

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**ENRICHISSEMENT ET CARACTÉRISATION DES  
POPULATIONS BACTÉRIENNES CAPABLES  
D'UTILISER LE THIOCYANATE ET LE CYANATE**

**Par  
Julie Ménard**

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

Jury d'évaluation

Président du jury

et examinateur interne

Richard Villemur, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Louise Deschênes, École Polytechnique de Montréal

Directeur de recherche

Éric Déziel, INRS-Institut Armand-Frappier

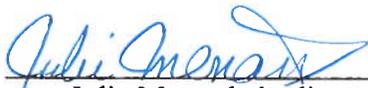
Co-directeur de recherche

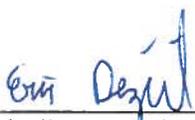
Pierre Juteau, Cégep St-Laurent

© Droits réservés de Julie Ménard, 2011

## Résumé

Ce projet de recherche porte sur l'étude des microorganismes capable d'utiliser et de dégrader le thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) et le cyanate ( $\text{OCN}^-$ ). Ces composés se retrouvent dans les effluents des installations minières où il y a cyanuration pour la solubilisation de l'or. Le  $\text{SCN}^-$  et l' $\text{OCN}^-$  proviennent de la réaction entre les composés de soufre et le cyanure et par l'oxydation du cyanure. A concentrations élevées, ces substances sont nocives pour la faune et la flore aquatique. Toutefois, ces dérivés du cyanure peuvent être métabolisés par des microorganismes. À partir de la biomasse obtenue des bioréacteurs responsables du biotraitement de l'effluent d'une mine d'or située à Cadillac en Abitibi, des consortiums de microorganismes ont été enrichis pour leur utilisation du  $\text{SCN}^-$  et  $\text{OCN}^-$  comme seules sources de carbone et/ou d'azote à des concentrations de 600 ppm (mg/L) pour le  $\text{SCN}^-$  et 75 ppm (mg/L) pour l' $\text{OCN}^-$  basées sur les concentrations observées sur le site. De ces enrichissements, des centaines de bactéries ont été isolées sur milieux sélectifs et non-sélectifs. L'identification de ces isolats a mis en évidence certains groupes bactériens plus abondants, dont les actinobactéries, les  $\beta$ -protéobactéries, ainsi que les  $\alpha$ -protéobactéries. Du côté moléculaire, des génothèques du gène de l'ARN 16S ont été générées pour les enrichissements finaux; elles ont confirmé l'abondance des rhizobiales dans les enrichissements. Finalement, lors des essais de biodégradation avec les isolats les plus abondants, aucun candidat n'a été capable d'utiliser le  $\text{SCN}^-$  à 600 ppm tandis que la majorité des isolats testés pour l'utilisation de l' $\text{OCN}^-$  ont été capables de l'utiliser lorsqu'elle se trouve à concentration de 75 ppm. Parmi ces dernières, l'isolat JM695, affiliable à *Sphingopyxis* sp., a démontré une consommation particulièrement rapide de l' $\text{OCN}^-$  et dans plusieurs conditions. Les résultats suggèrent donc que les bactéries pouvant utiliser le  $\text{SCN}^-$  en culture pure ne sont pas cultivables en conditions testée, alors que la l'utilisation de l' $\text{OCN}^-$  semblent être un phénomène répandu chez les microorganismes. La caractérisation de ces microorganismes pourrait permettre d'adapter les paramètres physiques du traitement biologique afin de promouvoir la prolifération de ces bactéries biodégradantes pour optimiser le procédé.

  
Julie Menard, étudiante

  
Eric Déziel, directeur de recherche

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Pr. Éric Déziel, qui m'a pris dans son groupe. Il a su me guider tout au long du projet. Je voudrais également offrir mes remerciements à mon co-directeur Pierre Juteau, qui a monté le projet auquel ma maîtrise a fait partie.

La collaboration technique et académique du Groupe de recherche en microbiologie de l'environnement a été d'une grande importance pour le projet. Particulièrement, je suis redevable au Pr. Richard Villemur, à Mme Karla Vazquez, à Mme Marie-Christine Groleau et à M. Roger Dubuc, pour leurs expertises qui furent grandement appréciées lors des moments plus difficiles. Mes collègues de ce groupe ont également été d'un grand appui; un gros merci aux étudiants du laboratoire Déziel; merci à Julien Tremblay pour son expertise en bio-informatique; merci à Julie Auclair qui fut mon mentor et; merci à tout le groupe de recherche en microbiologie de l'environnement pour avoir su me faire partager de bons moments pendant ces mois.

Enfin, j'aimerais souligner l'appui de mes parents depuis le début de mon cheminement scolaire ainsi que leurs encouragements lors des périodes plus ardues. De plus, merci à mes proches pour votre patience et votre compréhension tout au long de ce projet. Votre présence et votre soutien moral m'ont permis d'atteindre mon but.

Je ne peux terminer sans remercier la compagnie Agnico-Eagle, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et la fondation Armand-Frappier pour leur soutien financier.

Merci, vous faites partie de mon succès.

# Table des matières

Résumé.....	2
Remerciements .....	3
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	9
Liste des abbréviations .....	10
Introduction.....	11
<b>1. Revue de littérature .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Caractéristiques et utilisation de l'or .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Importance économique de l'or .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Méthode d'extraction de l'or.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Cyanure.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4.1 Toxicité du cyanure.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4.2 Standards environnementaux des effluents cyanurés.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.3 Traitements des effluents cyanurés .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.4 Biodégradation des cyanures .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4.5 Réactions enzymatiques impliquées dans la dégradation du cyanure ..</b>	<b>24</b>
<b>1.5 Thiocyanate et cyanate .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5.1 Caractéristiques physico-chimiques du thiocyanate et du cyanate .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5.2 Toxicité du thiocyanate et du cyanate .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.3 Dégradation du thiocyanate et du cyanate .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.4 Biodégradation du thiocyanate et cyanate .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5.4.1 Voie de l'oxysulfure de carbone.....</b>	<b>27</b>
<b>1.5.4.2 Voie du cyanate .....</b>	<b>28</b>
<b>1.5.4.3 Microorganismes connus pour consommer et dégrader le .....</b>	<b>30</b>
<b>thiocyanate.....</b>	<b>30</b>

1.5.4.4 Microorganismes connus pour consommer et dégrader le cyanate.....	31
1.6 Mine Homestake, Dakota du Sud .....	37
1.7 Mine Laronde, Agnico-Eagle .....	40
1.8 Problématique, hypothèse et objectifs du projet.....	44
2. Matériel et Méthodes .....	45
2.1 Techniques d'enrichissement .....	45
2.1.1 Échantillonnage .....	45
2.1.2 Milieux d'enrichissements .....	46
2.1.3 Suivi de la croissance par Bradford .....	48
2.1.4 Quantification du cyanate et du thiocyanate par CLHP.....	48
2.2 Isolement des bactéries .....	50
2.2.1 Techniques d'ensemencement et d'isolement.....	50
2.2.2 Recettes des géloses .....	51
2.3 Techniques de biologie moléculaire.....	51
2.3.1 Extraction d'ADN .....	51
2.3.1.1 Extraction d'ADN total de biomasse et d'enrichissement.....	51
2.3.1.2 Extraction d'ADN total de souches pures.....	52
2.3.2 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	53
2.3.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour le gène de l'ARN ...	
ribosomal 16S .....	54
2.3.4 Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) .....	54
2.4 Élaboration de génothèques du gène de l'ARN ribosomal 16S .....	55
2.4.1 Échantillon, purification des produits PCR, ligation et transformation	55
2.4.2 Sélection de clones, extraction plasmidique et criblage.....	57
2.4.3 Séquençage, et analyses statistiques et phylogéniques.....	58
2.5 Tests de biodégradation par isolat.....	59

<b>3. Résultats.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1 Suivi de la flore bactérienne des enrichissements .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1.1 Suivi de la microflore par CLHP pour la consommation du SCN<sup>-</sup> et .....</b>	
<b>l'OCN<sup>-</sup> .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1.2 Suivi de la croissance des microflores par protéines totales (Bradford) 67</b>	
<b>3.1.3 Suivi de la microflore par PCR-DGGE.....</b>	<b>72</b>
<b>3.2 Analyse biomoléculaire des séquences provenant des isolats.....</b>	<b>76</b>
<b>3.2.1 Isolement d'isolats bactériens .....</b>	<b>76</b>
<b>3.2.2 Sélection des isolats par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant ...</b>	
<b>(DGGE).....</b>	<b>76</b>
<b>3.3 Analyse phylogénique des séquences provenant des génothèques 16S .....</b>	<b>83</b>
<b>3.3.1 Sélection des candidats par PCR-DGGE .....</b>	<b>83</b>
<b>3.3.2 Analyse de la biodiversité par ARB.....</b>	<b>88</b>
<b>3.3.3 Analyse de la biodiversité des clones par Biodiversity Pro .....</b>	<b>101</b>
<b>3.4 Analyse de la biodégradation du SCN<sup>-</sup> et de l'OCN<sup>-</sup> par les isolats</b>	
<b>microbiens sélectionnés provenant des enrichissements CNO(CN) RBC,</b>	
<b>SCN(CN) RBC et SCN(CN) MBBR .....</b>	<b>102</b>
<b>3.4.1 Suivi de la dégradation des molécules par CLHP .....</b>	<b>102</b>
<b>4. Discussion.....</b>	<b>107</b>
<b>4.1 Enrichissement .....</b>	<b>107</b>
<b>4.2 Isolement et identification .....</b>	<b>114</b>
<b>4.3 Essais de biodégradation avec les souches pures.....</b>	<b>123</b>
<b>5. Conclusion .....</b>	<b>125</b>
<b>6. Liste des références bibliographiques .....</b>	<b>127</b>
<b>Annexe 1.....</b>	<b>136</b>
<b>Annexe 2.....</b>	<b>141</b>
<b>Annexe 3.....</b>	<b>144</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	<b>Dégradation du thiocyanate par la voie de l'oxysulfure de carbone.....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 2.</b>	<b>Dégradation du thiocyanate par la voie du cyanate .....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 3.</b>	<b>Dégradation du thiocyanate produisant du tetrathionate.....</b>	<b>30</b>
<b>Figure 4.</b>	<b>Dégradation du thiocyanate en condition anaérobie .....</b>	<b>30</b>
<b>Figure 5.</b>	<b>Procédé du traitement biologique de la mine Homestake, Dakota du Sud.....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 6.</b>	<b>Traitements des métaux de la mine Laronde d'Agnico-Eagle.....</b>	<b>42</b>
<b>Figure 7.</b>	<b>Traitement de l'eau de la mine Laronde d'Agnico-Eagle. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figure 8.</b>	<b>Schématisation des bassins du biotraitement de l'effluent minier de la mine Laronde.....</b>	<b>46</b>
<b>Figure 9.</b>	<b>Suivi des enrichissements par CLHP sur le cyanate ensemencés avec la biomasse provenant du RBC utilisé (A) pour source de carbone et d'azote ; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote.....</b>	<b>63</b>
<b>Figure 10.</b>	<b>Suivi des enrichissements par CLHP sur le thiocyanate ensemencés avec la biomasse provenant du RBC utilisé (A) pour source de carbone et d'azote ; (B) Suivi pour source de carbone ; (C). pour source d'azote. ..</b>	<b>64</b>
<b>Figure 11.</b>	<b>Suivi des enrichissements par CLHP et provenant du MBBR pour le cyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote ; (B) pour source de carbone ; (C) pour source d'azote. ....</b>	<b>65</b>
<b>Figure 12.</b>	<b>Suivi des enrichissements par CLHP et provenant du MBBR pour le thiocyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote. ....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 13.</b>	<b>Suivi de la croissance des enrichissements provenant du RBC pour le cyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote. ....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 14.</b>	<b>Suivi de la croissance des enrichissements provenant du RBC pour le thiocyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote. ....</b>	<b>69</b>

