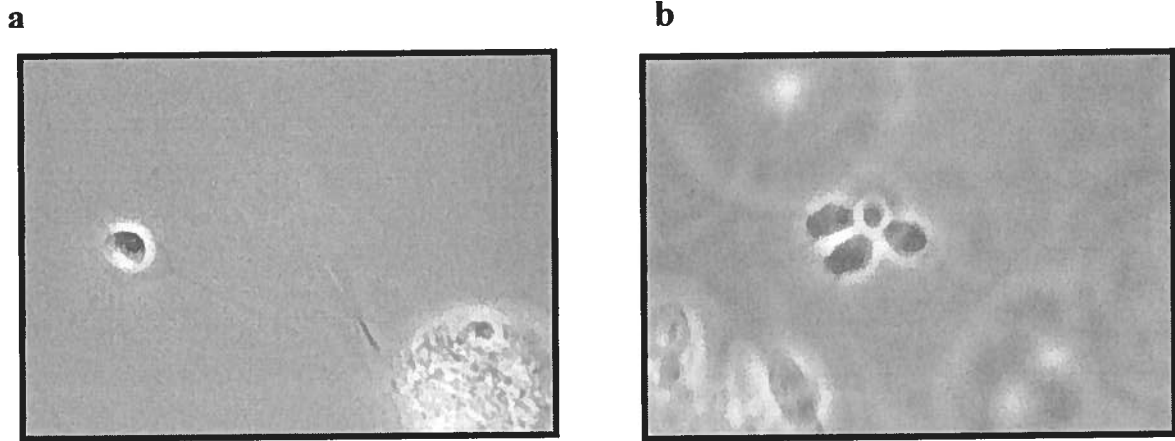


Figure 4.16 Observations microscopiques des opisthochontes du biofilm. Contraste de phase, 1000X. **a:** choanoflagellé attaché au biofilm. **b:** colonie de choanoflagellés.

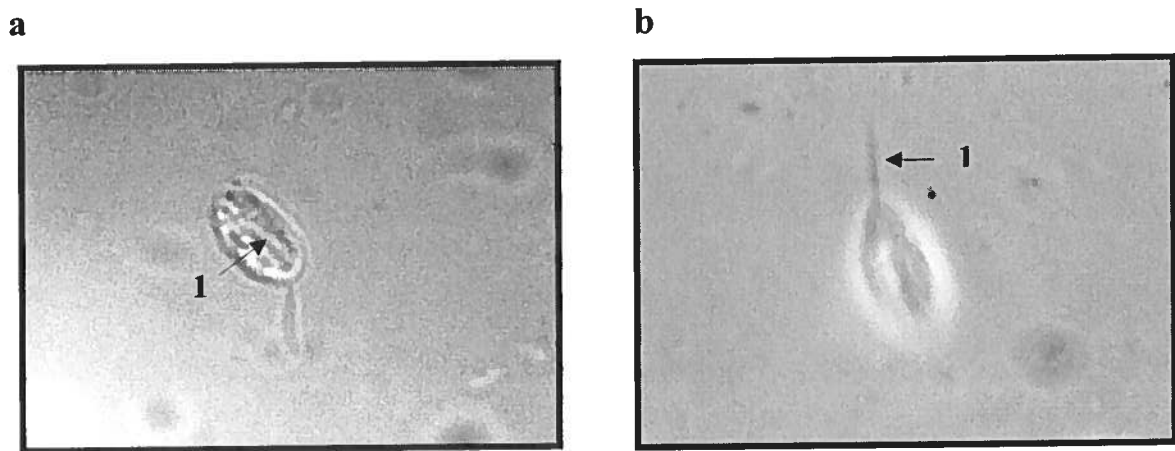


Figure 4.17 Observations microscopiques des euglénobiontes du biofilm.
a: *Entosiphon* sp.1: structure d'ingestion, contraste de Nomarski 600X. **b:** *Peranema* sp. 1: flagelle rigide en aval, contraste de phase, 1000X.

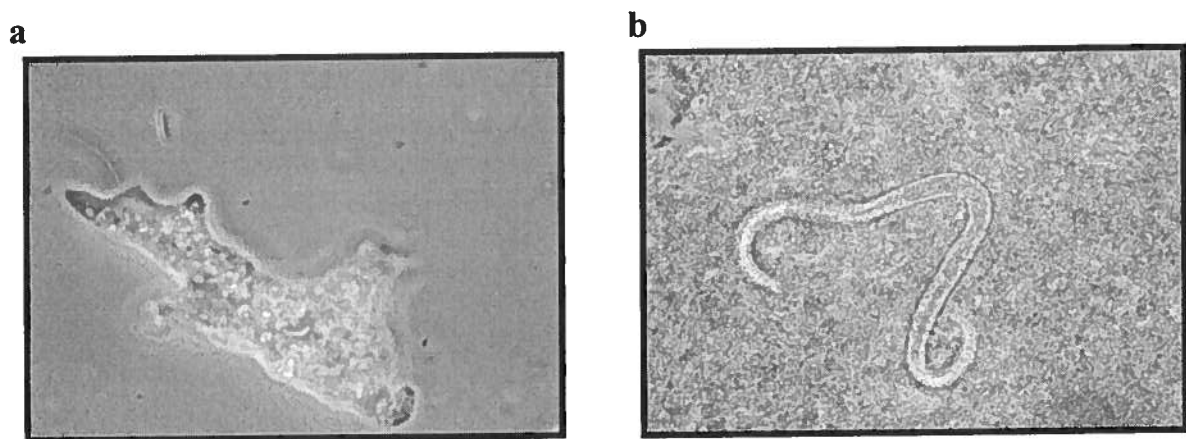


Figure 4.18 Observations microscopiques du biofilm. **a:** organisme amiboïde, contraste de phase, 1000X. **b:** nématode, contraste de phase 100X

4.4.2 Identification des protozoaires au moyen d'une génothèque d'ADNr 18S

Des échantillons de biofilm ont été prélevés du dénitrificateur et ont été traités de façon à concentrer les protozoaires. L'ADN génomique a ensuite été extrait de ces échantillons et les gènes ribosomaux 18S ont été amplifiés par PCR. Les fragments amplifiés ont été clonés dans des vecteurs plasmidiques. Des cellules compétentes ont ensuite été transformées avec ces vecteurs. Au total, 159 clones ont été produits et le criblage de ces derniers a généré 32 groupes avec des profils de restriction enzymatique distincts. Un clone représentatif de chaque groupe a été séquencé. Les séquences nucléotidiques des 32 clones représentatifs ont été ajoutées à la banque de données «GenBank» sous les numéros AY835672 à AY835703. Les séquences nucléotidiques ont été comparées avec les différentes banques de données pour permettre leur identification. Les résultats obtenus sont détaillés au tableau 4.3.

L'identification au niveau de l'espèce a été possible lorsque l'homologie était de 99% et plus sur une longueur de séquence minimale de cinq cents nucléotides. Ainsi, quatre clones ont été identifiés jusqu'à l'espèce. Il s'agit de *Euplotes minuta* (clone IAFDv11), *Neoparamoeba pemaquidensis* (IAFDv35), *Salpingoeca infusionum* (IAFDv90) et *Uronema marinum* (IAFDv145) (tableau 4.3). Comme le montre le tableau 4.3, plusieurs clones ont présenté une homologie de plus de 95% avec des protozoaires connus ce qui permet une identification au niveau du genre ou du moins au niveau de la classe de protozoaires. Des clones de la génothèque se sont apparentés (entre 90 et 95% d'homologie) aux diverses lignées de protozoaires soit les alvéolobiontes, les straménopiles, les opisthochontes, ainsi qu'aux ramicristae, des protozoaires de type amiboïde. De plus, certains clones se sont apparentés (97,6%) à un métazoaire, *Pellioditis mediterranea*, un nématode que l'on retrouve en eau de mer. D'autre part, 14,5% des clones de la génothèque ont démontré de faibles pourcentages d'homologie avec des protozoaires et particulièrement avec des champignons connus. Ceci suppose que des microorganismes présents et représentés par les séquences d'ADNr 18S n'ont jamais été isolés ou leur gène 18S ribosomal n'a jamais été séquencé (tableau 4.3). Des résultats plus détaillés sur ce groupe de clone dont l'affiliation est incertaine sont décrits à la section 4.4.4. Aucune chimère ne fut détectée par les logiciels «CHIMERA_CHECK» et «BELLEROPHON».

Clone représentatif	Nb de clone (s)	Identification (Blastn)	Homologie % (Blastn)	Longueur de la séquence (nu) (Blastn)	Identification (FASTA)	Homologie % (FASTA)
IAFDv1 AY835672	41	Eucaryote non cultivé (cilié) AJ130855	95	851	Eucaryote non cultivé (cilié) AJ130855	95,3
IAFDv3 AY835673	4	<i>Aspidisca steini</i> AF305625	95	358*	Eucaryote non cultivé AY180030	88,3
IAFDv6 AY835674	8	<i>Trimyema minutum thermophilum</i> AJ292526	88	438*	<i>Plagiopyla frontana</i> Z29440	84,6
IAFDv7 AY835675	2	<i>Phyllobaeis erythrella</i> AF491848	89	354*	Eucaryote non identifié AJ130850	85,1
IAFDv11 AY835676	1	<i>Euplotes minuta</i> AJ305246	100	1094	<i>Euplotes minuta</i> AJ305246	99,7
IAFDv12 AY835677	1	<i>Parauronema longum</i> AY212807	96	1041	<i>Parauronema longum</i> AY212807	96,2
IAFDv16 AY835678	14	<i>Cryptocaryon irritans</i> AF351579	96	489*	<i>Cryptocaryon irritans</i> AF351579	92,7
IAFDv20 AY835679	25	<i>Acineta</i> sp. AY332719	89	316*	<i>Acineta</i> sp. AY332717	85,8
IAFDv24 AY835680	1	<i>Hyaloraphidium curvatum</i> HCU17504	92	464*	<i>Mortierella wolfii</i> AF113425	89,6
IAFDv26 AY835681	4	<i>Thraustochytrium multirudimental</i> AB022111	93	376*	Eucaryote non cultivé AY381191	84,7
IAFDv27 AY835682	5	<i>Opisthonecta henneguyi</i> X5631	97	1070	<i>Opisthonecta henneguyi</i> X5631	96,8
IAFDv30 AY835683	2	<i>Balamuthia mandrillaris</i> AF477022	95	349*	<i>Smittium phytotelmatum</i> AF277025	76,1
IAFDv34 AY835684	2	<i>Actinotaenium phymatosporum</i> APH428088	98	189*	<i>Allomyces arbuscula</i> AY552524	79,7
IAFDv 35 AY835685	1	<i>Neoparamoeba pemaquidensis</i> AF371967	99	898	<i>Neoparamoeba pemaquidensis</i> AF371967	99,3
IAFDv37 AY835686	4	<i>Lagynion scherffelii</i> AF123288	85	288*	<i>Haslea crucigera</i> AY485482	78,4
IAFDv41 AY835687	2	<i>Enchelyodon</i> sp. ESU80313	89	411*	<i>Didinium nausatium</i> U57771	88,1

* Segment nucléotidique le plus long de la séquence entrecoupée.

Tableau 4.3 Résultats de la génothèque visant les protozoaires du dénitrificateur. Les 159 clones de la génothèque ont subi plusieurs criblages afin de regrouper ceux étant identiques. Au total, 32 groupes distincts ont été formés et un clone représentatif de chaque groupe a été séquencé puis comparé aux banques de données à l'aide de deux logiciels soit «Blastn» et «FASTA».

Clone représentatif	Nb de clone (s)	Identification (Blastn)	Homologie % (Blastn)	Longueur de la séquence (nu) (Blastn)	Identification (FASTA)	Homologie % (FASTA)
IAFDv42 AY835688	1	<i>Labyrinthula</i> sp. AB095092	91	499*	<i>Labyrinthula</i> sp. AB022105	84,6
IAFDv46 AY835689	6	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> Z32848	96	339*	<i>Candida catenulata</i> AB0113539	82,1
IAFDv47 AY835690	3	<i>Candida blankii</i> AB018125	93	372*	<i>Dermocystidium percae</i> AF533949	82,9
IAFDv50 AY835691	2	<i>Pellioiditis mediterranea</i> AF083020	97	877	<i>Pellioiditis mediterranea</i> AF083020	97,6
IAFDv53 AY835692	2	<i>Epistylis chrysemydis</i> AF335514	91	715*	Eucaryote non identifié AJ130855	94,7
IAFDv90 AY835693	5	<i>Salpingoeca infusionum</i> AF100941	99	526*	Eucaryote non identifié AY789789	99,7
IAFDv98 AY835694	1	Eucaryote non identifié AJ130863	87	348*	<i>Genistelloides hibernus</i> AF007536	73,8
IAFDv104 AY835695	4	<i>Euplotes musicola</i> AJ305254	88	383*	<i>Moneuplotes crassus</i> AF508761	82,1
IAFDv110 AY835696	2	Eucaryote non identifié AJ130849	96	971	Eucaryote non identifié AJ130849	96,4
IAFDv128 AY835697	5	<i>Ophrydium versatile</i> AF401526	96	1013	<i>Ophrydium versatile</i> AF401526	96,3
IAFDv129 AY835698	1	<i>Acaulospora trappei</i> Y17634	92	367*	<i>Allomyces arbuscula</i> AY552524	81,7
IAFDv130 AY835699	2	<i>Trimyema minutum thermophilus</i> AJ292526	87	432*	<i>Trimyema Compressum</i> Z29438	82,8
IAFDv138 AY835700	1	<i>Vexillifera minutissima</i> AY294149	90	177*	<i>Conidiobolus lamprauges</i> AF296754	69,5
IAFDv143 AY835701	5	<i>Euplotes harpa</i> AJ811015	89	459*	<i>Euplotes raikovi</i> AJ305251	83,8
IAFDv145 AY835702	1	<i>Uronema marinum</i> AY551905	100	1007	<i>Uronema marinum</i> AY551905	99,7
IAFDv153 AY835703	1	<i>Hemiophrys procera (Amphileptus)</i> AY102175	96	428*	<i>Hemiophrys procera (Amphileptus)</i> AY102175	93,5

* Segment le plus long de la séquence entrecoupée.

Tableau 4.3 (suite) Résultats de la génothèque visant les protozoaires du dénitrificateur

4.4.3 Analyse de raréfaction

L'analyse de raréfaction a permis d'estimer la diversité eucaryotique sur la totalité de la génothèque. Ainsi, la diversité des protozoaires (incluant d'autres eucaryotes) de la génothèque a été estimée entre 30 et 35 espèces (figure 4.19). La tendance de la courbe vers un plateau à la figure 4.19, indique que la quantité de clones générés et examinés était suffisante pour révéler la majorité de la diversité des protozoaires dans le biofilm du dénitrificateur.