<b>Figure 15. Suivi de la croissance des enrichissements provenant du MBBR pour le cyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote. ....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 16. Suivi de la croissance des enrichissements provenant du MBBR pour le thiocyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote. ....</b>	<b>71</b>
<b>Figure 17. Profil PCR-DGGE de la diversité microbienne des enrichissements RBC et MBBR (CNO(N)). ....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 18. Profil PCR-DGGE de la diversité microbienne des enrichissements RBC et MBBR (CNO(C)). ....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 19. Profils PCR-DGGE de la diversité microbienne des enrichissements RBC (CNO(CN)), RBC SCN(CN) et MBBR SCN(CN). ....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 20A. Profil PCR-DGGE des isolats obtenus après enrichissement.....</b>	<b>77</b>
<b>Figure 20B. Profil PCR-DGGE des isolats obtenus après enrichissement.....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 20C. Profil PCR-DGGE des isolats obtenus après enrichissement.....</b>	<b>79</b>
<b>Figure 20D. Profil PCR-DGGE des isolats obtenus après enrichissement.....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 21. Abondance et diversité bactérienne des biomasses d'origine, et des microflores des enrichissements. ....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 22. Profil PCR-DGGE des clones provenant du RBC SCN(CN).....</b>	<b>84</b>
<b>Figure 23. Profil PCR-DGGE des clones provenant du MBBR SCN(CN). ....</b>	<b>85</b>
<b>Figure 24. Profil PCR-DGGE des clones provenant du RBC CNO(CN).....</b>	<b>86</b>
<b>Figure 25. Abondance et diversité des séquences du gène de l'ADNr 16S des génothèques.....</b>	<b>87</b>
<b>Figure 26A. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) RBC pour les alpha-protéobactéries. ....</b>	<b>89</b>
<b>Figure 26B. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) RBC pour les alpha et beta-protéobactéries.....</b>	<b>90</b>
<b>Figure 26C. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) RBC pour les beta-protéobactéries. ....</b>	<b>91</b>
<b>Figure 26D. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) RBC pour les actinobactéries et firmicutes. ....</b>	<b>92</b>

<b>Figure 27A. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN)</b>	
<b>MBBR pour les alpha-protéobactéries.....</b>	<b>93</b>
<b>Figure 27B. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN)</b>	
<b>MBBR pour les firmicutes et les actinobactéries. ....</b>	<b>94</b>
<b>Figure 27C. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN)</b>	
<b>MBBR pour les beta-protéobactéries.....</b>	<b>95</b>
<b>Figure 27D. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN)</b>	
<b>MBBR pour les classes gamma-protéobactéries. ....</b>	<b>96</b>
<b>Figure 28A. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement CNO(CN)</b>	
<b>RBC pour les alpha-protéobactéries. ....</b>	<b>97</b>
<b>Figure 28B. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement CNO(CN)</b>	
<b>RBC pour les bacteroidetes, les firmicutes et les actinobactéries.....</b>	<b>98</b>
<b>Figure 28C. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement CNO(CN)</b>	
<b>RBC pour les gamma-protéobactéries. ....</b>	<b>99</b>
<b>Figure 28D. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement CNO(CN)</b>	
<b>RBC pour les beta-protéobactéries. ....</b>	<b>100</b>
<b>Figure 29. Courbe de raréfaction des clones des enrichissements.....</b>	<b>101</b>
<b>Figure 30A. Dégradation de l'OCN<sup>-</sup> par des isolats obtenus après enrichissement</b>	
<b>CNO(CN) RBC.....</b>	<b>103</b>
<b>Figure 30B. Dégradation de l'OCN<sup>-</sup> par des isolats obtenus après enrichissement</b>	
<b>CNO(CN) RBC.....</b>	<b>104</b>
<b>Figure 31B. Dégradation du SCN<sup>-</sup> par des isolats obtenus après enrichissement..</b>	<b>105</b>
<b>Figure 31B. Dégradation du SCN<sup>-</sup> par des isolats obtenus après enrichissement..</b>	<b>106</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1. Groupes des cyanures.....</b>	<b>17</b>
<b>Tableau 2. Procédés pour le traitement du cyanure d'après sa forme. ....</b>	<b>19</b>
<b>Tableau 3. Caractéristiques des microorganismes pouvant utiliser le thiocyanate..</b>	<b>33</b>
<b>Tableau 4. Efficacité du biotraitement sur le cyanure et ses dérivées sur le rejet de . l'effluent. ....</b>	<b>41</b>
<b>Tableau 5. Composition nutritionnelle des enrichissements et géloses.....</b>	<b>47</b>
<b>Tableau 6. Amorces universelles utilisées lors des amplifications.....</b>	<b>57</b>
<b>Tableau 7. Isolats provenant de la biomasse initiale du RBC.....</b>	<b>144</b>
<b>Tableau 8. Isolats provenant de la biomasse initiale du MBBR.....</b>	<b>150</b>
<b>Tableau 9. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du RBC.....</b>	<b>156</b>
<b>Tableau 10. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du MBBR. ....</b>	<b>160</b>
<b>Tableau 11. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(CN) du RBC.....</b>	<b>165</b>
<b>Tableau 12. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(C) du RBC. ....</b>	<b>169</b>
<b>Tableau 13. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(N) du RBC. ....</b>	<b>170</b>
<b>Tableau 14. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(CN) du MBBR. ....</b>	<b>172</b>
<b>Tableau 15. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(C) du MBBR.....</b>	<b>174</b>
<b>Tableau 16. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(N) du MBBR.....</b>	<b>175</b>

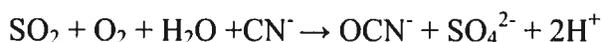
## Liste des abréviations

AcNa	Acétate de sodium
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
Au	Or
BHI	Milieu "brain heart infusion"
CH <sub>4</sub>	Méthane
CH <sub>3</sub> COONa	Acétate de sodium
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CN	Cyanure
CNO(C)	Cyanate utilisé pour source de carbone
CNO(N)	Cyanate utilisé pour source d'azote
CNO(CN)	Cyanate utilisé pour source de carbone et d'azote
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
DCO	Demande chimique en oxygène
COS	Oxysulfure de carbone
DGGE	Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant
D.O.	Densité optique
e <sup>-</sup>	Électron
FISH	Hybridation in-situ en fluorescence
H	Hydrogène
HCN	Cyanure d'hydrogène
HCO <sub>3</sub>	Bicarbonate
HCOOH	Acide méthanoïque
HOCN	Acide cyanique
H <sub>2</sub> S	Sulfure d'hydrogène
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide sulfurique
H <sub>2</sub> SO <sub>5</sub>	Acide peroxymonosulfurique
INCO	International Nickel Company
LB	Milieu Lysis Broth
MBBR	Moving Bed Biofilm Reactor
N <sub>2</sub>	Azote gazeux
NaCN	Cyanure de sodium

NAD(P) / NADP(H)	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
NB	Milieu "Nutrient Broth"
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH <sub>3</sub>	Ammoniac
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfate d'ammonium
NO <sub>3</sub>	Nitrate
OCN	Cyanate
OH	Hydroxyde
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PIB	Produit intérieur brut
RBC	Rotating biological contactor
RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
S	Soufre
SAD	Acide fort dissociable
SCN <sup>-</sup>	Thiocyanate
SCN(C)	Thiocyanate utilisé pour source de carbone
SCN(N)	Thiocyanate utilisé pour source d'azote
SCN(CN)	Thiocyanate utilisé pour source de carbone et d'azote
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SIP	Sonde d'isotope stable "stable isotope probing"
SO <sub>2</sub>	Dioxyde de soufre
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Thiosulfate
S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Tétrathionate
t-RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux
UV	Ultraviolet
WAD	Acide faible dissociable
XGal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
YPD	Milieu dextrose, levure et patate

## Introduction

Les ressources naturelles que nous avons au Canada font partie de notre économie, mais également de notre patrimoine. Nous possédons d'importantes réserves d'or et des technologies de pointe pour permettre son extraction à partir de minerais contenant des concentrations de plus en plus faibles. Le principal procédé qui permet de récupérer cette richesse est la cyanuration. Utilisant le cyanure en solution, il permet de dissoudre l'or et de le récupérer. Cependant, ce procédé génère des effluents toxiques qui doivent être traités avant le rejet final. De plus, certains dérivés se forment, dont le  $\text{SCN}^-$  provenant de la réaction entre le soufre (de la pyrite, par exemple) et le cyanure (Akciil 2003). Le traitement biologique du cyanure est une option lorsque les concentrations sont faibles, mais à concentrations élevées, l'oxydation chimique demeure la solution la plus efficace. Un des traitements répandu est l'oxydation au dioxyde de soufre et air, catalysé par le cuivre développé par INCO®;



(Gouvernement des États-Unis 1993; Akciil 2003)

A cette étape, de l' $\text{OCN}^-$  est généré à partir de l'oxydation du cyanure; ce dérivé est moins toxique que le cyanure, mais demeure quand même un polluant du rejet minier et il doit être lui aussi traité tout comme le  $\text{SCN}^-$  (Gouvernement de l'Australie 2005; Boening et Chew 1999).

Suite à cette première étape, le traitement biologique est envisageable puisque certains microorganismes sont connus pour dégrader autant l' $\text{OCN}^-$  que le  $\text{SCN}^-$  d'après les voies de dégradation suivantes : la voie de l'oxysulfure de carbone (COS) et la voie du cyanate. La première transforme le  $\text{SCN}^-$  en COS via l'enzyme thiocyanate hydrolase selon la réaction suivante:

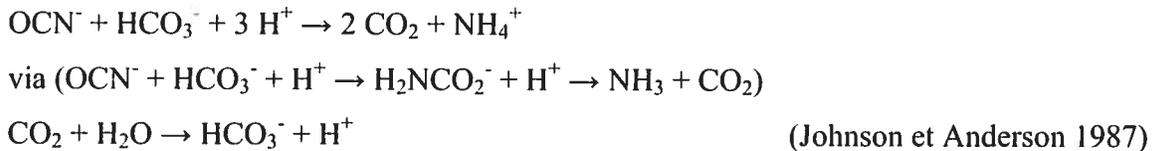


(Katayama et al. 1992)

La seconde voie de dégradation permet de transformer le  $\text{SCN}^-$  en  $\text{OCN}^-$ :



Par la suite, l' $\text{OCN}^-$  est dégradé en bicarbonate et en ammonium par les enzymes cyanase et anhydrase carbonique:



Parmi les microorganismes répertoriés pour dégrader ces molécules, plusieurs souches des genres *Pseudomonas* sp., *Thiobacillus* sp. et *Methylobacterium* sp. ont été rapportées (Wood et al. 1998). Le  $\text{SCN}^-$  est surtout consommé comme source d'azote lorsqu'il est converti en ammonium ou comme source de soufre (Wood et al. 1998). Sinon, quelques études ont rapporté qu'il est possible que le  $\text{SCN}^-$  soit consommé comme source de carbone ou comme pour une combinaison d'azote et/ou soufre et/ou carbone (Lee et al. 2003; Boucabeille et al. 1994; du Plessis et al. 2001). Pour la biodégradation de l' $\text{OCN}^-$ , la principale enzyme connue est la cyanase qui a été détectée chez plusieurs espèces, dont *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., des cyanobactéries ainsi que chez *Methylobacterium thiocyanatum* (Harano et al. 1997; Wood et al. 1998).

En somme, les objectifs de ce projet de recherche sont d'enrichir des consortiums microbiens provenant du traitement biologique de rejets miniers ayant du  $\text{SCN}^-$  et de l' $\text{OCN}^-$  pour nutriments et obtenir des isolats pouvant utiliser ces deux molécules. Concrètement, la caractérisation de ces microorganismes pourrait permettre d'adapter les paramètres physiques du traitement biologique afin de promouvoir la prolifération de ces bactéries biodégradantes et ainsi optimiser le procédé.

# 1. Revue de littérature

## 1.1 Caractéristiques et utilisation de l'or

L'industrie aurifère est un important moteur économique au niveau mondial. L'or, est utilisé depuis des siècles pour la fabrication de bijoux, pour monnaie d'échange, mais il est également retrouvé dans plusieurs autres domaines technologiques dont l'informatique, le biomédicale et le transport. Il possède plusieurs propriétés physiques très intéressantes dont sa réflectibilité, sa malléabilité, sa conductibilité et son indissolubilité dans l'eau et plusieurs acides, en plus d'être antioxydant (Agnico-Eagle 2010). En informatique et en électronique, l'or est présent dans les circuits et les connecteurs grâce à sa conductivité (Agnico-Eagle 2010). Dans l'industrie automobile, il est utilisé dans le déploiement des sacs gonflables et dans les contacts du moteur tandis qu'en aéronautique, il est un composant dans les moteurs, et pour sa résistance et sa capacité de réflexion du soleil et de la chaleur dans le domaine spatial (Agnico-Eagle 2010).

Dans le domaine des nanotechnologies, l'or réagit avec les groupes thiols et amines et peut donc servir comme marqueur dans le domaine biomédical (Mendez *et al.* 2008). Ces nanoparticules peuvent également servir de vecteur afin d'acheminer des médicaments à des tissus cancéreux ou à des organes infectés (Mendez *et al.* 2008). Au niveau environnemental, les nanoparticules d'or peuvent dépolluer l'air et l'eau en oxydant le monoxyde de carbone, réduire les gaz nitreux, décomposer les composés organiques volatiles et éliminer les dioxines (Mendez *et al.* 2008). Somme toute, l'or a une place importante dans plusieurs sphères d'activités et son exploitation continuera certainement au cours des prochaines décennies.

## 1.2 Importance économique de l'or

Le sous-sol minier canadien renferme plusieurs métaux, dont l'or. Le ministère des Ressources naturelles du Canada estime que le pays y contribue à raison de 4% de la production mondiale. Il est un producteur majeur après la Chine, l'Afrique du Sud,

l’Australie, les États-Unis, Pérou, la Russie et l’Indonésie (Gouvernement du Canada). Ceci représente plus de 8 milliards de dollars en exportation pour le Canada et contribue à près de 40 milliards de dollars au PIB (Canada 2010). Cette industrie pourra encore prospérer puisque les réserves d’or du pays sont estimées à 334 tonnes (Gouvernement du Canada 2010). Bref, avec une valeur de plus de 1500\$ l’once (juillet 2011), cette industrie est grandement rentable (Agnico-Eagle 2010).

### 1.3 Méthode d’extraction de l’or

La principale méthode afin d’extraire l’or est par cyanuration. Tout d’abord, les grosses particules de minerai sont extraites du sous-sol et concassées. Ensuite, le minerai est broyé dans un cylindre en rotation avec des boulets. Ces résidus sont par la suite lixiviés dans une solution de cyanure (NaCN) à concentration de 100 à 500 mg/L sous oxygénation et agitation, à un pH alcalin (Logsdon *et al.* 1999; Egan 2007). Cette cyanuration permet de séparer l’or, présent dans la phase liquide, des résidus de la phase solide selon l’équation suivante:



Ensuite, la précipitation de l’or peut se faire en présence de poudre de zinc métallique connue sous le nom de procédé Merrill-Crowe, ou par charbon activé (Egan 2007; Sorokin *et al.* 2010; Gouvernement du Canada 1987). Finalement, une étape d’électrolyse entre une anode et une cathode en laine d’acier est nécessaire afin de créer une oxydoréduction (Egan 2007). L’or retiré doit cependant être purifié, car tout le processus de cyanuration favorise l’extraction d’autres métaux, dont le cuivre et l’argent.

### 1.4 Cyanure

Le cyanure est produit de manière anthropique et naturelle. Plusieurs industries emploient ou génèrent du cyanure, par exemple dans la synthèse des plastiques, dans l’extraction de l’or et dans la combustion du charbon (Lottermoser 2003). En contrepartie, dans la nature, il procure une protection aux plantes et à d’autres organismes

contre la prédation (Lottermoser 2003). Les cyanures sont des agents de chélation qui peuvent réagir avec une multitude d'ions pour générer des formes variant de solubles à extrêmement difficiles à dissocier (Gouvernement de l'Australie 2005). Ils peuvent être classés en cinq différents groupes soit les cyanures libres, les composés cyanurés simples, les cyanures de faible complexité, les cyanures de moyenne complexité et les cyanures de forte complexité, tel que décrit au tableau 1.

**Tableau 1. Groupes des cyanures**

Nom commun		Classe du cyanure	Exemple
Composés cyanurés	« WAD-weak acid dissociable»	Cyanures libres	HCN, CN <sup>-</sup>
		Cyanures simples et solubles	NaCN, KCN, Ca(CN) <sub>2</sub> , AgCN
		Cyanures de complexe faible	Zn(CN) <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Cd(CN) <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Cd(CN) <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
		Cyanures de complexe moyen	Cu(CN) <sub>2</sub> <sup>2-</sup> , Cu(CN) <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Ni(CN) <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Ag(CN) <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	«SAD-strong acid dissociable»	Cyanures de forte complexité	Au(CN) <sub>2</sub> <sup>-</sup> , Co(CN) <sub>6</sub> <sup>4-</sup> , Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-</sup> , Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup>
		Thiocyanate	SCN <sup>-</sup>
		Cyanate	OCN <sup>-</sup>

Adapté de: (Lottermoser 2003)

#### 1.4.1 Toxicité du cyanure

Allant des troubles neurologiques jusqu'à la mort, les effets du cyanure sont multiples sur les organismes vivants, principalement sur la faune aquatique. L'absorption des cyanures se produit par ingestion, par inhalation ou par la voie cutanée (Potvin 2004). Le HCN gazeux est le plus toxique, car il détruit la chaîne de transport des électrons

entraînant la mort (Potvin 2004; Nelson 2006). La dose létale du cyanure ingérée chez l'humain est estimée à 3 mg/kg de masse corporelle, et entre 100 ppm à 300 ppm lorsqu'il est inhalé (Potvin 2004). Chez les invertébrés aquatiques, cette létalité se situe entre 0,03 mg/kg de masse corporelle et 0,2 mg/kg de masse corporelle (Potvin 2004; Beasley et Glass 1998). Heureusement, les composés de cyanure ne se bioaccumulent pas parce que leur destruction est rapide (Eisler et Wiemeyer 2004).

#### **1.4.2 Standards environnementaux des effluents cyanurés**

Les normes environnementales en ce qui concerne les rejets du secteur minier demeurent du cas par cas. Cependant, le Ministère du Développement Durable et des Parcs (2005) fournit des lignes directrices afin de protéger l'environnement et surtout la vie aquatique face aux rejets miniers. Ce guide mentionne qu'aucun ruisseau, rivière ou lac ne peut être utilisé pour traiter les eaux usées minières (Gouvernement du Québec 2005). L'eau du rejet final doit avoir un pH compris entre 6,0 et 9,5 (Gouvernement du Québec 2005).

#### **1.4.3 Traitements des effluents cyanurés**

Plusieurs techniques existent afin d'éliminer ces composés cyanurés, dont l'atténuation naturelle, les traitements chimiques, les traitements physiques et les traitements biologiques (Akcil 2003; Lottermoser 2003; Dash *et al.* 2009). Un résumé des principales méthodes est présenté au tableau 2.

**Tableau 2. Procédés pour le traitement du cyanure d'après sa forme.**

<b>Méthodes</b>	<b>Avantages</b>	<b>Désavantages</b>	<b>Requiert un traitement en aval</b>	<b>Peut enlever:</b>
atténuation naturelle (volatilisation, absorption et dégradation aux UV)	économique	influencée par le climat	parfois	cyanures libres et quelques WAD
biodégradation	approche naturelle, économique et aucune manipulation de produits chimiques	procédé complexe demandant des connaissances en métallurgie, en biologie et ingénierie et ne traite pas les concentrations élevées	non	cyanures libres, thiocyanate, WAD et SAD
procédé SO <sub>2</sub> /Air d'INCO	faible coût des réactifs et peut être opéré sous plusieurs pH	procédé breveté (redevance) et requiert l'ajout de sulfates	parfois	cyanures libres, thiocyanate WAD et SAD
chlorination alcaline	technologie bien connue et le cyanate généré est moins toxique que le cyanure	peut créer des rejets nocifs et est plus efficace avec le thiocyanate	oui	cyanures libres, thiocyanate et WAD

**Tableau 2. Procédés pour le traitement du cyanure d'après sa forme (suite).**

<b>Méthodes</b>	<b>Avantages</b>	<b>Désavantages</b>	<b>Requiert un traitement en aval</b>	<b>Peut enlever:</b>
peroxydation	les produits finaux sont l'eau et l'oxygène, le procédé est simple à opérer	le coût des réactifs est élevé et le dosage des produits chimiques doit être précis	oui	cyanures libres, WAD et quelques SAD
ozonation	peut régénérer les cyanures	produit de l'ammonium et coût élevé des réactifs et de l'équipement	oui	cyanures libres, thiocyanate et WAD
hydrolyse/ distillation	méthodologie simple	requiert une température élevée et une pression élevée en plus de produire du cyanure d'hydrogène	oui	cyanures libres
acidification, volatilisation et re-neutralisation	demande peu d'énergie	consommation élevée en acide et peu de flexibilité sur le design des installations	oui	cyanures libres thiocyanate, WAD et quelques SAD

**Tableau 2. Procédés pour le traitement du cyanure d'après sa forme (suite).**

<b>Méthodes</b>	<b>Avantages</b>	<b>Désavantages</b>	<b>Requiert un traitement en aval</b>	<b>Peut enlever:</b>
flottation	précipitation naturelle des SAD	les précipités peuvent se décomposer ou se dissoudre à nouveau	oui	cyanures libres, WAD et SAD
photolyse	procédé efficace	énergivore, dispendieux et difficile à opérer	oui	cyanures libres, thiocyanate, WAD et SAD
précipitation (au cyanure ferré insoluble)	procédé courant dans l'industrie minière	ne fonctionne qu'à faibles concentrations, le pH est difficile à maintenir et le retrait du cyanure demeure difficile	oui	cyanures libres, thiocyanate, WAD et SAD
carbone activé	procédé efficace et bien connu	dispendieux, ne fonctionne qu'à faibles concentrations et dans certains cas, un prétraitement est requis	oui	thiocyanate WAD et SAD

**Tableau 2. Procédés pour le traitement du cyanure d'après sa forme (suite).**

Méthodes	Avantages	Désavantages	Requiert un traitement en aval	Peut enlever:
l'acide de Caro (H <sub>2</sub> SO <sub>5</sub> )	procédé efficace	son application est limitée et les manipulations sont difficiles (présence d'acide sulfurique)	oui	cyanures libres thiocyanate, WAD et quelques SAD

Adapté de:(Dash *et al.* 2009; Lottermoser 2003)

#### 1.4.4 Biodégradation des cyanures

Les cyanures, plus spécifiquement les cyanures libres, peuvent être dégradés par les microorganismes lorsqu'ils sont présents à faibles concentrations. Les deux souches de *Pseudomonas putida* utilisées par Babu *et al.* (1996) et Chapatwala *et al.* (1998) peuvent utiliser les cyanures comme source de carbone et d'azote (Babu *et al.* 1996; Chapatwala *et al.* 1998). Les enzymes impliquées dans cette dégradation sont la cyanide hydratase, la rhodanèse, et des oxygénases (Babu *et al.* 1996). La souche de *Pseudomonas fluorescens* rapportée par Dash (2009) utilise le cyanure pour source d'azote après que la cyanide monooxygénase l'eut oxydé en  $\text{OCN}^-$ . En ce qui a trait aux consortiums, des souches de *P. stutzeri*, *P. putida* et *P. fluorescens* peuvent utiliser le cyanure pour source d'azote en condition aérobie et à pH faiblement alcalin (Grigor'eva *et al.* 2008). Finalement, lors de l'installation du traitement biologique de l'effluent de la mine Homestake (Dakota du Sud), Whitlock (1992) a sélectionné un isolat de *Pseudomonas* (maintenant *Sphingomonas*) *paucimobilis* par adaptation aux cyanures et au  $\text{SCN}^-$  en milieu alcalin qui peut dégrader les cyanures.

Pour ce qui est des autres espèces microbiennes pouvant dégrader les cyanures, *Burkholderia cepacia* utilise le cyanure pour sa source d'azote de même que *Klebsiella oxytoca* (Adjei et Ohta 1999; Chen *et al.* 2008). D'autres microorganismes ont été rapportés pouvant dégrader les cyanures sans spécifier son utilisation : *Achromobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Norcardia* sp., *Bdellovibrio* sp., *Mycobacterium* sp., *Actinomyces* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Neisseria* sp., *Paracoccus* sp., *Thiobacillus* sp., *Alcaligenes* sp. et *Acinetobacter* sp (Akcil 2003; Given *et al.* 1998; Mudder *et al.* 1998; Granato *et al.* 1996; Ingvorsen *et al.* 1991).