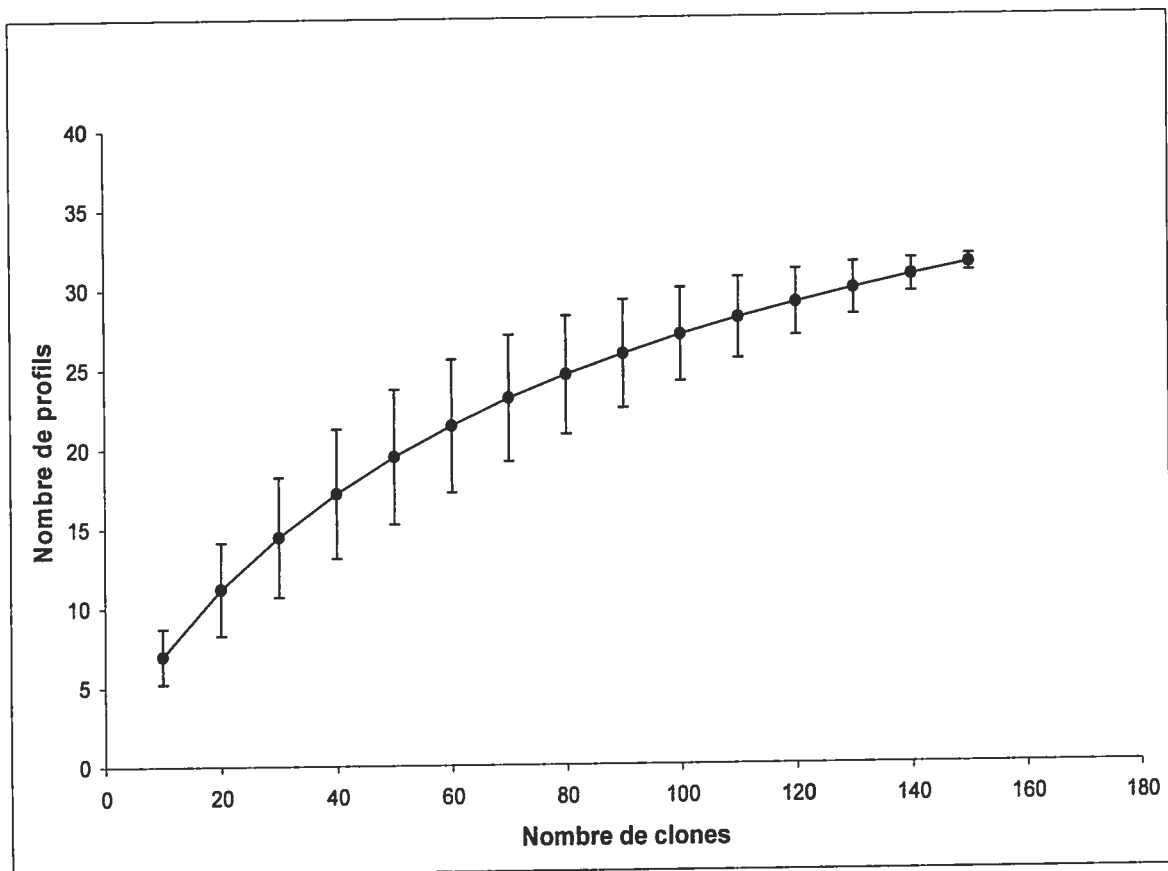


Figure 4.19 Analyse de raréfaction de la génothèque d'ADNr 18S. La courbe de raréfaction a été générée à partir des groupes de clones ayant des profils de restriction enzymatique différents.

4.4.4 Étude phylogénétique des clones de la génothèque

L'étude phylogénétique des 32 clones représentatifs a permis de classer ces derniers dans les trois arbres consensus présentés à la figure 4.20, 4.21 et 4.22. Cette classification permet entre autres d'apporter des indications quant à la nature possible des clones qui présentent des divergences plus élevées avec les séquences d'ADNr 18S des banques de données.

La moitié des clones représentatifs de la génothèque se sont apparentés aux alvéolobiontes et plus particulièrement aux ciliés. Ceux-ci représentent en nombre 121 clones soit 76,1% de la génothèque (figure 4.20). Parmi ceux-ci, 41 clones (34% des clones s'affiliant aux ciliés) sont représentés par IAFDv1 et ils se sont apparentés à un cilié non cultivé (AJ130855). L'homologie du clone IAFDv1 avec le cilié AJ130855 s'est élevée à 95,3%. La classification phylogénétique du clone IAFDv1 a mis en évidence son affiliation avec la classe des oligohymenophorea et la sous-classe des pérित्रiches (figure 4.20). Comme le montre la figure 4.20, la classe des oligohymenophorea a été la mieux représentée en diversité et en nombre dans l'arbre phylogénétique des alvéolobiontes. Ainsi, six clones avec des profils de restriction enzymatique différents se sont affiliés à cette classe et ils représentent en nombre 45,5% des clones s'apparentant aux ciliés. Les autres clones s'affiliant aux ciliés ont été distribués dans les classes des Spirotrichea, des Litostomatea, des Phyllopharyngea et des Prostomatea.

La figure 4.21 regroupe les clones s'apparentant aux autres lignées d'eucaryotes. Seulement deux clones, IAFDv42 et IAFDv26, se sont apparentés au straménopiles ce qui représente 3,1% de la génothèque. La lignée des opisthochontes a été représentée par 4,4% des clones de la génothèque avec deux clones représentatifs, IAFDv90 qui s'est inscrit dans l'embranchement des choanoflagellés et IAFDv50 qui s'est inscrit dans l'embranchement des métazoaires. Les métazoaires ne sont pas considérés comme des protozoaires. En effet, le clone IAFDv50 s'est apparenté aux nématodes qui font partie des métazoaires. Le clone représentatif IAFDv110 a présenté 96,4% d'homologie avec un champignon non cultivé (AF372713) isolé des sédiments anoxiques marins. Le même

pourcentage d'homologie a été observé avec un eucaryote non cultivé (AJ130849). Par contre l'analyse phylogénétique du clone IAFDv110, a montré que ce dernier était plus apparenté au champignon non cultivé (AF372713) (figure 4.21). La classification phylogénétique du clone IAFDv35 a montré son affiliation avec des organismes amiboïdes, les ramicristae.

L'affiliation phylogénétique de 14,5% des clones de la génothèque distribués sur 10 profils de restriction enzymatique différents n'a pu être déterminée. Ces clones sont regroupés dans l'arbre phylogénétique de la figure 4.22. Deux de ces clones (IAFDv24 et IAFDv7) représentatifs sont des proches parents des champignons mais la plupart se sont embranchés ensemble et ils se sont enracinés directement à la base de l'arbre phylogénétique.

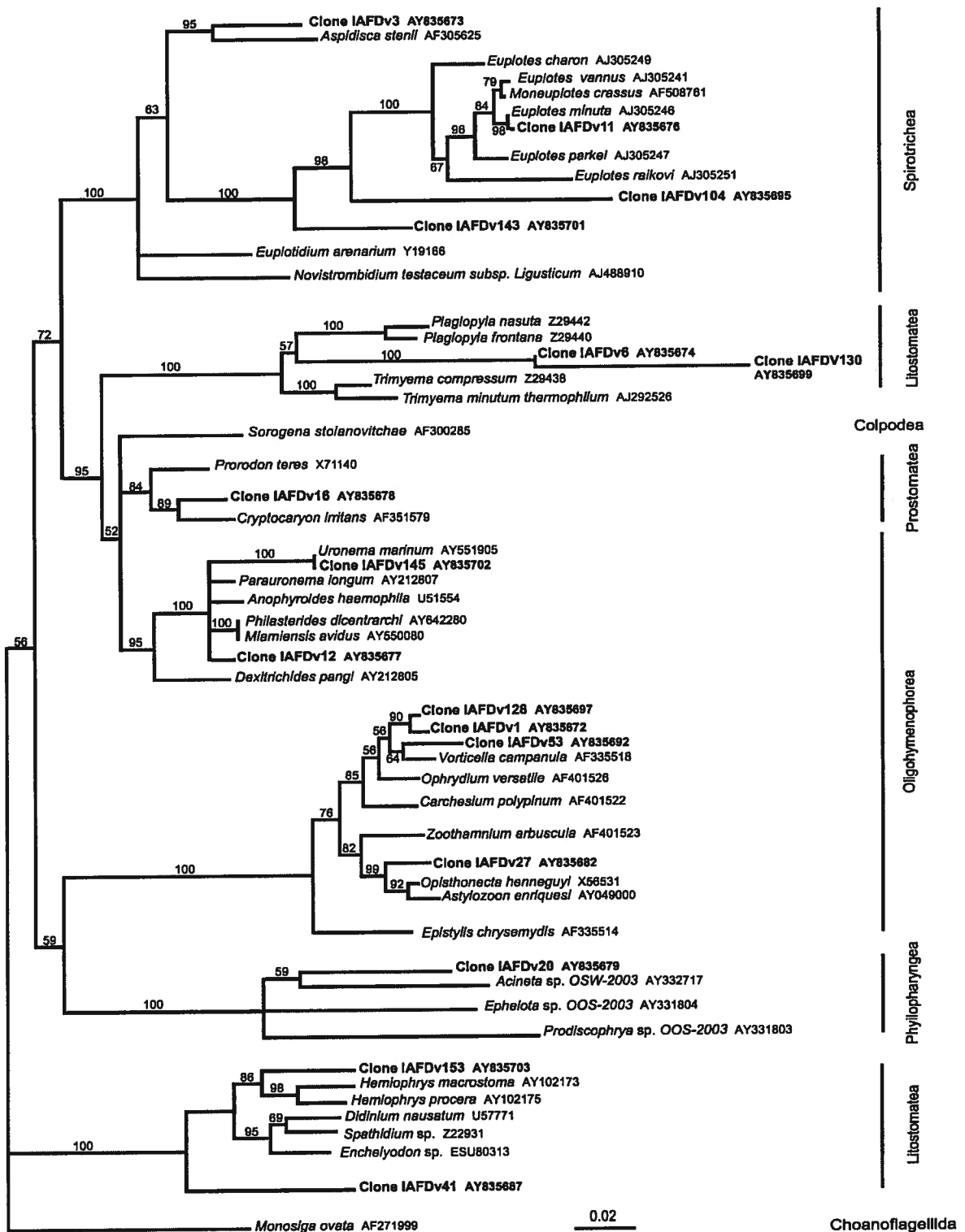


Figure 4.20 Classification phylogénétique des alvéolobiontes. Arbre consensus non enraciné (*Monosiga ovata* à titre d'extragroupe) démontrant la position des clones de la génothèque d'ADN 18S qui s'apparentent aux différentes classes des ciliés dans la lignée des alvéolobiontes. Les nombres aux nœuds représentent les pourcentages (>50%) obtenus à l'analyse «bootstrap» qui supporte l'analyse des distances. Les clones et leurs numéros d'identification dans «GenBank» sont indiqués en caractères gras. La classification taxonomique est basée sur celle de Lee et ses collaborateurs (2000) (Society of protozoologists).

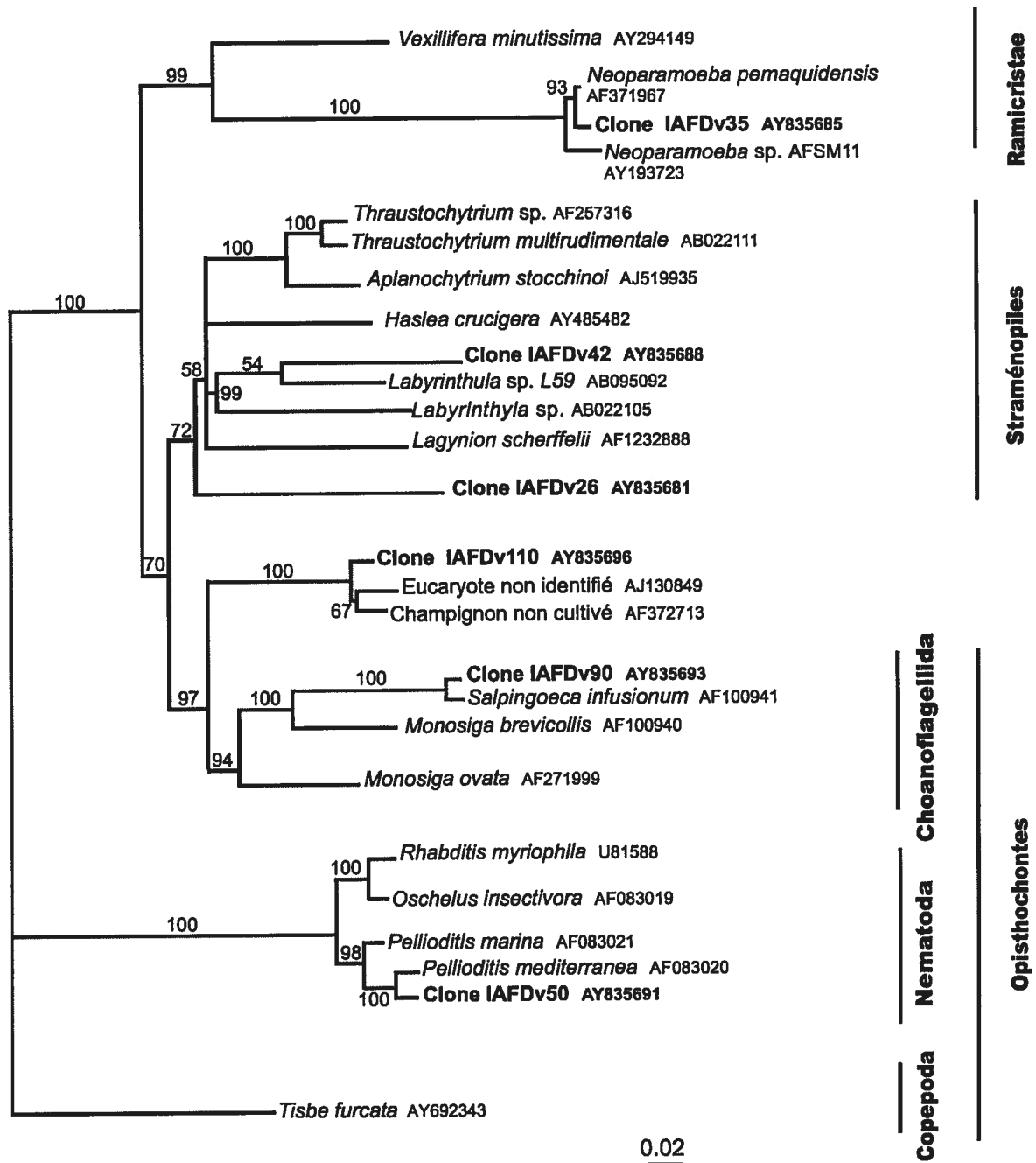
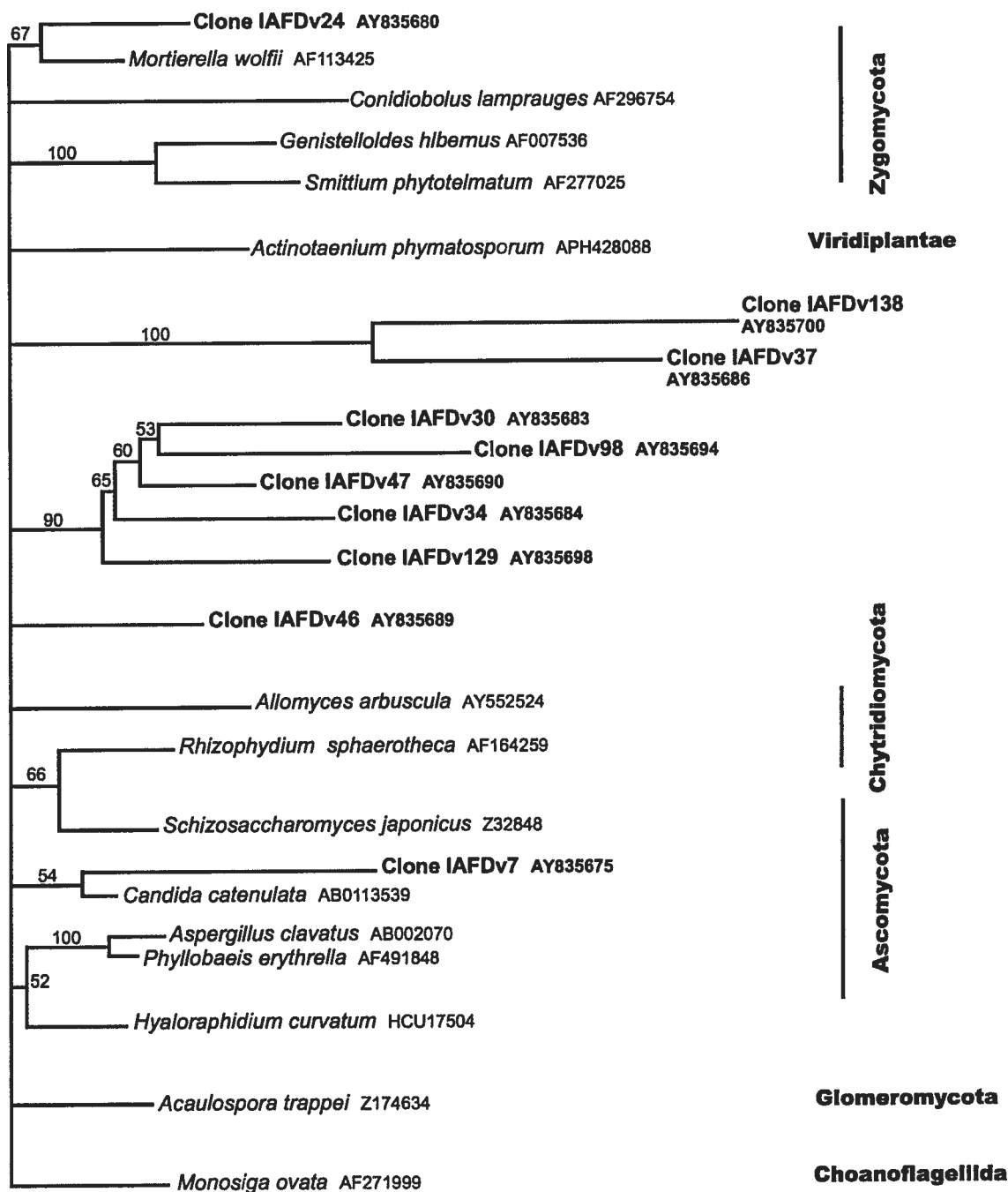