Des souches de mycètes peuvent également dégrader les cyanures. Parmi ceux-ci, le champignon *Fusarium solani* ainsi que le consortium composé de *F. solani*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma polysporum*, *Scytalidium thermophilum* et *Penicillium miczynski* peuvent dégrader les cyanures à pH faiblement acide (Dash *et al.* 2009). La levure *Cryptococcus humicolus* peut également le faire (Park *et al.* 2008).

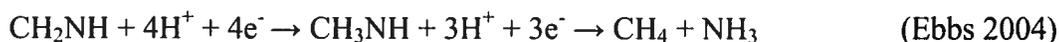
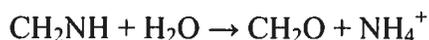
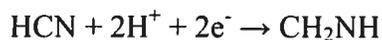
Finalement, chez les plantes, l'hyacinthe d'eau (*Eichorinia crassipes*) peut être un moyen pour retirer le cyanure des eaux puisqu'elle peut accumuler jusqu'à 6700 mg par kg de poids (Eisler et Wiemeyer 2004). Cependant, la plante doit être jetée pour se débarrasser du cyanure accumulé.

#### 1.4.5 Réactions enzymatiques impliquées dans la dégradation du cyanure

Autant au niveau chimique que biologique, le cyanure peut se transformer de multiples manières. Pour sa biodégradation, il est converti en carbonate et en ammonium (Akciil 2003). S'il est hydrolysé, ce sont les enzymes cyanide hydratase et cyanidase qui en effectuent la conversion :



La cyanide hydratase produit du formamide alors que la cyanidase produit du formate (Ebbs 2004). Il peut également y avoir réduction du cyanure résultant en formaldéhyde, en méthane et en ammonium :



Cependant, la réaction la plus courante demeure l'oxydation. Les enzymes impliquées sont la cyanide monooxygenase et la cyanide dioxygenase.

Cyanide monooxygenase:



Cyanide dioxygenase:



En dernier lieu, le cyanure peut être transformé en  $\text{SCN}^-$  lorsqu'il y a présence de thiosulfate. L'enzyme catalysant la réaction est la rhodanese.



## 1.5 Thiocyanate et cyanate

### 1.5.1 Caractéristiques physico-chimiques du thiocyanate et du cyanate

Le  $\text{SCN}^-$  et l' $\text{OCN}^-$  sont des dérivés du cyanure à toxicité réduite, mais ne font pas partis de cette grande famille de composés cyanurés. Les deux molécules sont solubles, électronégatives et pseudohalides, c'est-à-dire qu'elles inhibent le transport des halides jusqu'au système endocrinien chez certains organismes (Dizge *et al.* 2009; Boening et Chew 1999). Dans l'industrie minière, la formation du  $\text{SCN}^-$  se produit lorsque le soufre, présent dans le minerai, réagit avec le cyanure, lors de la cyanuration (Dizge *et al.* 2009). Il peut également se former lorsque le cyanure réagit avec le dioxyde de soufre, par exemple avec le procédé d'INCO au dioxyde de soufre (Boening et Chew 1999). En ce qui concerne l' $\text{OCN}^-$ , il est formé par l'oxydation du cyanure de manière chimique ou biologique. Il est considéré près de mille fois moins toxique que le cyanure pour une même concentration et demeure stable jusqu'à dix jours en surface aqueuse, mais à la longue, il a tendance à s'hydrolyser naturellement (Gouvernement de l'Australie 2005; Boening et Chew 1999). Dans le cas présent de l'effluent minier, le recyclage de l'eau des procédés par la recirculation concentre l' $\text{OCN}^-$  et le  $\text{SCN}^-$ . Les recommandations environnementales au niveau du gouvernement provincial se limitent au suivi annuel, mais selon leur certificat d'autorisation, le rejet final doit être exempt d' $\text{OCN}^-$ , de  $\text{SCN}^-$ , de  $\text{NH}_4^+$  et de  $\text{NO}_2^-$  et respecter les normes de toxicités envers les truites et les daphnés. (Gouvernement du Québec 2009).

### 1.5.2 Toxicité du thiocyanate et du cyanate

L'OCN<sup>-</sup> et le SCN<sup>-</sup> peuvent engendrer plusieurs effets néfastes sur les organismes vivants autant en toxicité aigüe qu'en toxicité chronique. Sur le système endocrinien, le SCN<sup>-</sup> inhibe le transport des halides particulièrement vers la glande thyroïde et l'estomac (Boening et Chew 1999). Sur le système neurologique, il peut provoquer des hallucinations, du délire et des convulsions découlant de l'altération des enzymes impliqués dans la respiration des cellules donc en les privant d'oxygène (Boening et Chew 1999; Kjeldsen 1999). Spécifiquement chez les poissons, le SCN<sup>-</sup> s'accumule et à un certain seuil, il entre en compétition avec le chlore dans la balance osmotique des cellules (Boening et Chew 1999). Cependant, à faible concentration, les répercussions se trouvent au niveau de la chaîne de respiration (Boening et Chew 1999). De plus, chez ces animaux aquatiques, le SCN<sup>-</sup> est responsable du syndrome de mort subite, de la difformité des embryons et du cartilage et de la réduction de la taille (Heming *et al.* 1985; Kevan et Dixon 1991; Lanno et Dixon 1996). Pour l'OCN<sup>-</sup>, les principaux organes affectés sont les reins, le foie et les globules rouges (Boening et Chew 1999). L'OCN<sup>-</sup> peut également endommager le système de synthèse des protéines de même que la production d'énergie en ciblant entre autres les enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase et l'ATPase (Boening et Chew 1999). De manière générale, l'OCN<sup>-</sup> est moins stable et donc moins persistant que le SCN<sup>-</sup> dans l'environnement. Bref, il est primordial de traiter les rejets miniers ou autres contenant de l'OCN<sup>-</sup> et du SCN<sup>-</sup> car ils sont nocifs pour les êtres vivants.

### 1.5.3 Dégradation du thiocyanate et du cyanate

Autre que le traitement biologique, plusieurs traitements existent et sont toujours utilisés dans la majorité des mines pour la destruction de l'OCN<sup>-</sup> et du SCN<sup>-</sup>. Parmi ceux-ci, l'atténuation naturelle demeure une des pratiques les plus courantes (Oudjehani *et al.* 2002; Lottermoser 2003; Akcil et Mudder 2003).

Les traitements chimiques du SCN<sup>-</sup> produisent plusieurs sous-produits dont le sulfate, le carbonate, l'OCN<sup>-</sup> et l'ammonium. Par exemple, l'oxydation au peroxyde est

assez forte pour détruire le  $\text{SCN}^-$  en produisant du cyanure d'hydrogène et du sulfate (Vicente et Diaz 2003). L'ozonation, quant à elle, peut retirer jusqu'à 99% d'une dose de  $\text{SCN}^-$  en le transformant en sulfate, en  $\text{OCN}^-$  et en bicarbonate, mais les coûts demeurent élevés pour cette technologie (Chang *et al.* 2008). L'oxydation à l'hypochlorite de calcium est très performante pour le traitement du  $\text{SCN}^-$ , mais dispendieuse et peu écologique puisqu'elle doit s'opérer à pH acide (Dash *et al.* 2009). Plusieurs autres techniques sont répertoriées dans la littérature dont l'absorption au carbone activé, la chloration alcaline, la séparation par membranes de résine et l'électro-oxxydation acide (Dizge *et al.* 2009; Kenova *et al.* 2010). En somme, les procédés de destruction du  $\text{SCN}^-$  sont relativement les mêmes que ceux utilisés pour le cyanure (voir section 1.4.3).

Les principales sources industrielles de l' $\text{OCN}^-$  proviennent de l'oxydation du cyanure ou de la transformation du  $\text{SCN}^-$ . Ainsi, il produit du nitrate, dioxyde de carbone, du carbonate et/ou de l'ammonium (Gouvernement de l'Australie 2005). Chimiquement, tout procédé d'oxydation peut détruire l' $\text{OCN}^-$ .

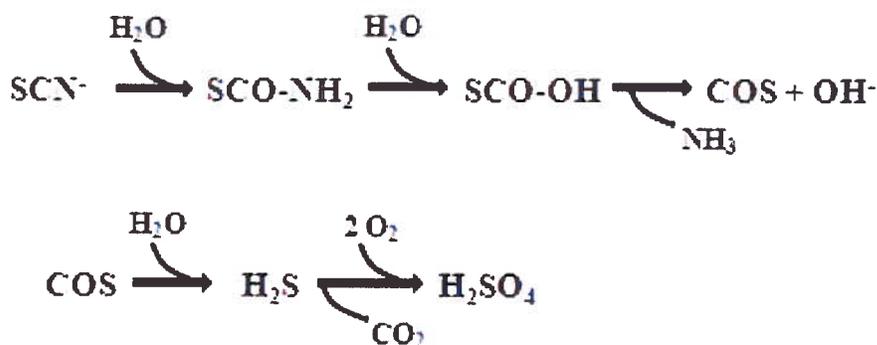
#### **1.5.4 Biodégradation du thiocyanate et cyanate**

##### **1.5.4.1 Voie de l'oxysulfure de carbone**

Beijerinck fut le premier à isoler un thiobacille capable de dégrader du  $\text{SCN}^-$  par (Beijerinck 1904). Cette molécule peut être transformée de deux façons, soit par la voie de l'oxysulfure de carbone, soit par la voie du cyanate.

La voie de l'oxysulfure de carbone se fait en deux étapes lorsqu'elle est en condition aérobie (Kim et Katayama 2000). Tout d'abord, le  $\text{SCN}^-$  est hydrolysé par l'enzyme thiocyanate hydrolase pour produire de l'oxysulfure de carbone et de l'ammonium (Bezsudnova *et al.* 2007; Katayama *et al.* 1992; Kim et Katayama 2000). Cette dernière enzyme, qui est inductible, est constituée de trois sous-unités et coupe le lien nitrile du  $\text{SCN}^-$  (Bezsudnova *et al.* 2007; Katayama *et al.* 1992). L'ammonium devient alors une source d'azote pour les microorganismes ou il est nitrifié (Lee *et al.* 2008). Quant à l'oxysulfure de carbone, il est hydrolysé en sulfure d'hydrogène, qui sera

ensuite oxydé en sulfate et en dioxyde de carbone ou carbonate, dépendamment du pH (Bezsudnova *et al.* 2007). Le sulfure d'hydrogène peut servir dans certains cas comme donneur d'électrons (Bezsudnova *et al.* 2007; Katayama *et al.* 1992). On retrouve cette voie de dégradation, entre autre, chez *Thiobacillus thioparus* tel que présentée à la figure 1 (Bezsudnova *et al.* 2007; Katayama *et al.* 1992).



**Figure 1. Dégradation du thiocyanate par la voie de l'oxysulfure de carbone**  
Adapté de:(Bezsudnova *et al.* 2007; Katayama *et al.* 1992)

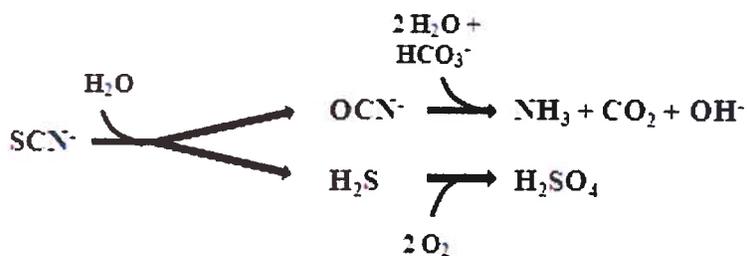
#### 1.5.4.2 Voie du cyanate

Le  $\text{SCN}^-$  peut également être dégradé via la formation de l' $\text{OCN}^-$  pour ensuite former du dioxyde de carbone et de l'ammonium tel que présenté à la figure 2 (Youatt 1954; Luque-Almagro *et al.* 2008). La cyanase est l'enzyme responsable de la dégradation de l' $\text{OCN}^-$ . Elle est composée de sous-unités identiques et la décomposition en ammonium et bicarbonate se fait par l'intermédiaire du carbamate (Anderson 1980). Plusieurs études ont porté sur cette enzyme inductible chez *E. coli* et *Pseudomonas* sp. (Anderson 1980; Anderson *et al.* 1990; Guilloton et Karst 1987; Kunz et Nagappan 1989; Sung et Fuchs 1988). Située sur l'opéron *cyn* chez *E. coli*, le gène de la cyanase (*cynS*) est voisin des gènes pour la cyanate permease (*cynT*) et une protéine hypothétique hydrophobe qui pourrait être reliée à la permease (*cynX*) (Anderson *et al.* 1990). Le tout est contrôlé par le régulateur de type LysR, CynR, qui lui est activé en présence de l' $\text{OCN}^-$  et réprimé en présence d'ammonium (Anderson *et al.* 1990; Luque-Almagro *et al.* 2008). La présence de la cyanase a été confirmée chez 60% des souches d'*E. coli*,

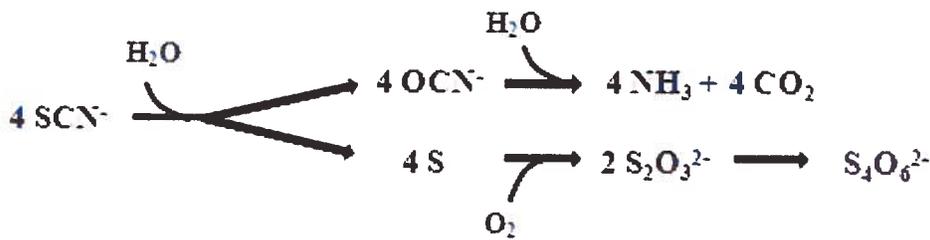
92% des souches de *P. aeruginosa* et 100% des souches de *S. marcescens* (Kunz et Nagappan 1989). Selon Luque-Almagro (2008), les hétérotrophes capables d'assimiler l' $\text{OCN}^-$  possèdent l'enzyme cyanase. L'étude de cette voie a été faite sur l'isolat de Bezsudnova (2007) de *T. thiocanoxidans* (*T. thioparus*). Les conditions environnementales reliées à l'une ou l'autre des voies ne sont pas connues. Par contre, la présence des gènes respectifs, la concentration du  $\text{SCN}^-$  et l'effet inhibitoire de leurs produits peuvent expliquer la voie (Chaudhari et Kodam 2010).

Chez les cyanobactéries, ces enzymes sont codées par l'opéron *cynABDS* à l'exception qu'un transporteur de type ABC, qui lui semble faire partie de l'opéron pour l'absorption de l' $\text{OCN}^-$  (Espie *et al.* 2007; Garcia-Fernandez *et al.* 2004; Harano *et al.* 1997). Par contre, la régulation de ce transporteur se fait négativement en présence d'ammonium sinon, son expression est constitutive (Harano *et al.* 1997).

En parallèle à ces opérons, l'anhydrase carbonique est formée afin de prévenir le manque de carbonate qui est essentiel au fonctionnement de la cyanase (Carepo *et al.* 2004). Cette enzyme transforme le dioxyde de carbone en carbonate (Johnson et Anderson 1987). Une troisième voie de dégradation a été avancée par l'intermédiaire de la formation de l' $\text{OCN}^-$  et comme produit final du tetrathionate (Fig. 3) (Stratford *et al.* 1994).

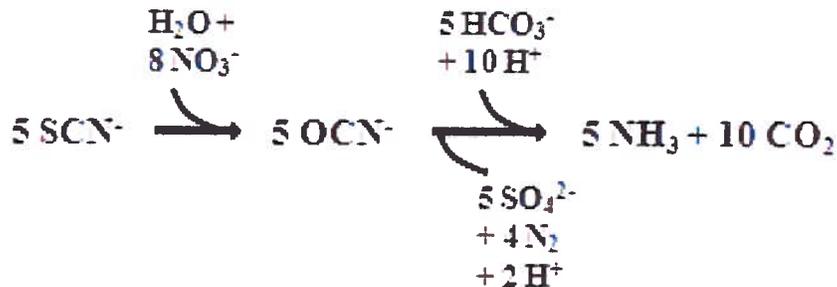


**Figure 2. Dégradation du thiocyanate par la voie du cyanate**  
Adapté de:(Hung et Pavlostathis 1997)



**Figure 3. Dégradation du thiocyanate produisant du tetrathionate**  
 Adapté de: (Stratford *et al.* 1994)

Il est possible que le  $\text{SCN}^-$  soit dégradé en condition aérobie ou anaérobie tel que présenté ci-haut. En condition aérobie, l'oxygène est accepteur d'électrons tandis que le sulfate agit en tant que donneur d'électrons (Katayama *et al.* 1995; Sorokin *et al.* 2004). En condition anaérobie, le nitrate doit être présent puisqu'il devient l'accepteur d'électrons (Fig. 4) (Katayama *et al.* 1995; Sorokin *et al.* 2004).



**Figure 4. Dégradation du thiocyanate en condition anaérobie**  
 Adapté de: (Sorokin *et al.* 2004)

#### 1.5.4.3 Microorganismes connus pour consommer et dégrader le thiocyanate

Plusieurs microorganismes sont connus pour leur capacité à utiliser et dégrader le  $\text{SCN}^-$ . Un résumé de ces isolats est présenté au tableau 3. Ces isolats proviennent des genres *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *E. coli*, *Nocardia* sp., *Acinetobacter junii* et *Halomonas* sp., une espèce halophile (Stott *et al.* 2001; Banerjee 1996; Ahn *et al.* 2004; Stafford et Calley 1969; Lee *et al.* 2008; Lee *et al.* 2003; Mason *et al.* 1994). Certains isolats sont alcaliphiles comme *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* (Sorokin

*et al.* 2004; Stafford et Calley 1969). D'autres sont anaérobies : *Thiohalophilus thiocyanoxidans* et *Arthrobacter* sp. (Bezudnova *et al.* 2007; Betts *et al.* 1979). La souche *Methylobacterium thiocyanatum* de Woods (1998) est intéressante du point de vue métabolique puisqu'elle peut dégrader autant le  $\text{SCN}^-$  que l' $\text{OCN}^-$ . Par contre, le groupe comprenant le plus grand nombre d'isolats pour la dégradation du  $\text{SCN}^-$  sont les chimiolithoautotrophes oxydateurs du soufre. Ce groupe comprend *Thiobacillus thioparus*, précédemment nommé *T. thiocyanoxidans*, *Thiohalobacter thiocyanatus* et *Paracoccus thiocyanatus*, qui fut la première bactérie isolée pouvant utiliser le  $\text{SCN}^-$  pour source d'énergie (Beller *et al.* 2006; Happold *et al.* 1954; Happold *et al.* 1958; Sorokin *et al.* 2010; Katayama *et al.* 1995; Lee *et al.* 2003). Une souche de *Pseudomonas (Spingomonas) paucimobilis* provenant de la mine d'or d'Homestake (Dakota du Sud) fait également partie des bactéries connues pour la dégradation du  $\text{SCN}^-$  (Mudder et Whitlock 1984).

En coculture, deux souches d'*Acinetobacter johnsonii* et *Pseudomonas diminuta* utilisent le  $\text{SCN}^-$  pour source de carbone et d'azote en ammonium et en sulfate (Boucabeille *et al.* 1994). La dégradation du  $\text{SCN}^-$  en coculture a été observée aussi chez des isolats de *Klebsiella pneumoniae* avec *Ralstonia* sp. en condition aérobie (Chaudhari et Kodam 2010). Également, un consortium comprenant *Ralstonia eutropha*, *Bosea thiooxidans* et *Spingomonas paucimobilis* a démontré un potentiel à dégrader le  $\text{SCN}^-$  (du Plessis *et al.* 2001). Le champignon *Acremonium strictum*, quant à lui, dégrade la plus grande quantité de  $\text{SCN}^-$  et de manière très efficace, soit 7400 ppm en 85h (Kwon *et al.* 2002).

#### **1.5.4.4 Microorganismes connus pour consommer et dégrader le cyanate**

La dégradation de l' $\text{OCN}^-$  a été caractérisée pour la première fois chez une souche d'*E. coli* et il était utilisé comme source d'azote (Anderson *et al.* 1990). La dégradation de l' $\text{OCN}^-$  est aussi présente chez un isolat de *Flavobacterium* sp. (Guillot et Karst 1987). Puis, avec l'arrivée de l'étude des génomes, la bactérie *Chromobacterium violaceum* a été identifiée comme étant capable de dégrader l' $\text{OCN}^-$  pour source d'azote

(Carepo *et al.* 2004). Chez certains isolats de *Pseudomonas fluorescens* et de *P. pseudoalcaligenes*, l'OCN<sup>-</sup> est également utilisé que pour source d'azote (Kunz et Nagappan 1989; Luque-Almagro *et al.* 2008). Tel que mentionné précédemment, *Methylobacterium thiocyanatum* isolée par Woods (1998) peut dégrader autant le SCN<sup>-</sup> que l'OCN<sup>-</sup>, mais l'OCN<sup>-</sup> est utilisé pour source d'azote seulement. De plus, l'enzyme cyanase a été détectée chez certaines souches de *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Streptococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* (Guilloton et Karst 1987). La présence de la cyanase a également été observée chez les plantes (Boening et Chew 1999).

Certaines cyanobactéries peuvent également dégrader l'OCN<sup>-</sup> pour source de carbone et d'azote car elles fixent le dioxyde de carbone obtenues à partir de la molécule (Espie *et al.* 2007). Ces isolats proviennent des espèces *Synechococcus sp.* incluant *Synechococcus elongates*, *Synechocystis sp.* et *Prochlorococcus sp.* (Espie *et al.* 2007; Garcia-Fernandez *et al.* 2004; Harano *et al.* 1997).

En lien avec le projet, on peut en déduire le SCN<sup>-</sup> pourra être dégradé par l'une ou l'autre des voies, voire même les deux si la microflore est diversifiée. Il se pourrait même qu'une partie de l'OCN<sup>-</sup> ne proviendrait pas du rejet mais de la biodégradation du SCN<sup>-</sup>. Par contre, il est difficile de prédire si ce sera un de ces microorganismes connus que nous retrouverons dans nos résultats, mais les thiobacilles semblent être un groupe de bactéries important dans la biodégradation de ces molécules. Il est également possible que la biodégradation se fasse par mutualisme. Par contre, en ce qui à trait à l'OCN<sup>-</sup>, il y a très peu d'information sur sa biodégradation, ce qui porte à croire que sa stabilité et sa tendance à s'hydrolyser naturellement ont peu attiré les chercheurs sur sa biodégradation.

**Tableau 3. Caractéristiques des microorganismes pouvant utiliser le thiocyanate.**

Organisme(s)	Lieu isolé	Concentration du thiocyanate <sup>1</sup>	Utilisation	Voie de dégradation utilisée <sup>2</sup>	Caractéristiques	Références
<i>Klebsiella</i> sp.	mine d'or	250 ppm	N/A	cyanate	autotrophe, mésophile et aérobie	(Ahn <i>et al.</i> 2004)
<i>Thiobacillus thiooparus</i>	boues activées d'une cokerie	500 ppm	énergie	oxysulfure de carbone	chimioolithotrophe, autotrophe et oxydatrice du soufre	(Katayama et Kuraishi 1978; Katayama <i>et al.</i> 1992)
<i>Thiohalophilus thiocyanoxidans</i>	sédiments d'un lac hypersalin	50 mM	énergie	oxysulfure de carbone	halophile, oxydatrice du soufre, chimioolithotrophe, autotrophe et anaérobie facultative	(Bezsudnova <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	N/A	3 mM	Azote, soufre	N/A	anaérobie et mésophile	(Stafford et Calley 1969)

Tableau 3. Caractéristiques des microorganismes pouvant utiliser le thiocyanate (suite).

Organisme(s)	Lieu isolé	Concentration du thiocyanate <sup>1</sup>	Utilisation	Voie de dégradation utilisée <sup>2</sup>	Caractéristiques	Références
<i>Thiohalobacter thiocyanatus</i>	sédiments de lacs hypersalins	10 mM	énergie	cyanate	halophile, chimiolithotrophe, autotrophe et oxydatrice du soufre aérobie	(Sorokin <i>et al.</i> 2010)
<i>Thioalkalivibrio thiocyanodinitrificans</i>	sédiments d'un lac alcalin	19mM	énergie azote	cyanate	halophile, chimiolithotrophe, autotrophe, oxydatrice du soufre, alkaliphile et anaérobie facultative	(Sorokin <i>et al.</i> 2004)
<i>Paracoccus thiocyanatus</i>	boues activées	N/A	énergie	N/A	chimiolithotrophe, autotrophe, mésophile et neutrophile	(Katayama <i>et al.</i> 1995)
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	sol d'une mine d'or	210 ppm	carbone azote	N/A	chimiolithotrophe, autotrophe	(Lee <i>et al.</i> 2003)

Tableau 3. Caractéristiques des microorganismes pouvant utiliser le thiocyanate (suite).