Figure 4.21 Classification phylogénétique des clones s'apparentant aux différentes lignées de protistes autres que les alvéolobiontes. Arbre consensus non enraciné (*Tisbe furcata* à titre d'extragroupe) démontrant la position des clones de la génothèque d'ADNr 18S s'apparentant aux opisthochontes, aux straménopiles et aux ramicristae. Les nombres aux nœuds représentent les pourcentages (>50%) obtenus à l'analyse «bootstrap» qui supporte l'analyse des distances. Les clones et leurs numéros d'identification dans «GenBank» sont indiqués en caractères gras. La classification taxonomique est basée sur celle de Lee et ses collaborateurs (2000) (Society of protozoologists).



0.02

Figure 4.22 Classification phylogénétique des clones dont l'affiliation demeure indéterminée. Arbre consensus non enraciné (*Monosiga ovata* à titre d'extragroupe) démontrant la position des clones de la génothèque d'ADNr 18S. Les nombres aux nœuds représentent les pourcentages (>50%) obtenus à l'analyse «bootstrap» qui supporte l'analyse des distances. Les clones et leurs numéros d'identification dans «GenBank» sont indiqués en caractères gras. La classification taxonomique est basée sur celle de Lee et ses collaborateurs (2000) (Society of protozoologists).

4.5 Impact des protozoaires sur la dénitrification

Les conditions du dénitrificateur du Biodôme de Montréal ont été reproduites à petite échelle en fioles. Les supports de type « Tri-Pack 1 » colonisés dans les unités pilotes et entretenus dans le dénitrificateur ont ensuite été ajoutés aux fioles. Dans l'un des milieux, les eucaryotes ont été inhibés à l'aide de cycloheximide et de nystatine. Dans un deuxième milieu, aucun inhibiteur n'a été ajouté. Le suivi de la réduction des nitrates et des nitrites en azote gazeux a été réalisé par un échantillonnage aux huit et seize heures. La comparaison de l'activité de dénitrification dans les milieux avec et sans protozoaires a permis de déterminer si l'inhibition de ces derniers affecte la dénitrification. Ceci a été réalisé en tenant compte de la croissance de la biomasse mesurée par les matières volatiles en suspension. Enfin, la diversité microbienne a été comparée dans les milieux avec et sans inhibiteurs.

La figure 4.23 montre le suivi de la dénitrification dans les différents milieux. Au graphique de la figure 4.23a, aucune différence significative n'est observée entre les milieux avec et sans protozoaires. Les valeurs obtenues après 60 heures d'incubation n'ont pas été considérées pour mesurer l'effet des protozoaires puisque le substrat initial, soit les nitrates, était devenu manquant après cette période d'incubation (figure 4.23b).

D'après le graphique de la réduction des nitrates (figure 4.23b), l'effet observé n'est pas significatif puisque les écarts-types des valeurs de nitrates obtenues se chevauchent entre la courbe des milieux avec protozoaires et celle des milieux sans protozoaires. Aussi, les résultats obtenus par le test statistique ANOVA univarié donne un P supérieur à 0,05 indiquant qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux types de milieu.

Le graphique de la figure 4.23c montre l'accumulation des nitrites dans chacun des milieux. Il a été observé que l'accumulation des nitrites a été plus rapide entre 24 et 60 heures dans les milieux où les protozoaires étaient absents (figure 4.24). Les ANOVA effectuées sur ces temps d'échantillonnage ont tous généré une valeur de P inférieur à 0,05 indiquant une différence significative entre les deux milieux. De plus, comme le montre le graphique de la figure 4.24, les écarts-types de chaque milieu ne se chevauchent pas pour un même temps d'échantillonnage. Selon les pentes des courbes respectives du graphique

de la figure 4.24, le taux de dénitrification aurait été de 23% supérieur dans les milieux sans protozoaires. Donc l'effet des protozoaires a été observé de façon indirecte sur l'accumulation des nitrites et non sur la dénitrification comme tel.

La figure 4.25 permet de comparer la quantité de bactéries présentes au début et à la fin des expériences dans chacun des milieux par la mesure des matières volatiles en suspension (MVES). Dans les deux types de milieu, soit avec et sans protozoaires, la quantité de biomasse a doublée au cours des 156 heures d'incubation. Cependant, aucune différence significative n'a été détectée lors de la comparaison de la quantité de biomasse générée dans les milieux avec ou sans protozoaires. En effet, une croissance de $0,3388 \pm 0,1377$ g MVES/support et de $0,3906 \pm 0,1484$ g MVES/support a été observée dans les milieux avec et sans protozoaires respectivement. Cependant, des observations microscopiques journalières ont permis de constater que la densité de bactéries en suspension était beaucoup plus importante dans les milieux sans protozoaires à partir de 72 heures et ce jusqu'à la fin de l'expérience (figure 4.26a et b). Cette différence de densité a également été remarquée par l'aspect macroscopique des fioles à la fin des essais (figure 4.26c). L'évolution des populations de protozoaires dans les milieux sans inhibiteurs a été suivie par des observations microscopiques quotidiennes. À partir de 48 heures la diversité de protozoaires a diminuée et après 60 heures d'incubation, une population de petits flagellés d'environ $5\mu\text{m}$ de diamètre dominait dans les milieux sans inhibiteurs.

Afin de déterminer si la présence des protozoaires a un impact sur la diversité bactérienne, l'ADN génomique de chacune des fioles et celle provenant du dénitrificateur a été extrait et les gènes ribosomiaux 16S ont été amplifiés par PCR. Les fragments obtenus ont été séparés par DGGE. La figure 4.27 montre que les profils de diversité bactérienne étaient similaires dans toutes les fioles. Cependant le nombre d'espèces différentes a diminué dans les milieux sans protozoaires (20 espèces dans les milieux avec protozoaires et 16 dans les milieux sans protozoaires). De plus, *Hyphomicrobium* sp. était absent des milieux sans protozoaires (figure 4.27, colonnes 5 et 6). Enfin, le nombre de bandes du profil de la diversité de ces milieux était réduit par rapport à celui de la biomasse fraîchement prélevée du dénitrificateur (figure 4.27, colonnes 2).

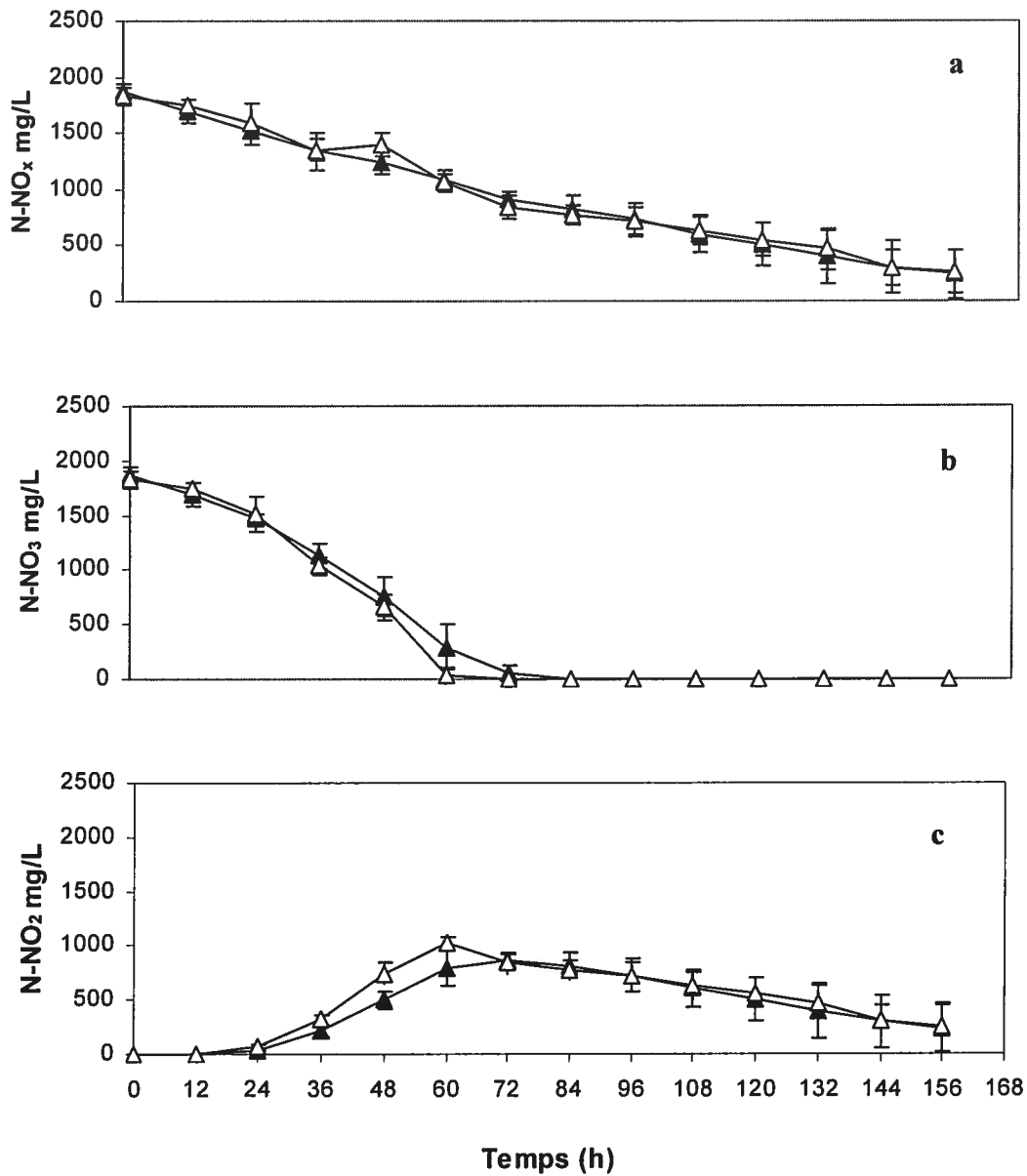


Figure 4.23 Suivi de la dénitrification dans les milieux avec et sans protozoaires. a: suivi des nitrates et des nitrites (N-NO_x), b: suivi des nitrates (N-NO₃), c: suivi des nitrites (N-NO₂).

—▲— Présence de protozoaires —△— Absence de protozoaires

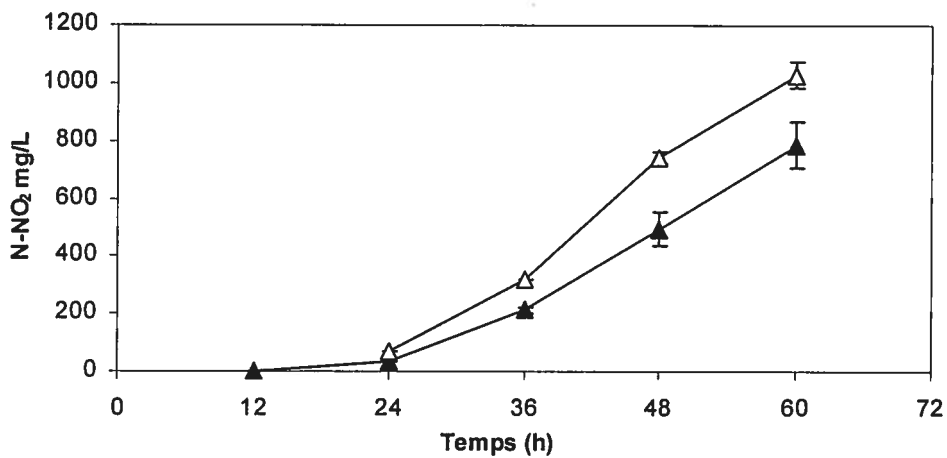


Figure 4.24 Accumulation des nitrites dans les milieux avec et sans protozoaires entre 24 et 60 heures d'incubation. Tiré de la figure 4.23c.