Organisme(s)	Lieu isolé	Concentration du thiocyanate <sup>1</sup>	Utilisation	Voie de dégradation utilisée <sup>2</sup>	Caractéristiques	Références
<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>	Ssl, sur les racines d' <i>A. aflatunense</i>	50 mM	azote soufre	oxysulfure de carbone	chimioorganotrophe, méthylootrophe facultative, mésophile et neutrophile	(Wood <i>et al.</i> 1998)
<i>Arthrobacter</i> sp.	sol	100 mM	azote soufre	N/A	mésophile	(Betts <i>et al.</i> 1979)
<i>Pseudomonas (Sphingomonas) paucimobilis</i> (Mudlock)	mine d'or Homestake au Dakota du Sud	100 ppm	azote	N/A	aérobe et lithotrophe	(Mudder et Whitlock 1984)
<i>Acremonium strictum</i> (mycète)	eaux usées d'une cokerie	7400 ppm	N/A	oxysulfure de carbone	N/A	(Kwon <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	N/A	3 mM	soufre azote	cyanate	hétérotrophe	(Mason <i>et al.</i> 1994)

Tableau 3. Caractéristiques des microorganismes pouvant utiliser le thiocyanate (suite).

Organisme(s)	Lieu isolé	Concentration du thiocyanate <sup>1</sup>	Utilisation	Voie de dégradation utilisée <sup>2</sup>	Caractéristiques	Références
<i>Acinetobacter junii</i>	N/A	3 mM	soufre azote	oxysulfure de carbone	hétérotrophe	(Mason <i>et al.</i> 1994)
<i>Acinetobacter johnsonii</i> et <i>Pseudomonas diminuta</i>	eaux usées municipales	1420 ppm	carbone azote	production de thiosulfate	autotrophe	(Boucabeille <i>et al.</i> 1994)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Ralstonia</i> sp.	sol d'une industrie d'électro-placage de cyanure de zinc	2500 ppm	azote	oxysulfure de carbone	aérobies, mésophiles et neutrophiles	(Chaudhari et Kodam 2010)
<i>Ralstonia eutropha</i> , <i>Bosea thiooxidans</i> et <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	boues activées	550 ppm	carbone azote	N/A	autotrophes et aérobies	(du Plessis <i>et al.</i> 2001)

1. Les concentrations du thiocyanate testées ne représentent pas nécessairement les concentrations maximales mais plutôt les concentrations dans l'environnement où elles ont été trouvées ; 2. N/A : information non disponible.

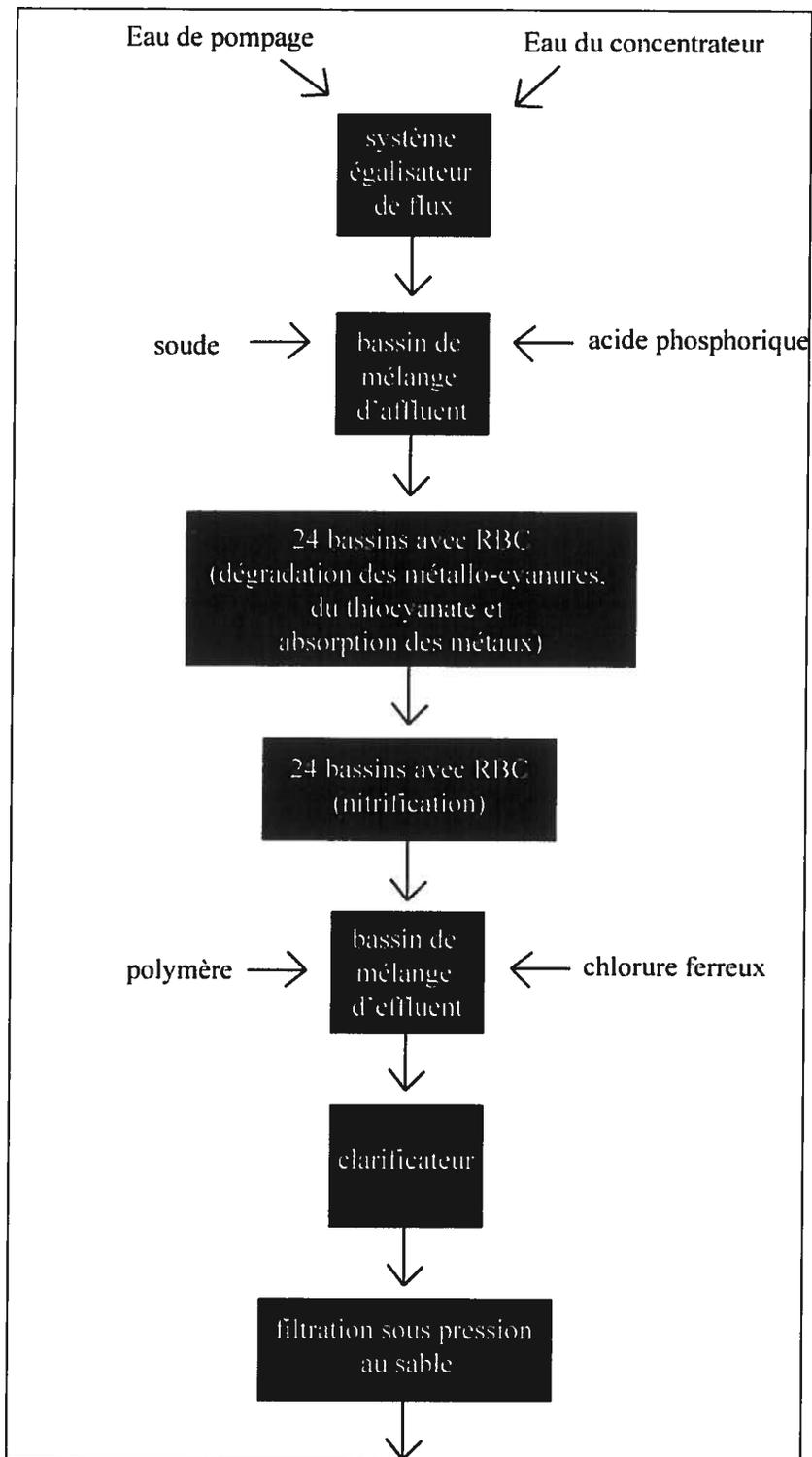
## 1.6 Mine Homestake, Dakota du Sud

L'étude présentée dans ce mémoire porte sur la mine Laronde d'Agnico-Eagle, située à Cadillac en Abitibi, mais le design du traitement biologique est inspiré de la mine Homestake à Lead, au Dakota du Sud, qui est maintenant fermée. Il est donc de mise de présenter l'historique de ce qui a mené au développement du procédé biologique de traitement de l'effluent cyanuré. Initialement, comme à plusieurs autres endroits, une approche chimique, soit au peroxyde, était utilisée afin de retirer le cyanure des eaux. Cependant, ce traitement était inefficace pour retirer le  $\text{SCN}^-$  présent dans l'effluent (Kitis *et al.* 2005). Le projet de traitement biologique est entré en opération en août 1984 (Fig. 5) (Whitlock et Mudder 2001). Ce traitement biologique, opéré en aérobie et en continu, pouvait traiter jusqu'à 21 000  $\text{m}^3/\text{jour}$  d'effluents miniers et fut le premier bioprocédé sur un rejet minier à l'échelle commerciale (Whitlock et Mudder 2001; Akcil 2003; Akcil et Mudder 2003). La conception consistait en 24 RBC (les 24 premiers bassins) tournant à contre-courant dans les bassins (Whitlock 1990). Sur ces RBC s'était installée une microflore indigène (Akcil 2003). Les cyanures étaient certes présents à l'arrivée ( $< 12$  ppm), mais également le  $\text{SCN}^-$  (entre 35 et 110 ppm), l'ammonium (6 à 12 ppm), le nickel, le cuivre ( $< 3$  ppm), le plomb et le zinc (Whitlock et Mudder 2001; Whitlock 1990). Les composés cyanurés, le  $\text{SCN}^-$  et l'ammonium étaient oxydés par ce bioprocédé, tandis que le nickel, le cuivre, le plomb et le zinc étaient absorbés dans le biofilm avant d'être précipités (Whitlock et Mudder 2001). Puisqu'il y avait présence de  $\text{SCN}^-$  résiduel, mais également formation d'ammonium et de nitrate, un second traitement biologique (les 24 derniers bassins) en aval fut ajouté en aérobie et anaérobie, afin d'oxyder davantage le  $\text{SCN}^-$ , d'effectuer la nitrification et la dénitrification (Akcil et Mudder 2003).

Les cyanures libres étaient oxydés en  $\text{OCN}^-$ , puis transformés en ammonium, en carbonate et en eau (Potvin 2004). Le  $\text{SCN}^-$ , quant à lui, était dégradé en sulfate, carbonate et en ammonium et dans ce cas-ci, l'ammonium était ensuite nitrifié (Potvin 2004). Plus de 90% des molécules toxiques initiales étaient retirées des eaux avec le traitement biologique (Whitlock 1990). De plus, un des avantages de ce bioprocédé était que les microorganismes avaient une certaine résistance aux changements de conditions

tels que la température, le pH et aux nutriments (Whitlock 1990). Le rejet final allait directement à un plan d'eau où se trouvaient des truites (Akcil 2003). Bref, le rejet était sécuritaire pour la vie aquatique.

La conception d'un bioprocédé de type Homestake comporte plusieurs étapes (Fig. 5). L'eau de pompage et du concentrateur doit tout d'abord être mélangée afin de produire un débit normalisé pour les étapes subséquentes (Mudder *et al.* 2001). Le pH doit être ajusté pour devenir légèrement basique avec de l'acide phosphorique ou de la soude (Potvin 2004). Ensuite, par gravité, l'effluent doit être dirigé vers la première série des RBC où l'oxydation des cyanures et du  $\text{SCN}^-$  a lieu (Potvin 2004). De plus, les métaux sont absorbés par la biomasse (Potvin 2004). Dans les bassins RBC subséquents, la nitrification a lieu et à la sortie, un coagulant tel que le chlorure ferreux doit être ajouté en parallèle à un polymère afin de précipiter et coaguler la matière en suspension (Potvin 2004). Le tout doit ensuite être clarifié et filtré. Au rejet, l'effluent doit être aérée dans une cascade naturelle avant d'atteindre le plan d'eau récepteur (Potvin 2004). L'utilisation de traitement biologique dans le secteur minier demeure toutefois très rare, mais innovateur.



**Figure 5. Procédé du traitement biologique de la mine Homestake, Dakota du Sud.**

Adapté de : (Mudder *et al.* 2001)

## 1.7 Mine Laronde, Agnico-Eagle

Située à Cadillac dans le district de Rouyn-Noranda, la mine Laronde d'Agnico-Eagle permet l'extraction de l'or, mais également de l'argent, du cuivre et du zinc. L'exploitation des lieux a commencé en 1937 avec la compagnie Chibougamau Mines Ltd (Gosselin 2005). Après plusieurs partenariats et reventes, Agnico-Eagle rejoint les rangs en 1974 sous la filière Mentor Exploration et Development Company Ltd (Gosselin 2005). L'exploitation telle qu'elle a lieu aujourd'hui a commencée au début des années 1980 (Gosselin 2005). Actuellement, la capacité de la mine est de plus de 6300 tonnes/jour et l'exploitation a atteint 3,3 km de profondeur (Gosselin 2005). En 2005, une évaluation a permis d'estimer la présence de 3258 millions d'onces d'or dans les sous-sols de la mine (Gosselin 2005).

Le traitement minier de l'usine Laronde d'Agnico-Eagle est présenté à la figure 6. Après le broyage du minerai (grinding & gravity recovering), il y a flottation du cuivre (copper flotation) (Agnico-Eagle 2010). Puis, il y a la concentration du minerai restant (concentrate handling) suivi de la flottation du zinc (zinc flotation) (Agnico-Eagle 2010). Ensuite, la cyanuration se fait dans une série de douze bassins et en parallèle où l'or est récupéré (cyanidation) et le cyanure est détruit (cyanide destruction & paste backfill) (Agnico-Eagle 2010). Le concentré de cuivre contient jusqu'à 75% d'or et dans la flottation du zinc, on en retrouve 5% (Gosselin 2005). Pour le 20% d'or restant, c'est le procédé de Merrill Crowe qui va permettre de le récupérer (Merrill Crowe refinery) (Gosselin 2005).

Le traitement de l'effluent minier quant à lui est présenté à la figure 7. Tous les résidus d'extraction sont déposés dans un bassin appelé parc à résidus d'une superficie de 1 km<sup>2</sup> (Gosselin 2005). La prise d'eau pour toutes ces étapes se fait au lac Preissac soit à environ 4 km du site (Gosselin 2005). Une majorité de l'eau cyanurée est recirculée, mais un certain pourcentage doit être rejeté pour éviter de nuire au procédé de solubilisation de l'or (communication personnelle, Agnico-Eagle). Au niveau du traitement des eaux cyanurées, jusqu'en 2003, le procédé de dioxyde de soufre et d'air d'INCO était utilisé suivi du procédé au peroxyde (Gosselin 2005). De la chaux était ajoutée avant le rejet

final (Gosselin 2005). Ce n'est qu'en 2004 qu'un bioprocédé a été ajouté en aval afin de respecter la nouvelle réglementation sur la toxicité (Gosselin 2005). A cette époque, le  $\text{SCN}^-$  s'accumulait et a engendré des avertissements au niveau de la toxicité excessive (Agnico-Eagle 2010). Les traitements chimiques n'étaient pas une option puisqu'à l'exception de la chloration alcaline, ces traitements sont moins efficaces ou totalement incapables de dégrader le  $\text{SCN}^-$  (Whitlock *et al.* 2003).

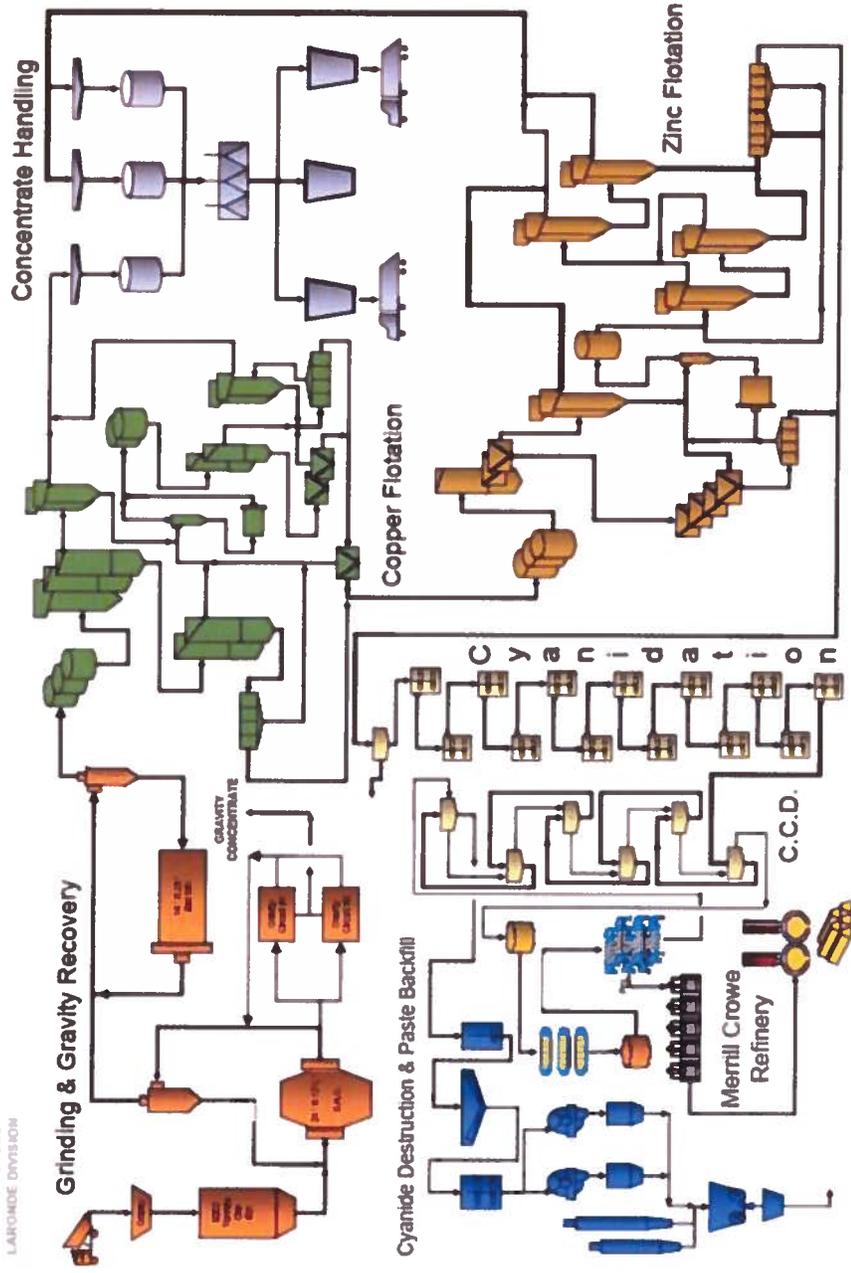
Des tests à échelle réduite ont été effectués pour évaluer la toxicité de l'effluent; le rejet final n'a aucune toxicité pour les espèces *Daphnia magna* et la truite arc-en-ciel et les molécules de cyanure,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{OCN}^-$  et d'ammoniac sont effectivement dégradées, ou du moins réduites (Tableau 4) (Whitlock *et al.* 2003). L'affluent arrivant au bioprocédé contient principalement de l' $\text{OCN}^-$  (200 ppm), du  $\text{SCN}^-$  (700 ppm) et de l'ammonium (50 ppm) à un débit de 150 m<sup>3</sup>/h (communication personnelle, Agnico-Eagle). Sous aération, le biotraitement se fait en série de 4 bassins avec présence d'un RBC ou des MBBR. Le premier bassin sert à la biodégradation de l' $\text{OCN}^-$  et du  $\text{SCN}^-$  produisant ainsi en grande majorité de l'ammonium, mais aussi du carbonate et du sulfate tandis que les trois autres bassins subséquents de la série servent à la nitrification.

**Tableau 4. Efficacité du biotraitement sur le cyanure et ses dérivées sur le rejet de l'effluent.**

		CN (ppm)	$\text{SCN}^-$ (ppm)	$\text{OCN}^-$ (ppm)	$\text{NH}_3$ (ppm)	$\text{NO}_3^-$ (ppm)
Effluent final	Affluent	-	119	16	37.6	9.9
	Effluent	-	< 2	< 1	< 0.1	60.1
Eau de bassin	Affluent	42.8	600	26	78.7	27.5
	Effluent 1	12	430	< 10	95.6	45.5
	Effluent 2	0.11	32	< 10	56.2	177
	Effluent 3	0.03	-	-	9.3	2.3

Adapté de : (Whitlock *et al.* 2003)

**MILLING FLOWSHEET - 7000 tpd**



**Figure 6. Traitements des métaux de la mine Laronde d'Agnico-Eagle.**  
Adapté de : (Agnico-Eagle 2010)

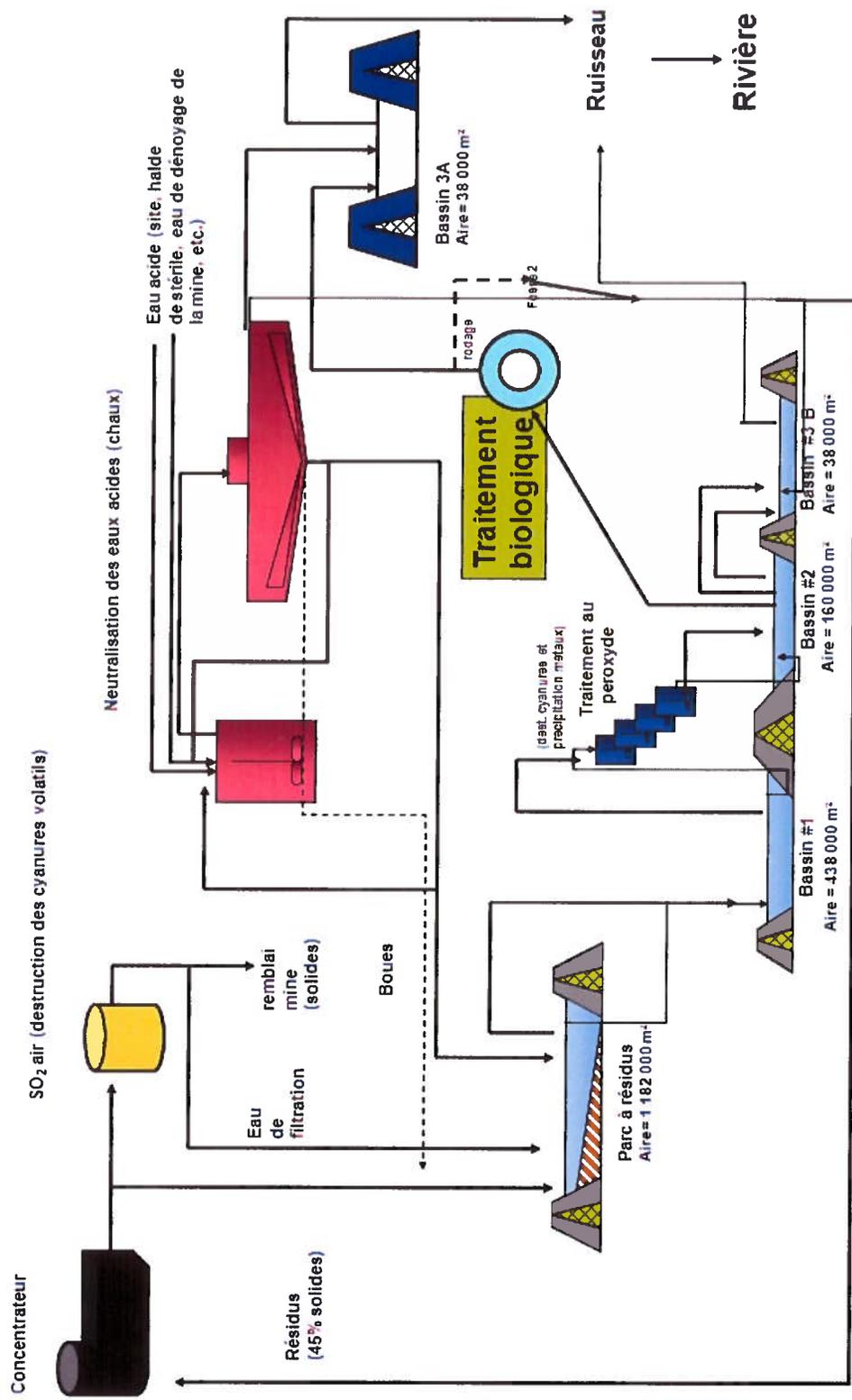


Figure 7. Traitement de l'eau de la mine Laronde d'Agnico-Eagle.  
Tiré de : (Agnico-Eagle 2010)

## 1.8 Problématique, hypothèse et objectifs du projet

Puisque le traitement biologique de la mine Laronde est inspiré de procédés connus, mais demeure unique entre autres par l'absence de  $\text{CN}^-$  et la présence combinée de  $\text{l'OCN}^-$  et du  $\text{SCN}^-$ , il est intéressant d'en étudier l'aspect biologique. La caractérisation sera par enrichissement, puis biomoléculaire. Plusieurs bactéries ont été identifiées dans des procédés similaires et ceux-ci seront comparés aux isolats obtenus à la mine Laronde. Bref, nous croyons pouvoir trouver des bactéries utilisant autant le  $\text{SCN}^-$  que  $\text{l'OCN}^-$  puisque le traitement biologique de la mine est fonctionnel. Nous ne croyons pas que ces bactéries soient de nouvelles espèces, mais plutôt des espèces connues et qui ne sont pas encore répertoriées pour utiliser l'une ou l'autre de ces molécules. De plus, nous supposons que les microorganismes des biomasses provenant du RBC et du MBBR seront similaires puisque leur source provient du même effluent.