—▲— Présence de protozoaires —△— Absence de protozoaires

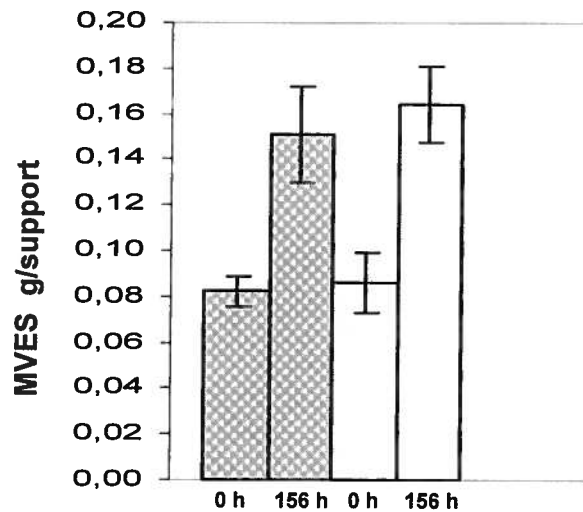


Figure 4.25 Matières volatiles en suspension (MVES) dans les milieux avec et sans protozoaires. Pour chaque milieu, les MVES ont été mesurés au début (0h) et à la fin de l'essai (156h)

■ Présence de protozoaires □ Absence de protozoaires

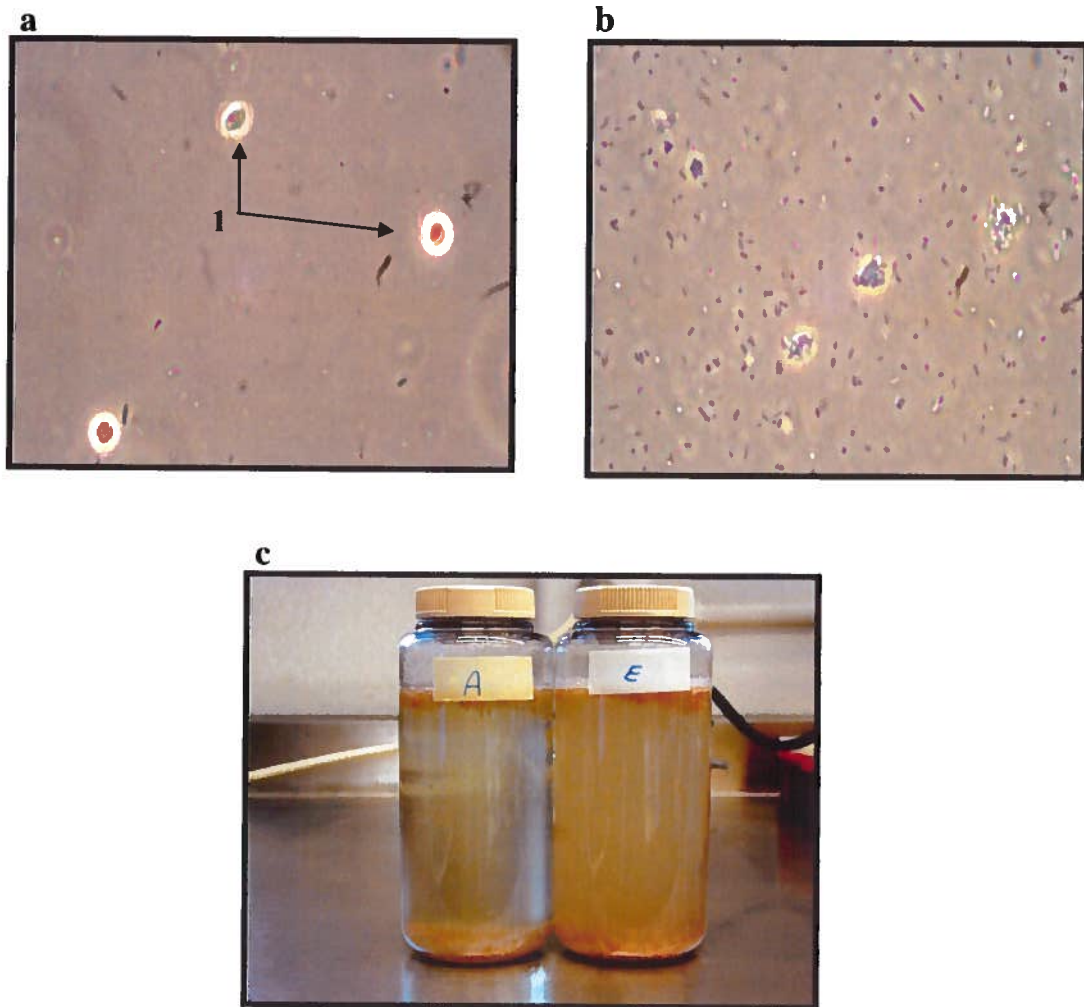


Figure 4.26 Comparaison de la densité bactérienne en suspension des milieux avec et sans protozoaires. Les observations microscopiques ont été réalisées après 156 heures d'incubation en contraste de phase, 1000X. **a:** milieu avec protozoaires 1: petits flagellés 5 X 5 μm . **b:** milieu sans protozoaires **c:** comparaison de deux milieux l'un avec protozoaires (A) et l'autre sans protozoaires (E), après 156 heures d'incubation et une centrifugation de 10 minutes à 6000 x g.

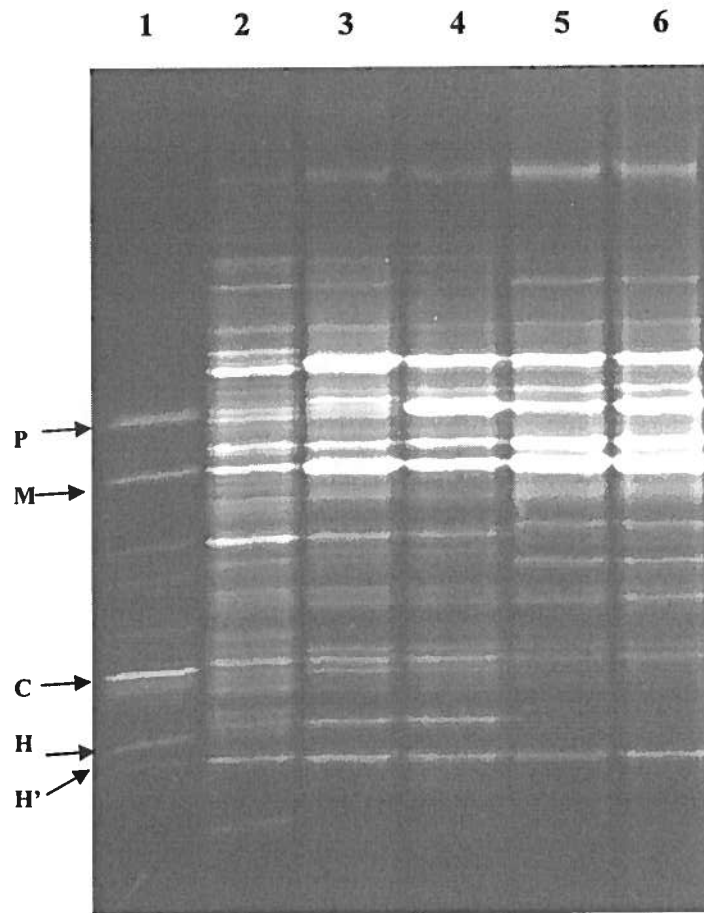


Figure 4.27. Profil de la diversité microbienne dans les milieux avec et sans protozoaires. L'ADN génomique des échantillons a été extrait et les gènes 16S ribosomaux ont été amplifiés par PCR. Les amplicons ont ensuite été séparés par DGGE (8 % acrylamide avec un gradient de 20% à 70% de dénaturants). **Colonne 1:** bactéries identifiées dans le dénitrificateur, P: Planctomycétales, M: *Methylophaga* sp., C: Candidate *OP11*, H et H': *Hyphomicrobium* sp., **colonne 2:** biomasse prélevée du dénitrificateur, **colonne 3:** biomasse des milieux avec protozoaires après 108h d'incubation, **colonne 4:** biomasse des milieux avec protozoaires en fin d'expérience (156h), **colonne 5:** biomasse des milieux sans protozoaires après 108h d'incubation, **colonne 6:** biomasse des milieux sans protozoaires en fin d'expérience (156h).

5. DISCUSSION

Dans la section suivante, les aspects optimisation et caractérisation du procédé de dénitrification seront traités par la mise en contexte des résultats obtenus lors de l'étude avec la littérature.

5.1 Le rapport carbone/azote (C/N) optimal pour la dénitrification

Le rapport C/N idéal pour la dénitrification au méthanol a été fixé à 1,5 selon les résultats des essais réalisés en fioles (figure 4.1). Il est toutefois probable que le rapport C/N exact requis pour la dénitrification lors de ces essais se situait entre 1,0 et 1,5. En effet, les résultats obtenus avec un rapport C/N de 1,0 montrent qu'à 56 heures, 89,9% des nitrates et nitrites étaient réduits avec un taux de dénitrification comparable à ceux des rapports C/N de 1,5 et 2,0 (figure 4.1a et tableau 4.1).

Le rapport C/N optimal de 1,5 suggéré par les résultats est d'environ deux fois supérieur au rapport C/N théorique (0,71) estimé par la stoechiométrie (Mateju *et al.*, 1992). Le rapport C/N théorique pour la dénitrification avec le méthanol ne tient toutefois pas compte de la synthèse cellulaire qui consomme entre 25% et 30% du méthanol requis (Mateju *et al.*, 1992; Catalan Sakairi *et al.*, 1996). Lors d'une étude sur les différentes sources de carbone employées pour la dénitrification des eaux souterraines, Gómez et ses collaborateurs (2000) ont suggéré que le méthanol devait être ajouté à leur réacteur à lit fixe submergé, dans un rapport C/N de 1,1 pour permettre la dénitrification complète. D'autres auteurs ont obtenu des valeurs de rapports C/N variants entre 0,94 et 1,09 lors d'études sur des procédés de dénitrification alimentés au méthanol (Lemmer *et al.*, 1997; Mohseni-Bandpi et Elliott, 1998).

Les taux de dénitrification observés aux différents rapports C/N ont été calculés à partir de la portion linéaire des courbes du graphique de la figure 4.1a. Ces taux varient très peu et indépendamment du rapport C/N (tableau 4.1). Les taux de dénitrification calculés ne tiennent pas compte de la quantité de biomasse dans les milieux puisque cette dernière n'était pas significativement différente d'un rapport C/N à l'autre selon le test statistique de Tukey (figure 4.2). De plus, aucune croissance significative n'a été observée pour tous les rapports C/N (figure 4.1c). La figure 4.1a montre bien le chevauchement des courbes de

dénitrification jusqu'à 24 heures d'incubation pour un rapport C/N de 0,5 et jusqu'à plus de 32 heures d'incubation dans les milieux aux rapports C/N de 1,0 à 2,0. Ceci indique que lorsque la source de carbone est en quantité suffisante, le taux de dénitrification est fixe pour une biomasse donnée. Mohseni-Bandpi et Elliott (1998) ont mené une étude sur l'effet des différents rapports C/N sur la dénitrification au méthanol et ils ont montré que l'efficacité de la dénitrification augmentait jusqu'à l'atteinte du rapport C/N optimal (1,1), puis elle demeurait stable. Her et Huang (1995) ont obtenu des résultats similaires avec leur procédé de dénitrification, soit une stabilité de l'efficacité d'enlèvement des nitrates lorsque les rapports C/N appliqués s'approchaient de l'optimum (C/N de 0,9 à 1,6). Ils ont aussi démontré que l'ajout de méthanol aux rapports C/N excessifs de 6,0 et plus entraînait une diminution de l'efficacité de la dénitrification.

Lors des essais en fioles sur les différents rapports C/N, les résultats de l'étude de la flore microbienne n'ont montré aucune variation de la diversité selon le rapport C/N appliqué (figure 4.3). Il est d'ailleurs admis dans la littérature que la diversité microbienne varie selon la nature de la source de carbone plutôt que selon la quantité disponible dans le milieu (Blaszczyk, 1983; Lee *et al.*, 2002; Timmermans et Van Haute, 1983).

5.2 La préservation de la biomasse du dénitrificateur

Dans le but d'assurer un redémarrage rapide de la dénitrification advenant un bris du réacteur, il est important de pouvoir préserver la biomasse de façon adéquate pour éviter d'avoir à recoloniser les supports du dénitrificateur. Au cours d'une étude réalisée sur le procédé de dénitrification du Biodôme de Montréal, Labbé et ses collaborateurs (2003b) ont démontré que la formation d'un biofilm mature sur les supports du dénitrificateur nécessitait cinq semaines d'opération du réacteur pendant lesquelles la dénitrification n'était pas optimale. Les essais réalisés avec la biomasse du dénitrificateur ont permis de déterminer une bonne méthode de conservation. Les résultats obtenus ont montré d'abord que dans les milieux où la biomasse a été congelée sans glycérol à -20°C ou à -80°C, les taux de dénitrification étaient toujours plus faibles que ceux obtenus avec la biomasse fraîche et avec la biomasse congelée avec glycérol à -20°C et à -80°C et ce, peu importe la

durée de conservation (tableau 4.2). De plus, une accumulation des nitrites a été observée à partir d'un mois de conservation dans les milieux congelés sans glycérol ce qui témoigne d'une activité de dénitrification non optimale (Cervantes *et al.*, 1998; Cervantes *et al.*, 2001). Ces résultats montrent clairement l'effet de protection du glycérol à titre de cryoprotectant lors de la congélation des cellules bactériennes (Gerhardt *et al.*, 1981). Les taux de dénitrification obtenus avec la biomasse congelée avec 15% de glycérol, à -20°C et à -80°C, étaient parfois légèrement supérieurs à ceux obtenus avec la biomasse fraîche (tableau 4.2). Ceci pourrait être attribuable à la présence de glycérol résiduel dans le biofilm et ce, malgré les nombreux rinçages effectués avant le début des essais. En effet, le glycérol peut constituer une source de carbone additionnelle utilisée par la biomasse lors de la dénitrification (Akunna *et al.*, 1993).

La conservation de la biomasse à 4°C pour une période d'une semaine n'a pas diminué l'efficacité de la biomasse à dénitrifier (figure 4.4). Par contre, après 24 heures dans ces conditions de conservation, il y a eu réduction des sulfates et par le fait même production d'un gaz toxique, le sulfure d'hydrogène (Milby et Baselt, 1999). La conservation de la biomasse à cette température pendant plus d'une semaine est déconseillée dû à la diminution du taux de dénitrification et à l'accumulation importante des nitrites. À partir d'un mois de conservation à 4°C, les taux de dénitrification ont diminué jusqu'à une valeur de $0,54 \pm 0,08$ mg N-NO_x/L/h et seulement 30% des nitrates et des nitrites ont été réduits après 17 mois de conservation (tableau 4.2). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette baisse d'efficacité de la biomasse conservée à 4°C. D'une part, il est possible que le sulfure d'hydrogène dégagé lors de la sulfatoréduction ait causé une certaine mortalité des bactéries dénitrifiantes (Leta *et al.*, 2004). Une autre hypothèse tient du fait que l'induction de la synthèse des enzymes de dénitrification nécessite une source d'oxyde d'azote (Zumft, 1997). Lorsque la biomasse était conservée à 4°C, l'activité de dénitrification s'est poursuivie et le milieu est rapidement devenu dépourvu en nitrates et en oxydes d'azote. Lors du démarrage des essais, la biomasse, maintenue à 4°C, était de nouveau en contact avec une source d'oxydes d'azote et il est probable qu'un certain temps d'adaptation ait été nécessaire pour la synthèse des enzymes de dénitrification (Baumann *et al.*, 1996). Les résultats obtenus montrent d'ailleurs qu'après 1 mois, 6 mois et 17 mois de conservation à 4°C, les phases de latence observées ont duré respectivement 24 heures, 56

heures et 96 heures (figure 4.5a, 4.6a, 4.7a). Ces périodes de latence ont augmenté avec le nombre de mois de conservation. D'autre part, comme une grande quantité de biomasse a été maintenue à 4°C dans un faible volume d'eau de mer, il est possible qu'au fil des mois le milieu se soit appauvri en nutriments et en métaux nécessaires à la biosynthèse des enzymes de la dénitrification (Zumft, 1997).

Une troisième hypothèse expliquant la baisse du taux de dénitrification de la biomasse conservée à 4°C est qu'il y ait eu un changement des populations avec le temps et que les conditions riches en sulfates aient favorisé les bactéries sulfatoréductrices plutôt que les bactéries dénitrifiantes. L'étude de la diversité de la microflore après 17 mois de conservation à 4°C montre effectivement un changement des populations (figure 4.8, colonne 7). Par contre, *Hyphomicrobium* sp., une bactérie dénitrifiante, a été détectée malgré l'absence de nitrates dans le milieu et ce après 17 mois de conservation à 4°C (figure 4.8, colonne 7). Il semble toutefois que la conservation à 4°C ne soit pas favorable au maintien du biofilm de façon intègre puisque le profil de la diversité microbienne observé à la colonne 7 de la figure 4.8 montre une réduction du nombre d'espèces incluant la disparition des Planctomycétales et des Candidates *OP11*.

Les résultats sur l'effet des différentes méthodes de conservation sur la diversité de la flore microbienne après 17 mois de conservation indiquent que la congélation de la biomasse à -80°C avec 15% de glycérol a bien préservé la diversité dans le biofilm puisque cette dernière était très similaire à la biomasse fraîche (figure 4.8 colonne 2 et 4). Une diversité similaire a également été observée avec la biomasse congelée à -80°C sans glycérol malgré le faible taux de dénitrification observé après 17 mois de conservation dans ces conditions. Il est probable que les cellules maintenues dans ces conditions étaient endommagées dû à l'absence de cryoprotectant, ce qui expliquerait le faible rendement. Par contre, l'ADN de ces cellules serait demeuré intact permettant ainsi la détection des différentes espèces. Les résultats de l'étude de la diversité de la biomasse conservée à -20°C avec glycérol ont montré une légère diminution du nombre d'espèces par rapport à la biomasse fraîche mais cette réduction était encore plus prononcée avec la biomasse conservée à -20°C sans glycérol (figure 4.8, colonnes 2, 3 et 5). Il semble donc que la

température de congélation ait un impact plus important que la présence ou non de cryoprotectant pour la préservation de l'ADN des cellules bactériennes.

L'accumulation des nitrites observée lors des essais avec la biomasse conservée à -20°C et à -80°C sans glycérol ainsi qu'à 4°C coïncide avec des taux de dénitrification faibles (tableau 4.2). Les graphiques des figures 4.5, 4.6 et 4.7 montrent clairement que l'accumulation des nitrites a été maximale au moment où les nitrates étaient épuisés ou en très faible concentration dans le milieu. Comme la première étape de la dénitrification, soit la réduction des nitrates en nitrites, est moins exigeante pour la bactérie du point de vue énergétique, il n'est pas surprenant de voir une réduction préférentielle des nitrates lorsque les conditions de dénitrification ne sont pas optimales (Zumft, 1997). Dans ce cas-ci, la biomasse congelée sans cryoprotectant a probablement été endommagée lors de la congélation ce qui expliquerait les rendements moins élevés comparativement à ceux de la biomasse congelée avec glycérol (tableau 4.2). De la même façon, la biomasse conservée à 4°C aurait subi une carence en oxydes d'azote et en nutriments diminuant ainsi sa capacité à réduire les nitrates et les nitrites efficacement.

Somme toute, pour une période d'arrêt du dénitrificateur d'une semaine et moins, la biomasse peut être conservée à 4°C puisque la dénitrification reprend rapidement et avec une efficacité comparable à la biomasse fraîche. Pour éviter les odeurs de H₂S issues de la sulfatoréduction, qui se produit rapidement dans ces conditions, plusieurs solutions peuvent s'appliquer. D'abord, la biomasse pourrait être maintenue dans une eau de mer sans sulfates ou encore, la biomasse pourrait être barbotée avec l'air ambiant pour ensuite être entreposée à 4°C. Par contre, ces solutions n'ont pas été mises à l'essai et elles ne garantissent donc pas un redémarrage rapide de la dénitrification et sans accumulation d'intermédiaires. Pour une période de 1 mois, la conservation de la biomasse avec 15% de glycérol à -20°C ou à -80°C est adéquate puisque ces deux méthodes de préservation donnent des résultats très similaires à ceux observés avec la biomasse fraîche. Pour une période de 6 mois, la congélation à l'une ou l'autre des températures avec 15% de glycérol est également la meilleure méthode de conservation malgré une faible accumulation des nitrites temporaire observée à -20°C. Pour une période de plus de six mois, la biomasse devrait idéalement être congelée avec 15% de glycérol à -80°C pour éviter toute

accumulation des nitrites lors du redémarrage. Cependant, les concentrations en nitrates dans le dénitrificateur sont beaucoup plus faibles (environ 40 mg N-NO₃/L) que celles utilisées dans cette étude (300 mg N-NO₃/L). Ceci implique que la réduction des nitrates avec une biomasse conservée à -20°C avec 15% de glycérol pendant 17 mois ne pourrait générer une accumulation des nitrites aussi importante que celle observée lors des essais en fioles.

Enfin, compte tenu des installations et des équipements disponibles au Biodôme de Montréal, la conservation de la biomasse à -20°C avec 15% glycérol serait plus adéquate. La biomasse conservée 17 mois dans ces conditions réussit tout de même une dénitrification complète dans les mêmes délais que la biomasse conservée à -80°C avec 15% de glycérol et ce, malgré une accumulation temporaire des nitrites.

5.3 L'évolution de la flore microbienne dans les unités pilotes

La flore microbienne des unités pilotes a d'abord été caractérisée lors de la colonisation des désoxygénateurs et des dénitrificateurs alimentés soit à l'acétate de sodium ou au méthanol. Dans les chémostats alimentés au méthanol, très peu de variations ont été observées au cours de la colonisation et le nombre d'espèces est demeuré stable (figure 4.9 et 4.10). De façon plus précise, des différences minimales ont été observées lors des cinq premières semaines de colonisation du dénitrificateur alimenté au méthanol puis les profils de diversité sont demeurés identiques (figure 4.10). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Labbé et ses collaborateurs (2003b) lors de l'étude de la diversité microbienne du dénitrificateur à pleine échelle du Biodôme de Montréal. Ces auteurs ont observé que la diversité microbienne évoluait au cours des cinq premières semaines et qu'elle demeurait ensuite inchangée au cours des six semaines suivantes.

Dans les unités pilotes alimentées à l'acétate de sodium, la variation de la diversité microbienne a été importante pendant les quatre premières semaines pour le dénitrificateur et pendant les cinq premières semaines pour le désoxygénateur (figures 4.9 et 4.10). Dans le désoxygénateur et dans le dénitrificateur alimentés à l'acétate de sodium, le nombre d'espèces a augmenté de trois entre le début et la fin de l'étude, soit de 14 à 17 espèces et

15 à 18 espèces respectivement. Des études ont montré qu'une biomasse alimentée à l'acétate de sodium présentait une facilité d'adaptation aux changements de conditions dans un milieu et une croissance plus rapide qu'une biomasse alimentée avec l'éthanol ou le méthanol (Lemmer *et al.*, 1997; Mohseni-Bandpi et Elliott, 1998). La croissance accrue avec l'acétate de sodium comme source de carbone a été plus évidente dans le chémostat utilisé comme dénitrificateur où des problèmes de colmatage ont conduit à l'arrêt du réacteur après quatre semaines d'opération. En ce sens, le méthanol est plus approprié pour la dénitrification car il génère moins de biomasse (Blaszczyk *et al.*, 1979). L'évolution plus importante des populations dans les chémostats alimentés à l'acétate de sodium par rapport à ceux alimentés au méthanol pourrait être attribuable à la diversité des intermédiaires métaboliques générés par l'assimilation des substrats. En effet, un plus grand nombre d'intermédiaires métaboliques différents sont relâchés lors de la transformation de l'acétate de sodium par rapport à la transformation du méthanol par les microorganismes (Wackett et Hershberger, 2001). Ainsi, un gradient de produits intermédiaires serait créé lors de la formation du biofilm alimenté à l'acétate de sodium. Ceci permettrait la croissance d'un grand nombre d'espèces différentes qui utiliserait chacun de ces intermédiaires métaboliques tout au long de la maturation du biofilm.

Le suivi de la colonisation par quatre espèces bactériennes a été réalisé sur les unités pilotes. La colonisation par *Hyphomicrobium* sp. a été observée dès la première semaine dans le désoxygénateur à l'acétate de sodium mais seulement à la semaine trois dans le dénitrificateur alimenté avec cette même source de carbone (figure 4.9 et 4.10). Bien qu'elle puisse survivre à de faibles concentrations en oxygène, *Hyphomicrobium* sp. est une bactérie aérobie et ceci explique que sa croissance ait été plus rapide dans le désoxygénateur où l'oxygène était présent (Lemmer *et al.*, 1997). Cependant, dans les chémostats alimentés au méthanol, *Hyphomicrobium* sp. a été détecté dès la première semaine autant dans le désoxygénateur que dans le dénitrificateur. Dans ce cas-ci, il est probable que l'affinité particulière de cette bactérie pour l'assimilation du méthanol ait été un facteur plus influent sur la cinétique de croissance que la présence d'oxygène (Akunna *et al.*, 1993; Timmermans et Van Haute, 1983).

Les Candidates *OP11* ont démontré une colonisation tardive dans plusieurs chémostats dont le désoxygénateur et le dénitrificateur au méthanol et le désoxygénateur à l'acétate de sodium. Puisque les Candidates *OP11* n'ont jamais été isolées en culture, leurs caractères physiologiques demeurent inconnus (Harris *et al.*, 2004). Il est donc difficile de se prononcer sur leur cinétique de croissance dans les unités pilotes. Par contre, leur présence dans les différents chémostats n'est pas étonnante car l'ADNr 16S des Candidates *OP11* est fréquemment isolé des milieux réduits riches en sulfates ou en sulfites (Harris *et al.*, 2004).

Suite à la caractérisation de la flore microbienne lors de la colonisation, l'effet des différents paramètres d'opération sur la diversité microbienne a été étudié. La comparaison des profils de diversité entre les chémostats alimentés à l'acétate de sodium et ceux alimentés au méthanol a montré que des sources de carbone différentes généraient des consortiums bactériens également différents (figure 4.11). Blaszczyk et ses collaborateurs (1980, 1983) ont aussi observé que les espèces dominantes d'un consortium microbien variaient selon la source de carbone utilisée pour la dénitrification. D'autres auteurs ont aussi rapporté des changements au niveau de la diversité microbienne et la sélection de certaines espèces selon la source de carbone utilisée (Claus et Kutzner, 1985; Hallin *et al.*, 1996; Timmermans et Van Haute, 1983).

D'après les résultats obtenus à la figure 4.11, l'oxygène est un autre facteur qui semble influencer la diversité microbienne. D'abord, des différences ont été observées au niveau de la diversité bactérienne entre les désoxygénateurs et les dénitrificateurs alimentés avec une même source de carbone (figure 4.11, colonnes 2 et 5 ou colonnes 1 et 4). Aussi, la diversité bactérienne du chémostat opéré en continu s'est avéré différente de celle du chémostat opéré en cuvée, où l'oxygène était présent de façon séquentielle (figure 4.11, colonnes 4 et 6). Lemmer et ses collaborateurs (1997) ont étudié les populations bactériennes à différentes profondeurs dans un réacteur à lit fixe pour la dénitrification des eaux usées. Au cours de cette étude, ils ont observé que *Comamonas* sp., une espèce pouvant dénitrifier en présence d'oxygène, était présente surtout en surface du réacteur où l'oxygène était abondant (Lemmer *et al.*, 1997b). Il existe d'autres espèces pouvant dénitrifier en présence d'oxygène telles que *Paraccocus pantotrophys*, *Alcaligenes faecalis*

et *Microvirgula aerodenitrificans* (Otani *et al.*, 2004). Ces espèces sont susceptibles de se retrouver dans un désoxygénateur ou dans un système opéré en cuvée où l'oxygène est présent. Certaines espèces de bactéries dénitrifiantes telles que *Hyphomicrobium* sp. et *Paraccocus denitrificans*, survivent en présence d'oxygène mais leur capacité à dénitrifier est grandement diminuée dans ces conditions. Ces espèces sont donc favorisées au détriment des bactéries anaérobies strictes dans les systèmes où l'oxygène est présent de façon séquentielle (Lemmer *et al.*, 1997b). L'identification précise des espèces de la flore microbienne des unités pilotes n'a pas été effectuée lors de la variation du mode d'opération. Cependant, la diversité globale s'est avérée différente dans le chémostat alimenté au méthanol et opéré en cuvée comparativement à celui opéré en continu (figure 4.11, colonnes 4 et 6).

La biomasse des chémostats alimentés au méthanol a démontré une diversité différente de celle du dénitrificateur à pleine échelle. Ceci pourrait être attribuable à l'agitation beaucoup plus forte dans les unités pilotes ce qui permet le maintien d'un biofilm mince et ainsi une meilleure diffusion des nutriments, du méthanol et des nitrates à l'intérieur de ce dernier. Aussi, l'âge de la biomasse pourrait influencer la diversité microbienne. En effet, les supports du dénitrificateur étaient colonisés depuis plusieurs années alors que les supports des unités pilotes étaient colonisés depuis quelques mois seulement. Par contre, aucune étude à ce jour ne rapporte l'effet de la force d'agitation sur la diversité microbienne ni de l'évolution de la diversité après plus de deux mois d'opération d'un procédé de dénitrification. L'ensemble des résultats sur la colonisation des unités pilotes devrait être interprété avec prudence puisque la méthode de prélèvement de la biomasse sur les biobilles pour les analyses moléculaires ne permettait pas de récupérer la totalité de la biomasse. Ainsi, certaines espèces n'ont peut-être pas été détectées dans les chémostats dû à cette limitation de la méthode.

5.4 Les protozoaires du dénitrificateur

L'identification des protozoaires par microscopie dresse un portrait général de la diversité eucaryotique du biofilm dans le dénitrificateur. Parmi les protozoaires observés

par microscopie, la majorité était des ciliés. Certains ont été identifiés jusqu'au genre parmi lesquels on retrouve *Vorticella* sp., *Euplotes* sp., *Cyclidium* sp., *Aspidisca* sp. et *Uronema* sp. mais également des protozoaires dont les traits morphologiques les apparentent aux ciliés de la classe des Litostomatea. Ces ciliés sont couramment retrouvés dans les systèmes de traitements des eaux usées mais également en dans les milieux marins puisqu'ils tolèrent de grandes variations de salinité, soit de 0 à 30 mg/L (Horan, 1990; Madoni, 1994; Foissner et Berger, 1996). Leur présence dans le biofilm du dénitrificateur peut également s'expliquer par le fait que ce type de protozoaire se nourrit principalement de bactéries (Foissner et Berger, 1996). L'identification par microscopie demeure une méthode limitée puisque seulement 5 à 10% des protozoaires ont des traits morphologiques distincts permettant leur identification (Dolan, 2005). L'emploi d'outils moléculaires s'est avéré nécessaire pour l'étude approfondie de la diversité des protozoaires dans le dénitrificateur.

Les résultats de la génothèque d'ADNr 18S indiquent également une majorité de protozoaires ciliés dans le biofilm du dénitrificateur. Parmi ceux-ci, deux clones ont pu être identifiés car ils présentaient une homologie de 100% avec des organismes connus soit *Uronema marinum* et *E. minuta* (tableau 4.3). Les protozoaires appartenant au genre *Euplotes* sp. sont reconnus pour être cosmopolites donc très versatiles (Petroni *et al.*, 2002). *Euplotes* sp. est un protozoaire commun dans les systèmes de traitement de l'eau en général et il est associé à une bonne qualité d'eau (Madoni, 1994). Sa présence dans le dénitrificateur peut s'expliquer, entre autres, par une certaine disponibilité de l'oxygène, soit environ 0,4 mg O₂/L (Foissner et Berger, 1996; Lee *et al.*, 2004). *U. marinum*, quant à lui, est un pathogène des poissons marins (Bassleer, 1983; Bo-Young *et al.*, 2001). Ce parasite opportuniste a longtemps été suspecté au Biodôme de Montréal puisque de nombreux poissons ont présenté, dans le passé, des dermatites ulcéreuses, souvent associées à une infection à *U. marinum* (Dancosse, 2005). Le clone IAFDv16 représente possiblement un protozoaire également pathogène puisqu'il possède 96% d'homologie avec *Cryptocaryon irritans*, un cilié responsable d'une infection très répandue en eau de mer, communément appelé «ich» (Dickerson, 1994).

Le clone le mieux représenté dans la génothèque est IAFDv1 (25,8% de la génothèque). Ce clone s'apparente à la classe des oligohymenophorea et à la sous-classe des péritriches. IAFDv1 présente 95,3% d'homologie avec un cilié non cultivé, AJ130855, isolé en eau douce (Van Hannen *et al.*, 1999). Le clone IAFDv1 représente probablement une espèce de la sous-classe des péritriches adaptée à l'eau de mer ce qui explique le taux d'homologie relativement faible avec le cilié non cultivé AJ130855.

Le fait que la classe des oligohymenophorea (et particulièrement la sous-classe des péritriches) soit la mieux représentée en diversité dans l'arbre des alvéolobiontes (figure 4.20) et en nombre (tableau 4.3) n'est pas étonnant compte tenu du type d'environnement. En effet, dans les réacteurs de type fluidisés ou fixes, les protozoaires ayant la capacité de s'attacher au biofilm et aux supports, comme c'est le cas de la plupart des péritriches, sont avantagés au détriment des protozoaires qui nagent librement dans le milieu et qui sont susceptibles au lessivage (Curds, 1982; Sudo et Aiba, 1984). Des études portant sur la caractérisation des ciliés dans les procédés de dénitrification pour le traitement des eaux usées ont d'ailleurs démontré que la sous-classe des péritriches était dominante parmi la grande diversité de ciliés observée (Fried et Lemmer, 2003; Luna-Pabello *et al.*, 1996). Balderston et Sieburth (1976) ont effectué des observations en microscopie électronique à transmission sur des échantillons provenant d'un système de dénitrification en milieu marin pour l'aquaculture des salmonidés et ils ont également démontré la dominance des péritriches.

En plus de la classe des oligohymenophorea, certains clones isolés du dénitrificateur se sont inscrits dans d'autres classes de ciliés lors de l'analyse phylogénétique. Les classes des Spirotrichea, des Litostomatea, des Phyllopharyngea et des Prostomatea ont été représentées respectivement par 8,8%, 8,2%, 15,7% et 8,8% des clones de la génothèque. Ces classes de ciliés sont fréquemment retrouvées dans les systèmes de traitement de l'eau douce et plus particulièrement dans les boues activées (Foissner et Berger, 1996; Luna-Pabello *et al.*, 1996). Le mésocosme marin de Cheaseapeake Bay de l' Aquarium national de Baltimore abrite ces classes de protozoaires malgré les conditions différentes de lumière, de concentration en oxygène et de température (Adey et Loveland, 1998). Par contre, la plupart des études moléculaires sur la diversité eucaryotique dans les milieux

naturels, où les conditions sont similaires à celles du dénitrificateur, ne démontrent pas une majorité de protozoaires de type ciliés. Par exemple, dans les sédiments marins anoxiques, la diversité eucaryotique est distribuée principalement dans les lignées des straménopiles et des alvéolobiontes mais aussi dans les lignées des cercozoa et des opisthochontes (Stoeck *et al.*, 2003; Takishita *et al.*, 2005).

L'arbre phylogénétique de la figure 4.21 montre la diversité des protozoaires autres que les ciliés dans le biofilm du dénitrificateur. Le clone IAFDv35 a démontré une homologie de 99% avec l'amibe *Neoparamoeba pemaquidensis* de la lignée des ramicristae. Cette amibe est un pathogène opportuniste des poissons et des invertébrés en milieu marin. *N. pemaquidensis* est l'agent de l'AGD (Amoebic gill disease) et cause une infection au niveau des branchies des poissons (Douglas-Helders *et al.*, 2003). Deux clones représentatifs IAFDv42 et IAFDv26 ont été classés parmi le groupe des straménopiles: le clone IAFDv42 s'apparente au genre *Labyrinthula* sp., un protiste marin dont les traits morphologiques sont similaires aux hyphes des champignons (Raghukumar, 2002). Le clone IAFDv26, quant à lui, appartient probablement à un nouveau groupe de straménopiles non identifié puisqu'il ne se ramifie pas avec un organisme connu de ce groupe dans l'arbre phylogénétique de la figure 4.21. Le clone IAFDv110 s'apparente à 96% au clone LKM11 isolé lors d'une étude portant sur la structure microbienne d'un système alimenté en eau douce avec des débris d'algues (Van Hannen *et al.*, 1999). Le clone LKM11 de cette étude est classé dans un groupe distinct ne s'apparentant à aucune autre séquence dans les banques de données et dont les ancêtres les plus proches sont les champignons (Van Hannen *et al.*, 1999). D'autre part, le clone IAFDv110 présente le même pourcentage d'homologie, 96%, avec un champignon non cultivé, isolé des sédiments marins anoxiques de l'Aquarium Parc Berkeley en Californie dont les conditions de salinité, de pH et de température sont similaires à celles du dénitrificateur du Biodôme (Dawson et Pace, 2002). Les résultats de la classification phylogénétique à la figure 4.21 montre bien l'embranchement du clone IAFDv110 avec le groupe des opisthochontes dont les champignons font partie. Ceci confirme les affiliations observées avec les séquences des banques de données. Le clone IAFDv90 s'est apparenté à 99% à *Salpingoeca infusionum*, un choanoflagellé (figure 4.21 et tableau 4.3). Ce type de protozoaire est très commun dans tous les types d'habitats aquatiques et il est particulièrement abondant dans

le plancton marin où il constitue jusqu'à 50% des protozoaires flagellés (Fenchel, 1986). Enfin, le clone IAFDv50 a été affilié à 97% à un métazoaire et plus précisément au nématode *Pellioiditis mediterranea* (figure 4.21 et tableau 4.3). La présence d'un organisme s'affiliant à ce nématode n'est pas inattendu dans le système de filtration du mésocosme du Saint-Laurent marin puisque *P. mediterranea* fait partie des invertébrés marins représentatifs de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent (Brunel *et al.*, 1998).

D'autre part, l'affiliation phylogénétique de dix clones représentatifs, soit 14,5% de la génothèque, s'est avéré indéterminée (figure 4.22). Seulement deux de ces clones, IAFDv24 et IAFDv7, possèderaient un ancêtre commun avec des champignons. Pour les huit autres, aucune affiliation avec des séquences d'ADNr 18S connues n'a été déterminée. La figure 4.22 montre que les clones IAFDv30, IAFDv98, IAFDv47, IAFdv34 et IAFDv129 sont regroupés ensemble ainsi que les clones IAFDv138 et IAFDv37 indiquant possiblement deux groupes taxonomiques distincts parmi ces clones. Les études moléculaires de diversité eucaryotique rapportent des proportions similaires, soit entre 7% et 20%, de clone dont l'affiliation phylogénétique est indéterminée à l'intérieur d'une génothèque (Caron *et al.*, 2004; Van Hannen *et al.*, 1999). D'après la classification phylogénétique des huit clones avec une affiliation indéterminée (figure 4.22), deux hypothèses peuvent être posées. La première possibilité est que ces huit clones représentent des eucaryotes connus mais dont les séquences nucléotidiques de leurs gènes ribosomiaux 18S ne sont pas disponibles dans les banques de données. En effet, les séquences nucléotidiques d'ADNr eucaryotique s'accumulent moins rapidement dans les banques de données par rapport aux séquences d'ADNr procaryotique (Caron *et al.*, 2004). La seconde hypothèse tient du fait que ces huit clones seraient issus d'eucaryotes jamais identifiés et isolés auparavant. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que les milieux marins anoxiques renferment de nombreux eucaryotes sans affiliation avec des organismes connus et ces derniers se regroupent à des niveaux taxonomiques très élevés (Dawson et Pace, 2002; Stoeck et Epstein, 2003; Stoeck *et al.*, 2003; Takishita *et al.*, 2005). Également, certains clones isolés de ces études forment des nouveaux groupes à l'intérieur des différentes lignées d'eucaryotes des alvéolobiontes, des euglénobiontes, des straménopiles et des champignons (Stoeck et Epstein, 2003).

L'analyse de raréfaction (figure 4.19) effectuée sur l'ensemble de la génothèque indique que la diversité eucaryotique du dénitrificateur a bien été couverte par cette étude. En effet, l'extrapolation de la courbe de la figure 4.19 permet de constater que le fait de générer une plus grande quantité de clones ne permettrait pas l'isolement d'un très grand nombre de nouvelles espèces. Par contre, il est probable que d'autres espèces d'eucaryotes du biofilm du dénitrificateur pourraient être isolés par l'emploi d'amorces différentes, plus spécifiques à chaque groupe d'eucaryotes (Diez *et al.*, 2001a; Gast *et al.*, 2004). Somme toute, l'étude microscopique et moléculaire du biofilm du dénitrificateur a révélé une grande diversité de protozoaires ce qui reflète une bonne qualité de l'eau à l'affluent et à l'effluent du réacteur (Fried *et al.*, 2000). Par contre, cette diversité témoigne également de la présence d'oxygène dans le milieu, notamment par la présence d'*Euplotes minuta*, ce qui n'est pas favorable à une dénitrification optimale (Spotte, 1991). La concentration en oxygène dans le dénitrificateur est toutefois faible soit de 0,4 mg/L, ce qui explique l'activité de dénitrification observée. Dans son ensemble, la diversité des protozoaires du dénitrificateur est plus similaire à celle des boues activées dans les systèmes de traitement des eaux usées, où l'oxygène est présent, comparativement à la diversité retrouvée dans les milieux marins anoxiques. Cependant, une grande quantité de clones isolés à partir du biofilm du dénitrificateur n'ont pu être identifiés de façon précise. Ceci confirme l'énorme diversité eucaryotique qui reste à découvrir dans les milieux pauvres en oxygène ou anoxiques (Stoeck et Epstein, 2003; Stoeck *et al.*, 2003).

5.5 L'impact des protozoaires sur l'activité de dénitrification

Étant donné l'abondance et la grande diversité de protozoaires présents dans le biofilm du dénitrificateur, des essais ont été réalisés pour déterminer si ces derniers avaient un impact sur l'activité de dénitrification. D'après les résultats de la figure 4.23a, la réaction de dénitrification globale, c'est-à-dire la réduction des nitrates jusqu'à l'azote gazeux, n'est pas affectée par la présence des protozoaires. Les données obtenues après 60 heures d'incubation doivent cependant être interprétées avec prudence puisque le substrat initial, le nitrate, est complètement épuisé dans le milieu après cette période. L'absence du substrat initial pourrait avoir un impact sur la dénitrification et biaiser les résultats. Lors du

suivi de la réduction des nitrates seulement, aucune différence significative entre les milieux avec et sans protozoaires n'a été observée (figure 4.23b). Cependant, un échantillonnage plus fréquent, par exemple aux quatre heures plutôt qu'au douze heures et sur une période de temps plus courte, aurait peut-être démontré une réduction des nitrates accélérée de façon significative dans les milieux sans protozoaires. Par contre, une accumulation des nitrites a été observée parallèlement à la réduction des nitrates et elle était de 23% supérieure dans les milieux sans protozoaires entre 24 et 60 heures d'incubation (figure 4.24). Seul un effet indirect des protozoaires a donc été observé, soit sur l'accumulation des nitrites et non sur la dénitrification comme tel. Par contre, l'accumulation d'intermédiaires est directement reliée à la dénitrification. En effet, lorsque la dénitrification ne se déroule pas de façon optimale pour diverses raisons, l'accumulation d'intermédiaires tels que les nitrites, peut survenir. Par exemple, de faibles concentrations en oxygène auraient pu donner lieu à cette accumulation d'intermédiaires dans le milieu. Aussi, une concentration en nitrates trop élevée a pour effet d'inhiber la nitrite réductase ce qui entraîne une accumulation des nitrites (Blaszczyk, 1993; Oh et Silverstein, 1999).

Ainsi, les conditions non optimales de dénitrification lors des essais auraient menées à une réduction préférentielle des nitrates occasionnant l'accumulation des nitrites. On peut donc supposer que si la réduction des nitrates est plus rapide dans l'un des milieux, la quantité de nitrites accumulés dans ce milieu sera plus importante pour un même temps d'échantillonnage. Deux hypothèses peuvent être posées pour expliquer cette accumulation des nitrites plus rapide dans le milieu sans protozoaires. D'abord, il est possible que la croissance microbienne ait été plus importante dans le milieu sans protozoaire dû à l'absence de prédation. En ayant une croissance microbienne accrue, le taux de réduction des nitrates en nitrites aurait également été augmenté menant ainsi à une accumulation des nitrites plus rapide. La deuxième hypothèse tient du fait que l'accumulation des nitrites soit attribuable à une déficience au niveau de la dénitrification et si cette accumulation est plus importante lorsque les protozoaires sont absents, alors ces derniers pourraient être bénéfiques pour le procédé de dénitrification.

Finlay et ses collaborateurs (1983) ont observé une activité de dénitrification chez des protozoaires appartenant au genre *Loxodes* sp.. Cette activité de dénitrification chez

Loxodes sp. a été confirmée plus tard dans une seconde étude réalisée à partir de ciliés isolés d'un lac eutrophe (Aleya *et al.*, 1992). Par contre, l'activité de dénitrification n'a jamais été démontrée chez d'autres protozoaires. Le genre *Loxodes* sp. n'a pas été détecté dans le biofilm du dénitrificateur par la génothèque ou par les observations microscopiques. Cependant, ceci n'exclut pas la possibilité que ce genre de protozoaire soit présent dans le dénitrificateur. En effet, il est possible que les amorces utilisées n'aient pas permis l'amplification de certaines espèces. D'ailleurs, les gènes ribosomiaux de certains eucaryotes, tels les Foraminifères, sont si divergents qu'ils ne peuvent être amplifiés par des amorces universelles pour eucaryotes (Pawlowski, 2000). La plupart des études ont montré un impact des protozoaires notamment sur la croissance bactérienne et la formation du biofilm (Curds, 1982; Fried et Lemmer, 2003). Ces études attribuent aux protozoaires un rôle indirect sur le traitement des affluents. Par exemple, Curds (1982) a observé que la prédation exercée par les protozoaires permettait le maintien de la croissance bactérienne en phase exponentielle et, par le fait même, une activité métabolique accrue des bactéries.

Les résultats obtenus sur la croissance microbienne ont montré un doublement de la biomasse entre le début et la fin des essais autant dans les milieux avec protozoaires que ceux sans protozoaires (figure 4.25). Les valeurs de la croissance dans les milieux avec et sans protozoaires n'étaient pas significativement différentes soit de $0,3388 \pm 0,1377$ g MVES/milieu et $0,3906 \pm 0,1484$ g MVES/milieu respectivement. Par contre, l'expérimentation en fioles a limité l'interprétation des données puisque plusieurs conditions différaient de ceux du dénitrificateur à pleine échelle. Ainsi, une différence au niveau de la croissance de la biomasse aurait peut-être été observée si les essais avaient eu lieu en chémostat.

Les observations microscopiques et macroscopiques effectuées quotidiennement lors des essais ont permis de constater une réduction de la densité des bactéries en suspension dans les milieux avec protozoaires (figure 4.26). Cette différence était d'autant plus importante lorsque les populations de protozoaires dans les milieux sans inhibiteurs ont changé. En effet, à partir de 60 heures la population dominante de protozoaires était constituée de petits flagellés. De façon générale, les protozoaires sont reconnus pour avoir un rôle important dans la clarification de l'affluent lors du traitement des eaux usées (Lee

un rôle important dans la clarification de l'affluent lors du traitement des eaux usées (Lee *et al.*, 2004). De plus les flagellés, comme ceux observés lors des essais, nagent librement dans le milieu et ils se nourrissent davantage des bactéries en suspension plutôt que de celles attachées au biofilm (Madoni, 1994). Leur présence dans les fioles lors des essais a probablement contribué à la réduction de la densité des bactéries en suspension observée. La dominance de ce type de protozoaires est également associée à une forte charge de matière organique dans le milieu (Madoni, 1994). Ceci explique possiblement leur prolifération lors des essais en fioles puisque le méthanol était ajouté en excès dans les milieux à titre de source de carbone

L'impact des protozoaires sur la diversité bactérienne a également été étudié au cours des essais. Les résultats ont montré une réduction de la diversité microbienne dans tous les milieux comparativement à la biomasse fraîche mais cette réduction était plus marquée dans les milieux sans protozoaires (figure 4.27). Au total, 20 espèces ont été observées dans les milieux avec protozoaires alors que dans les milieux sans protozoaires ce nombre s'élevait à 16 espèces. La réduction globale observée dans tous les milieux est possiblement attribuable au passage de la flore microbienne du dénitrificateur à un milieu en cuvée et à petite échelle où les concentrations en nitrates et en source de carbone étaient bien différentes de celles du réacteur à pleine échelle (Zehr et Ward, 2002). D'autre part, la réduction de la diversité observée dans les milieux sans protozoaires par rapport aux milieux avec protozoaires ne peut être due qu'à l'absence de prédation puisque les milieux étaient identiques en tout autres points. L'absence de prédation permet une croissance accrue des bactéries dans le milieu ce qui a pour effet d'augmenter la compétition entre ces dernières pour les nutriments (Cox et Deshusses, 1999) (Jost *et al.*, 1973). L'appauvrissement en nutriments et l'accumulation des déchets métaboliques dans le milieu suite à une telle croissance conduit la population microbienne en phase de mortalité et il est donc normal de voir le nombre d'espèces diminuer (Prescott *et al.*, 1995). Ceci pourrait également expliquer l'absence du genre *Hyphomicrobium* sp. dans les milieux sans protozoaires (figure 4.27, colonnes 5 et 6). *Hyphomicrobium* sp. est une bactérie à croissance lente, elle n'est donc pas favorisée lorsqu'il y a une carence en nutriments dans le milieu suite à une forte croissance bactérienne (Labbé *et al.*, 2003b). Les protozoaires sont reconnus pour influencer la composition de la flore microbienne dans les systèmes de

traitement à boues activées (Ratsak *et al.*, 1996). Dans une étude où une culture mixte d'*Azotobacter vinelandii* et de *E. coli* était maintenue en chémostat, Jost et ses collaborateurs (1973) ont montré que la coexistence de ces deux bactéries était possible seulement en présence de la prédation exercée par le protozoaire *Tetrahymena pyriformis*.

6. CONCLUSION

Afin d'offrir un environnement sain pour la faune du mésocosme du Saint-Laurent marin, l'optimisation du procédé de dénitrification est nécessaire pour diminuer les concentrations en nitrates sous le seuil de toxicité de 20 mg N-NO_x/L. Au cours de ce projet, les objectifs visés ont permis l'optimisation et la caractérisation de l'aspect microbiologique du procédé de dénitrification.

Les travaux effectués lors de ce projet ont apporté des solutions concrètes pour le bon fonctionnement et l'optimisation du procédé de dénitrification. Ainsi l'étude a permis de définir un rapport C/N optimal de 1,5 pour la dénitrification au méthanol. Un rapport C/N de 1,0 a également été efficace malgré une diminution du taux de dénitrification en fin d'incubation. Ceci suggère que le rapport optimal exact se situe entre 1,0 et 1,5. L'essai de différents rapports C/N dans cet intervalle serait nécessaire pour déterminer la valeur précise du rapport C/N optimal. De plus, ces expériences devraient être répétées à l'échelle de chémostats puisque ces derniers représentent mieux les conditions du dénitrificateur à pleine échelle. Ainsi il serait possible d'éliminer les limitations expérimentales propres aux essais en fioles. L'étude de la flore microbienne au cours de ces travaux a montré que les différents rapports C/N n'ont pas influencé la diversité.

Ensuite, une méthode de conservation adéquate a été mise au point pour préserver la biomasse du dénitrificateur contribuant ainsi à l'optimisation du procédé. Advenant un arrêt de ce dernier pour une période d'une semaine et moins, la biomasse devrait être conservée à 4°C. Pour éviter la sulfatoréduction qui survient dans ces conditions, la biomasse immergée pourrait être barbotée à l'air ambiant ou encore elle pourrait être maintenue dans une eau de mer sans sulfates. Cependant, l'effet sur la dénitrification de ces méthodes proposées pour éviter la sulfatoréduction n'a pas été étudié. Dans le cas d'un arrêt de plus d'une semaine, la biomasse devrait être congelée à -20°C avec 15% de glycérol afin d'assurer un redémarrage rapide de la dénitrification. La conservation de la biomasse par congélation à -20°C avec glycérol 15% devrait se faire avec de l'eau de mer du dénitrificateur. Lors de la décongélation à la température de la pièce, les supports devraient être bien rincés à l'eau de mer pour enlever l'excès de glycérol. Ce dernier pourrait provoquer une surcharge en carbone lors du redémarrage puisque le dénitrificateur est déjà alimenté au méthanol.

Divers objectifs du projet ont contribué à la caractérisation du procédé de dénitrification ce qui est nécessaire à l'optimisation éventuelle de ce dernier. D'abord, l'étude sur des unités pilotes de la colonisation et de l'évolution des espèces bactériennes, impliquées dans le procédé de dénitrification, a contribué à mieux comprendre la dynamique microbienne en relation avec les différentes conditions d'opération du procédé. Les résultats observés ont permis de conclure que la présence d'oxygène, la nature de la source de carbone ajoutée et le mode d'opération du procédé sont des facteurs qui influencent la diversité et la croissance microbienne. La diversité de la flore microbienne des unités pilotes alimentés au méthanol était bien différente de celle du dénitrificateur à pleine échelle. L'âge des biomasses respectives explique possiblement cette diversité différente. L'étude de l'évolution de la diversité microbienne au-delà de trois mois serait une suite intéressante à ces travaux afin de déterminer si les espèces bactériennes importantes pour la dénitrification persistent dans le biofilm au fil des années et quel impact a cette évolution sur l'efficacité du dénitrificateur.

D'autre part, les travaux de caractérisation effectués ont levé le voile sur un aspect peu étudié des procédés de dénitrification, soit les populations de protozoaires présentes dans le biofilm. La communauté de protozoaires du dénitrificateur était principalement composée d'une grande diversité de ciliés appartenant à la lignée des alvéolobiontes. Les autres clones isolés se sont inscrits dans les différentes lignées d'eucaryotes telles que les ramicristae, les straménopiles et divers groupes à l'intérieur de la lignée des opisthochontes soit les choanoflagellés et les nématodes. Plusieurs espèces de protozoaires habituellement retrouvées dans les procédés de traitement de l'eau douce ont été isolées du dénitrificateur. Cette observation suggère une adaptation de ces espèces aux procédés en eau de mer avec des conditions pauvres en oxygène. De plus, environ 14,5% des clones isolés ont présenté une affiliation phylogénétique indéterminée. Ceci ouvre la voie à la découverte de nouveaux eucaryotes dans un environnement très peu étudié, à savoir le milieu marin et anoxique. L'hybridation *in situ* serait une avenue intéressante pour l'étude de la distribution spatiale et temporelle des protozoaires dans le biofilm. Ceci permettrait d'associer la structure de la communauté de protozoaires aux aspects fonctionnels de cette dernière dans le biofilm du dénitrificateur.

L'étude a également permis de constater que les protozoaires avaient un impact sur l'accumulation d'intermédiaires lors de la dénitrification. Cette observation est importante à considérer pour l'optimisation de la dénitrification puisque l'accumulation d'intermédiaires est indésirable et elle est synonyme d'une dénitrification non efficace. Cependant, l'impact des protozoaires sur l'activité de dénitrification et sur l'accumulation d'intermédiaires devrait être confirmé par des essais en chémostats. Les essais ont également évoqué la corrélation entre la présence des protozoaires et la diminution des bactéries en suspension dans le milieu. Ceci suggère un rôle direct des protozoaires sur la clarification de l'effluent.

7. BIBLIOGRAPHIE

Adey, W. H. et Loveland, K. (1998). *Dynamic aquaria, building living ecosystems*, 2^e édition. Éditeur: Academic Press, New York:498p.

Aesoy, A., Odegaard, H., Back, K., Pujol, R. et Hamon, M. (1998). Denitrification in a packed bed biofilm reactor (BIOFOR)- experiments with different carbon sources. *Water Res* **32**, 1463-1470.

Akunna, J. C., Bizeau, C. et Moletta, R. (1993). Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: Glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Water Res* **27**, 1303-1312.

Aleya, L., Hartmann, H. J. et Devaux, J. (1992). Evidence for the contribution of ciliates to denitrification in a eutrophic lake. *Europ J Protistol* **28**, 316-321.

Alongi, D. M. (1986). Quantitative estimates of benthic protozoa in tropical marine systems using silica gel: a comparison of methods. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **23**, 443-450.

Alonso, A. et Camargo, J. A. (2003). Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Bull Environ Contam Toxicol* **70**, 1006-1012.

Balderston, W. L. et Sieburth, J. M. (1976). Nitrate removal in closed-system aquaculture by columnar denitrification. *Appl Environ Microbiol* **32**, 808-818.

Bassleer, G. (1983). *Uronema marinum*, a new and common parasite on tropical saltwater. *Freshw Mar Aquarium* **6**, 78-81.

Baumann, B., Snozzi, M., Zehnder, A. J. et Van Der Meer, J. R. (1996). Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J Bacteriol* **178**, 4367-4374.

Baumann, B., Snozzi, M., Van der Meer, J. R. et Zehnder, J. B. (1997). Development of stable denitrifying cultures during repeated aerobic-anaerobic transient periods. *Water Res* **31**, 1947-1954.

Beaver, J. R. et Crisman, T. L. (1989). The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems. *Microb Ecol* **17**, 111-136.

Bilanovic, D., Battistoni, P., Cecchi, F., Pavan, P. et Mata-Alvarez, J. (1999). Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. *Water Res* **35**, 3311-3320.

Blaszczyk, M., Mycielski, R., Jaworowska-Deptuch, H. et Matusiak, K. (1979). The influence of some carbon substrates on the efficiency of denitrification of high concentrations of nitrite nitrogen. *Acta Microbiol Pol* **28**, 145-152.

- Blaszczyk, M., Mycielski, R., Jaworowska-Deptuch, H. et Brzostek, K. (1980).** Effect of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrations on the selection of denitrifying bacteria. I. Stationary cultures. *Acta Microbiol Pol* **29**, 397-406.
- Blaszczyk, M. (1983).** Effect of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrations on the selection of denitrifying bacteria. II. Continuous cultures in packed bed reactors. *Acta Microbiol Pol* **32**, 65-71.
- Blaszczyk, M. (1993).** Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3951-3953.
- Bo-Young, J., Yi-Cheung, K. et Mi Seon, P. (2001).** Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis Aquat Org* **47**, 49-55.
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L. & Kolter, R. (2005).** Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**, 20-26.
- Brunel, P., Bossé, L. et Lamarche, G. (1998).** *Catalogue des invertébrés marins de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent*. Éditeur: Brochée, Ottawa: 405p.
- Burlage, R. S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G. et Saylor, G. (1998).** Rapid techniques for the identification of free-living protozoa. *Techniques in microbial ecology*, Éditeur: O. U. Press. New York: pp. 203-207.
- Bütschli, O. (1880)** Erster Band. Protozoa. In: Bronn, H.G. *Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs*. I Band, I Abth, 1-224.
- Camargo, J. A., Alonso, A. et Salamanca, A. (2005).** Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* **58**, 1255-1267.
- Caron, D. A., Countway, P. D. et Brown, M. V. (2004).** The growing contributions of molecular biology and immunology to protistan ecology: molecular signatures as ecological tools. *J Eukaryot Microbiol* **51**, 38-48.
- Catalan Sakairi, M. A., Yasuda, K. et Matsumura, M. (1996).** Nitrogen removal in seawater using nitrifying and denitrifying bacteria immobilized in porous cellulose carrier. *Water Sci. Tech.* **34**, 267-274.
- Cervantes, F., Monroy, O. et Gomez, J. (1998).** Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentration. *Biotechnol. Lett.* **20**, 959-961.
- Cervantes, F. J., De la Rosa, D. A. et Gomez, J. (2001).** Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Bioresour Technol* **79**, 165-170.

- Cheng, S. Y. et Chen, J. C. (2002).** Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquat Toxicol* **61**, 181-193.
- Christensson, M., Lie, E. et Welander, T. (1994).** A comparison between ethanol and methanol as carbon sources for denitrification. *Water Sci Technol* **30**, 83-90.
- Claus, G. et Kutzner, H. J. (1985).** Denitrification of nitrate and nitric acid with methanol as carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* **22**, 378-381.
- Constantin, H. et Fick, M. (1997).** Influence of C-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Res* **31**, 583-589.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.
- Cox, H. H. J. et Deshusses, M. A. (1999).** Biomass control in waste air biotrickling filters by protozoan predation. *Biotechnol Bioeng* **62**, 216-224.
- Curds, C. R., Cockburn, A. et Vandyke, J. M. (1968).** An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated-sludge process. *Water Pollut Control*, 312-329.
- Curds, C. R. (1982).** The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes. *Annu Rev Microbiol* **36**, 27-46.
- Dancosse, J., D.M.V. (2005).** Communication personnelle, Biodôme de Montréal. 4777 Pierre-De-Coubertin, Montréal, Canada H1V 1B3.
- Dawson, S. C. et Pace, N. R. (2002).** Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8324-8329.
- Dickerson, H. W. (1994).** Treatment of *Cryptocaryon irritans* in aquaria. *SeaScope* **11**.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T. L. et Massana, R. (2001a).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2942-2951.
- Diez, B., Pedros-Alio, C. et Massana, R. (2001b).** Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2932-2941.
- Dolan, J. R. (2005).** Marine ecology: Different measures of biodiversity. *Nature* **433**, E9.
- Donlan, R. M. (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**, 881-890.

- Douglas-Helders, G. M., O'Brien, D. P., McCorkell, B. E., Zilberg, D., Gross, A., Carson, J. et Nowak, B. F. (2003).** Temporal and spatial distribution of paramoebae in the water column-a pilot study. *J Fish Dis* **26**, 231-240.
- Duval, B. et Margulis, L. (1995).** The microbial community of *Ophrydium versatile* colonies: endosymbionts, residents, and tenants. *Symbiosis* **18**, 181-210.
- Environnement Canada (2003).** Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: nitrate ion. *Canadian Environmental Quality Guidelines*, 1-7
- FAO-Food and agriculture organization of the United Nations (1997).** Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. Editeur: Kazuhisa Miyamoto, Osaka University. Osaka, Japan. *FAO Agricultural Service Bulletin* **128**, ch. 4.
- Fenchel, T. (1986).** The ecology of heterotrophic microflagellates. *Adv Microb Ecol* **9**, 57-97.
- Fenchel, T. et Ramsing, N. B. (1992).** Identification of sulphate-reducing ectosymbiotic bacteria from anaerobic ciliates using 16S rRNA binding oligonucleotide probes. *Arch Microbiol* **158**, 394-397.
- Finlay, B. J., Span, A. S. W. et Harman, J. M. P. (1983).** Nitrate respiration in primitive eukaryotes. *Nature* **303**, 333-336.
- Finlay, B. J., Maberly, S. C. et Esteban, G. F. (1996).** Spectacular abundance of ciliates in anoxic pond water: contribution of symbiont photosynthesis to host respiratory oxygen requirements. *FEMS Microbiol Ecol* **20**, 229-235.
- Foissner, W. et Berger, H. (1996).** A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *FreshwBiol* **35**, 375-482.
- Fried, J., Mayr, G., Berger, H., Traunspurger, W., Psenner, R. et Lemmer, H. (2000).** Monitoring protozoa and metazoa biofilm communities for assessing wastewater quality impact and reactor up-scaling effects. *Water Sci Technol* **41**, 309-316.
- Fried, J. et Lemmer, H. (2003).** On the dynamics and function of ciliates in sequencing batch biofilm reactors. *Water Sci Technol* **47**, 189-196.
- Fuchs, W., Schatzmayr, G. et Braun, R. (1997).** Nitrate removal from drinking water using a membrane-fixed biofilm reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**, 267-274.
- Gast, R. J., Dennett, M. R. et Caron, D. A. (2004).** Characterization of protistan assemblages in the Ross Sea, Antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2028-2037.

Gavazza dos Santos, S., Amâncio Varesche, M. B., Zaiat, M. et Foresti, E. (2004). Comparison of methanol, ethanol, and methane as electron donors for denitrification. *Environ Eng Sci* **21**, 313-320.

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., E.W., N., Wood, W. A., Krieg, N. R. et Phillips, G. B. (1981). *Manual of methods for general bacteriology*. Éditeur: American society for microbiology. Washington: 524p.

Gomez, M. A., Gonzalez-Lopez, J. et Hontoria-Garcia, E. (2000). Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. *J Hazard Mater* **80**, 69-80.

Grguric, G., Wetmore, S. S. et Fournier, R. W. (2000). Biological denitrification in a closed seawater system. *Chemosphere* **40**, 549-555.

Hackstein, J. H., Akhmanova, A., Boxma, B., Harhangi, H. R. et Voncken, F. G. (1999). Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol* **7**, 441-447.

Hallin, S., Rothman, M. et Pell, M. (1996). Adaptation of denitrifying bacteria to acetate and methanol in activated sludge. *Water Res* **30**, 1445-1450.

Hallin, S. et Pell, M. (1998). Metabolic properties of denitrifying bacteria adapting to methanol and ethanol in activated sludge. *Water Res* **32**, 13-18.

Harris, J. K., Kelley, S. T. et Pace, N. R. (2004). New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division *OP11*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 845-849.

Heck, K. L., van Belle, G. et Simberloff, D. (1975). Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* **56**, 1459-1461.

Her, J. et Huang, J. (1995). Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Bioresour Technol* **54**, 45-51.

Holt, J. G. et Krieg, N. R. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol.1, Éditeur: Williams & Wilkins. Baltimore: 964p.

Horan, N. J. (1990). *Biological wastewater treatment systems, theory and operation*. Éditeur: John Wiley et Sons Ltd. Chichester: 310p.

Huber, T., Faulkner, G. et Hugenholtz, P. (2004). Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**, 2317-2319.

Hurlbert, S. (1971). The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* **52**, 577-586.

- Hwang, Y., Sakuma, H. et Tanaka, T. (1994).** Denitrification with isopropanol as a carbon source in a biofilm system. *Water Sci Technol* **30**, 69-78.
- Ilies, P. et Mavinic, D. S. (2001).** The effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of a high ammonia landfill leachate. *Water Res* **35**, 2065-2072.
- Jetten, M. S., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., de Vries, S., van Loosdrecht, M. C. et Kuenen, J. G. (1997).** Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 75-93.
- Jost, J. L., Drake, J. F., Fredrickson, A. G. et Tsuchiya, H. M. (1973).** Interactions of *Tetrahymena pyriformis*, *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and glucose in a minimal medium. *J Bacteriol* **113**, 834-840.
- Karagozoglu, B., Sarioglu, M. et Peker, I. (2002).** Nitrate removal in a fixed-film column reactor using *Paracoccus denitrificans* affected by different carbon sources. *Fresenius Environmental Bulletin* **11**, 927-932.
- Kirsop, B. E. et Snell, J. J. S. (1984).** *Maintenance of microorganisms, a manual of laboratory methods*. Éditeurs: Kirsop, B.E. et Snell, J.J.S., Academic Press. London: 207p.
- Knowles, R. (1982).** Denitrification. *Microbiol rev* **46**, 43-70.
- Koch, G. et Siegrist, H. (1997).** Denitrification with methanol in tertiary filtration. *Water Res* **31**, 3029-3038.
- Koenig, A. et Liu, L. (2004).** Autotrophic denitrification of high-salinity wastewater using elemental sulfur: batch tests. *Water Environ Res* **76**, 37-46.
- Labbe, N., Parent, S. et Villemur, R. (2004).** *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov., a novel α -proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 269-273.
- Labbé, N., Parent, S. et Villemur, R. (2003a).** Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. *Water Res* **37**, 914-920.
- Labbé, N., Juteau, P., Parent, S. et Villemur, R. (2003b).** Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal Biodome, Canada. *Microb Ecol* **46**, 12-21.
- Labelle, M. (2004).** Optimisation d'un bioprocédé de dénitrification d'un système aquacole marin en circuit fermé au Biodôme de Montréal. Mémoire de maîtrise. École Polytechnique de Montréal: 133p.

- Labelle, M. A., Juteau, P., Jolicoeur, M., Villemur, R., Parent, S. & Comeau, Y. (2005).** Seawater denitrification in a closed mesocosm by a submerged moving bed biofilm reactor. *Water Res* **39**, 3409-3417.
- Lawrence, J. R. & Neu, T. R. (1999).** Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol* **310**, 131-144.
- Lecointre, G. et Le Guyader, H. (2001).** *Classification phylogénétique du vivant*. Éditeur: Belin. Paris: 543p.
- Lee, D. Y., Ramos, A., Macomber, L. et Shapleigh, J. P. (2002).** Taxis response of various denitrifying bacteria to nitrate and nitrite. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2140-2147.
- Lee, J. J., Leedale, G. F. et Bradbury, P. (2000a).** *The illustrated guide to the protozoa*, 2^e ed. vol. 1 et 2. Éditeurs: Lee, J.J., Leedale, G.F. et Bradbury, P., Society of protozoologists. Kansas: 1432p.
- Lee, P. G., Lea, R. N., Dohmann, D., Prebilsky, W., Turk, P. E., Ying, H. et Whitson, J. L. (2000b).** Denitrification in aquaculture systems: an example of a fuzzy logic problem. *Aquacult Eng* **23**, 37-59.
- Lee, S., Basu, S., Tyler, C. H. et Wei, I. W. (2004).** Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island treatment plant. *Adv Environ Res* **8**, 371-378.
- Lemmer, H., Zaglauer, A. et Metzner, G. (1997).** Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 1: Physico-chemical and biological characterization. *Water Res* **31**, 1897-1902.
- Lemmer, H., Zaglauer, A., Neef, A., Meier, H. et Amann, R. (1997b).** Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 2: Composition and ecology of the bacterial community in the biofilms. *Water Res* **31**, 1903-1908.
- Leta, S., Gumaelius, L., Assefa, F. et Dalhammar, G. (2004).** Identification of efficient denitrifying bacteria from tannery wastewaters in Ethiopia and a study of the effects of chromium III and sulphide on their denitrification rate. *World J Microbiol Biotechnol* **20**, 405-411.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. et other authors (1980).** A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* **27**, 37-58.
- Luna-Pabello, V. M., Plisson-Saune, S., Paul, E. et Duran de Bazua, C. (1996).** Ciliatological characterization of a biological reactor that eliminates nitrogen with intermittent aeration. *Rev Latinoam Microbiol* **38**, 89-96.
- Madoni, P. (1994).** A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Res* **28**, 67-75.

- Marsh, T. L., Liu, W., Forney, L. J. et Cheng, H. (1998).** Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. *Water Sci Technol* **37**, 455-460.
- Martin-Cereceda, M., Zamora, J., Perez-Uz, B. et Guinea, A. (2002).** Ciliate communities of rotating biological contactor biofilms: a multivariate approach. *Syst Appl Microbiol* **25**, 301-313.
- Mateju, V., Cížinská, S., Krejčí, J. et Janoch, T. (1992).** Biological water denitrification - A review. *Enzyme Microb Technol* **14**, 170-183.
- Mekonen, A., Kumar, P. et Kumar, A. (2001).** Use of sequencing batch reactor for biological denitrification of high nitrate-containing water. *J Envir Engrg* **127**, 273-280.
- Menasveta, P., Panritdam, T., Sihanonth, P., Powtongsook, S., Chuntapa, B. et Lee, P. (2001).** Design and fonction of a closed, recirculating seawater system with denitrification for the culture of black tiger shrimp broodstock. *Aquacult Eng* **25**, 35-49.
- Milby, T. H. et Baselt, R. C. (1999).** Hydrogen sulfide poisoning: clarification of some controversial issues. *Am J Ind Med* **35**, 192-195.
- Millero, F. J. et Sohn, M. L. (1992).** *Chemical oceanography*. Éditeur: Boca Raton, CRC Press. Florida: 531p.
- Morgan, P. & Watkinson, R. J. (1989).** Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *Crit Rev Biotechnol* **8**, 305-333.
- Mohseni-Bandpi, A. et Elliott, D. J. (1998).** Groundwater denitrification with alternative carbon sources. *Water Sci Technol* **38**, 237-243.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. et Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.
- Mycielski, R., Blaszczyk, M., Jackowska, A. et Olkowska, H. (1983).** Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. II. Ethanol. *Acta Microbiol Pol* **32**, 381-388.
- Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H. et Schleifer, K. H. (1996).** Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4329-4339.
- Oh, J. et Silverstein, J. (1999).** Acetate limitation and nitrite accumulation during denitrification. *J Envir Engrg* **125**, 234-242.

- Otani, Y., Hasegawa, K. et Hanaki, K. (2004).** Comparison of aerobic denitrifying activity among three cultural species with various carbon sources. *Water Sci Technol* **50**, 15-22.
- Pawlowski, J. (2000).** Introduction to the molecular systematics of Foraminifera. *Micropaleontology* **1**, 1-112.
- Parent, S. et Morin, A. (2000).** N budget as water quality management tool in closed aquatic mesocosms. *Water Res* **34**, 1846-1856.
- Park, E. J., Seo, J. K., Kim, M. R., Jung, I. H., Kim, J. Y. et Kim, S. K. (2001).** Salinity acclimation of immobilized freshwater denitrifier. *Aquacult Eng* **24**, 169-180.
- Parsek, M. R. et Greenberg, E. P. (2005).** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 27-33.
- Patterson, D. J. (1999).** The diversity of eukaryotes. *Am Nat* **154**, S96-S124.
- Patterson, D. J. (2003).** *Free-living freshwater protozoa, a colour guide*. Éditeur: ASM Press. Washington, D.C.: 223p.
- Payne, W. J. (1981).** *Denitrification*. Éditeur: John Wiley et Sons. New York: 214p.
- Petroni, G., Dini, F., Verni, F. et Rosati, G. (2002).** A molecular approach to the tangled intrageneric relationships underlying phylogeny in *Euplotes* (Ciliophora, Spirotrichea). *Mol Phylogenet Evol* **22**, 118-130.
- Philippot, L. (2002).** Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta* **1577**, 355-376.
- Prescott, L., Harley, J., et Klein, D. (1995).** *Microbiologie*. Éditeur: De Boeck et Larcier. Bruxelles: 1014p.
- Raghukumar, S. (2002).** Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *Europ J Protistol* **38**, 127-145.
- Ratsak, C. H., Kooi, B. W. et van Verseveld, H. W. (1994).** Biomass reduction and mineralization increase due to the ciliate *Tetrahymena pyriformis* grazing on the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Water Sci Technol* **29**, 119-128.
- Ratsak, C. H., Maarsen, K. A. et Kooijman, S. A. L. M. (1996).** Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. *Water Res* **30**, 1-12.
- Sauthier, N., Grasmick, A. et Blancheton, J. P. (1998).** Biological denitrification applied to a marine closed aquaculture system. *Water Res* **32**, 1932-1938.

- Sauvé, I. (2000).** Caractérisation de la filière de dénitrification des eaux de mer du Biodôme de Montréal. Mémoire de maîtrise. École Polytechnique de Montréal: 210p.
- Sawyer, C. N., McCarty, P. L. et Parkin, G. F. (1994).** *Chemistry for environmental engineering*. 4^e édition. Éditeurs: Clark, B. J. et Morriss, J. M., McGraw-Hill. New York: pp.303
- Spotte, S. (1979).** *Seawater aquariums: the captive environment*. Éditeur: John Wiley and Sons. New York: 413p.
- Spotte, S. (1991).** *Captive seawater fishes, science and technology*. 1^{re} ed. Éditeur: John Wiley et Sons. Toronto: 413p
- Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N. et Holt, J. G. e. (1989).** *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 3. Éditeur: Williams et Wilkins. Baltimore: 744p.
- Stoeck, T. et Epstein, S. (2003).** Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2657-2663.
- Stoeck, T., Taylor, G. T. et Epstein, S. S. (2003).** Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea). *Appl Environ Microbiol* **69**, 5656-5663.
- Sudo, R. et Aiba, S. (1984).** Role and function of protozoa in the biological treatment of polluted waters. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **29**, 117-141.
- Takishita, K., Miyake, H., Kawato, M. et Maruyama, T. (2005).** Genetic diversity of microbial eukaryotes in anoxic sediment around fumaroles on a submarine caldera floor based on the small-subunit rDNA phylogeny. *Extremophiles*, **9**, 185-196.
- Tal, Y., Watts, J. E. M., Schreier, S. B., Sowers, K. R. et Schreier, H. J. (2003).** Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. *Aquaculture* **251**, 187-202.
- Tam, N. F. Y., Wong, Y. S. et Leung, G. (1992).** Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrients by the nitrification-denitrification process. *Water Res* **26**, 1229-1236.
- Tam, N. F. Y., Leung, G. L. W. et Wong, Y. S. (1994).** The effects of external carbon loading on nitrogen removal in sequencing batch reactors. *Water Sci Technol* **30**, 73-81.
- Tiedje, J. M. (1988).** Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Biology of anaerobic microorganisms*. Éditeur: A. J. B. Zehnder. New York: pp.179-244.

- Timmermans, P. et Van Haute, A. (1983).** Denitrification with methanol: fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp. *Water Res* **17**, 1249-1255.
- Van der Hoek, J. P., Latour, P. J. M. et Klapwijk, A. (1987).** Denitrification with methanol in the presence of high salt concentrations and at high pH levels. *Appl Microbiol Biotechnol* **27**, 199-205.
- Van Hannen, E. J., Mooij, W., van Agterveld, M. P., Gons, H. J. et Laanbroek, H. J. (1999).** Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2478-2484.
- Van Hoek, A. H., Van Alen, T. A., Sprakel, V. S., Leunissen, J. A., Brigge, T., Vogels, G. D. et Hackstein, J. H. (2000).** Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates. *Mol Biol Evol* **17**, 251-258.
- Van Loosdrecht, M. C. M. et Jetten, M. S. M. (1998).** Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Sci Technol* **38**, 1-7.
- Wackett, L.P. et Hershberger, C.D. (2001).** *Biocatalysis and biodegradation: microbial transformation of organic compounds*. Éditeur: ASM Press, Washington D.C. 228p.
- Welander, U. et Mattiasson, B. (2003).** Denitrification at low temperatures using a suspended carrier biofilm process. *Water Res* **37**, 2394-2398.
- Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A. et Inamori, Y. (2001).** Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel. electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method. *J Biosci Bioeng* **92**, 346-353.
- Zehr, J. P. et Ward, B. B. (2002).** Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1015-1024.
- Zumft, W. G. (1997).** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 533-616.