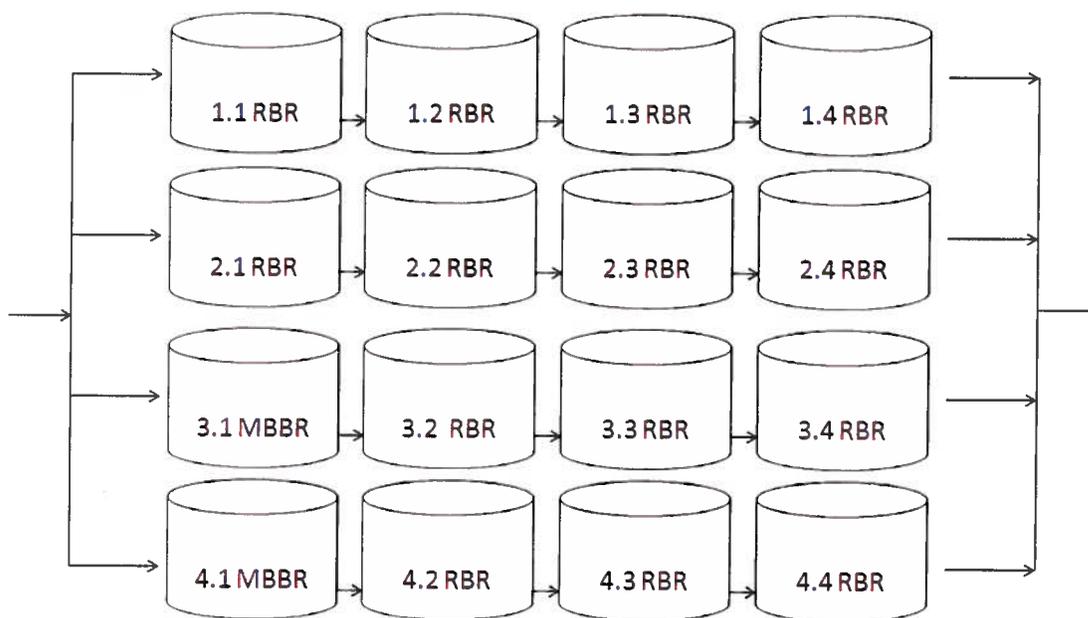
Quant aux objectifs principaux de ce projet de recherche, ils sont: d'enrichir des consortiums pouvant utiliser le  $\text{SCN}^-$  ou  $\text{l'OCN}^-$  pour source d'azote et/ou de carbone dans le but d'isoler des bactéries pouvant utiliser le  $\text{SCN}^-$  ou  $\text{l'OCN}^-$  pour source d'azote et/ou de carbone afin d'identifier les isolats jouant un rôle dans l'une ou l'autre de ces activités cataboliques. La réalisation de ces étapes va répondre à l'objectif de caractériser les populations bactériennes capables d'utiliser ces deux molécules.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1 Techniques d'enrichissement

#### 2.1.1 Échantillonnage

Cette première étape vise à récolter de la biomasse afin d'inoculer nos enrichissements. Deux échantillons, qui ont servi comme biomasses de départ, ont été pris à la mine soit le 20 janvier 2009. Les bassins 2.1 et 3.1 jumelés à 4.1 ont été échantillonnés par un technicien sur place à la mine à raison de 40 ml de biomasse (Fig. 8) échantillonnées et déposées dans des contenants stériles visibles de type Falcon® de 50 ml (VWR, West Chester, É.-U.). Le bassin 2.1, nommé 1121, a pour support un RBC, alors que les bassins 3.1 et 4.1, nommé 3141, ont pour support des MBBR. Les échantillons ont été transportés dans une glacière par avion. Les échantillons ont été séparés en quantité de 2 mL et ont été homogénéisés avec 20 mL d'effluent synthétique. Après l'homogénéisation de quelques secondes par vortex, les échantillons ont été centrifugés à 500 x g pour 1 minute afin de séparer les cellules de la matière. Puis, le surnageant fut retiré avant d'y ajouter de nouveau 20 mL d'effluent synthétique. Les suspensions ont été homogénéisées et centrifugées à 500 x g pour 1 minute. Par la suite, une homogénéisation au vortex de 15 minutes avec des billes de verre stériles (0.25 à 0.5 mm) a été faite pour défaire la biomasse et resuspendre les cellules. Ensuite, les mélanges homogènes ont été filtrés sur du papier Wattman à porosité 2.5 µm (Millipore Billerica, É.-U.) afin de retirer les particules de grandes tailles. Pour chacun, une partie du filtrat a été conservée et l'autre partie fut congelée dans du glycérol (Fisher Scientific, Fair Lawn, É.-U.) à 15% v/v.



**Figure 8. Schématisation des bassins du biotraitement de l'effluent minier de la mine Laronde.**

Le traitement de l'effluent est séparé en 4 séries qui ont sont divisé en 4 bassins en parallèle. Les séries 1 et 2 ont pour support les RBR tandis que les séries 3 et 4 ont pour support les RBR à l'exception de leur premier bassin, à l'occurrence des MBBR y prennent place.

### 2.1.2 Milieux d'enrichissements

Les biomasses initiales ont été inoculées et enrichies dans des bouillons reproduisant les conditions mères, c'est-à-dire l'effluent de la mine. Ces valeurs nous ont été fournies par le personnel du site. Ces milieux ont cependant été adaptés afin de permettre une sélection de certains critères tels que la source de carbone et la source d'azote. Certains éléments et certaines conditions sont demeurés invariables pour tous les enrichissements tels que les flasques stériles de 250 mL, 45 mL de milieu représentant l'affluent synthétique, 5 mL de biomasse homogénéisée et 10 supports à lits mobiles de type Kaldnes K1. Les enrichissements ont été supplémentés avec les solutions stocks afin d'obtenir des concentrations finales de 600 ppm pour le  $\text{SCN}^-$  et 75 ppm pour l' $\text{OCN}^-$  basées sur les concentrations du site. De plus, des vitamines étaient ajoutées aux enrichissements (solution Wolfe (ATCC) – voir le point G de cette présente section) à raison de 0,1% v/v. Dépendamment de l'enrichissement, une source de carbone (solution stock d'extrait de levure et d'acétate de sodium) et/ou d'azote (solution stock de

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) facilement assimilable pouvaient être ajoutée (Tableau 5). Avec ces combinaisons autant pour le SCN<sup>-</sup> et l'OCN<sup>-</sup>, nous sommes arrivés à 12 bouillons différents (Tableau 5). Les enrichissements ont été incubés à température pièce (25°C), sous agitation (200 rpm) et dans l'obscurité. Les passages ont été déterminés d'après l'analyse des molécules SCN<sup>-</sup> et OCN<sup>-</sup> et si les transferts étaient requis, 10% du volume des enrichissements et les supports à lits mobiles étaient transférés dans les milieux frais. Les recettes sont présentées en annexe 1. Les microflores enrichies seront inoculées sur géloses afin de trouver des isolats potentiels à la dégradation du SCN<sup>-</sup> et de l'OCN<sup>-</sup>.

**Tableau 5. Composition nutritionnelle des enrichissements et géloses**

Enrichissement	Source de l'inoculum	Source de carbone	Source d'azote	Bouillon utilisé
1	RBC <sup>1</sup>	SCN <sup>-</sup>	SCN <sup>-</sup>	A1
2	RBC	SCN <sup>-</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	A2
3	RBC	AcNa + YE <sup>3</sup>	SCN <sup>-</sup>	A3
4	RBC	OCN <sup>-</sup>	OCN <sup>-</sup>	A4
5	RBC	OCN <sup>-</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	A5
6	RBC	AcNa + YE	OCN <sup>-</sup>	A6
7	MBBR <sup>2</sup>	SCN <sup>-</sup>	SCN <sup>-</sup>	A1
8	MBBR	SCN <sup>-</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	A2
9	MBBR	AcNa + YE	SCN <sup>-</sup>	A3
10	MBBR	OCN <sup>-</sup>	OCN <sup>-</sup>	A4
11	MBBR	OCN <sup>-</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	A5
12	MBBR	AcNa + YE	OCN <sup>-</sup>	A6

<sup>1</sup>RBC: Biodisque; <sup>2</sup>MBBR: Support à lit mobile; <sup>3</sup>YE: extrait de levure.

### 2.1.3 Suivi de la croissance par Bradford

Afin de quantifier la croissance des différents enrichissements, la méthode de dosage total des protéines de Bradford a été privilégiée puisque dans certains enrichissements, il y a eu formation de floccs (Bradford 1976). Cette structure pourrait engendrer une sous-estimation de la croissance si la mesure n'est prise que par la turbidité. Le dosage protéique de Bradford se fait par une comparaison à une courbe standard faite à partir de l'albumine sérique bovine (BSA) (Pierce par Fisher Scientific, Fair Lawn, É.-U.). Cette méthode de spectrophotométrie permet de déterminer les protéines solubles dans une solution lorsqu'un colorant de type Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, É.-U.) est ajouté. L'absorbance est lue par la suite à une longueur d'onde de 595 nm après un temps de contact entre la solution et le colorant d'un minimum de 5 minutes. Pour chaque échantillon, 1 mL est prélevé. Le culot est resuspendu dans 1 mL NaOH (EMD, Allemagne) à concentration de 0,1 N tandis que le surnageant est utilisé pour le suivi de la biodégradation consommation par CLHP (voir section 2.1.4). L'hydrolyse et solubilisation des protéines du culot se fait pendant 60 minutes à 70°C et l'homogénéisation est faite à la mi-temps et à la fin. Ensuite, le tout est transféré dans une cuvette jetable de 1 mL de spectrophotométrie (Fisher Scientific, Fair Lawn, É.-U.). Le colorant est ajouté, mixé par inversion et une fois que la lecture est prise, les valeurs obtenues sont ensuite comparées à la courbe standard afin de connaître la concentration relative de protéines dans l'échantillon et donc, s'il y a corrélation entre la croissance des microflore et leur potentiel à dégrader le  $\text{SCN}^-$  ou l' $\text{OCN}^-$ .

### 2.1.4 Quantification du cyanate et du thiocyanate par CLHP

Puisque le  $\text{SCN}^-$  et le  $\text{OCN}^-$  sont de petits ions, un appareil de chromatographie liquide de type CLHP de marque Dionex® (modèle DX-500, Dionex, Sunnyvale, CA) est utilisé pour détecter et quantifier ces deux molécules. Tout d'abord, les échantillons de 1 mL de surnageant sont transférés dans un microtube de 1,5 mL<sup>1</sup>. Chaque échantillon est alcalinisé avec 2 µL de NaOH 10 N avant d'être centrifugé 15 min à vitesse maximale

---

<sup>1</sup> Analyses adaptés par le personnel du laboratoire basé sur le manuel d'utilisation de l'appareil.

(Sarstedt-Gruppe, Desaga, Allemagne). Ainsi, les débris cellulaires s'accumulent au fond et le surnageant peut être transféré dans un vial de 1,5 mL (Labsphere, North Sutton, É.-U.). L'échantillon est conservé à 4°C jusqu'au moment de l'injection. Les valeurs des échantillons ont été calculées à partir de courbes standards dont les plages sont comprises entre 1 ppm et 1000 ppm autant pour chacune des molécules.

Le CLHP permet l'analyse des anions par chromatographie ionique et par une détection par la conductivité. L'appareil est composé d'une pompe à gradient GP40 de Dionex, d'une colonne de garde IonPac AG20 de 4 x 50 mm, d'une colonne analytique IonPac AS20 de 4 x 250 mm, d'un détecteur électrochimique ED40 utilisé en mode conductivité, d'un supprimeur d'anions ASRS 300 de 4 mm utilisé en circuit fermé ayant un courant de 100 mA, d'un stabilisateur de détection DS3 comprenant une cellule de conductivité et d'un échangeur de chaleur et d'un autoéchantillonneur TSP, modèle AS3500 avec une boucle d'injection de 20 µL. Le tout est géré par le logiciel PeakNet version 5.21. Les phases mobiles sont du NaOH 100 mM et de l'eau milliQ, les deux sous pression d'hélium pour éviter la formation de carbonates qui pourrait encrasser les colonnes. La méthode de base pour l'analyse du  $\text{SCN}^-$  et de l' $\text{OCN}^-$  suit les directives du manufacturier, mais elle fut optimisée par le personnel du laboratoire.

Le programme d'élution était le suivant : NaOH isocratique à 5 mM pour une durée de 5 min suivie d'un gradient ascendant de NaOH de 5 mM à 15 mM en 15 min. Puis, le gradient de NaOH devient ascendant de 15 mM à 40 mM en 10 min. Ensuite, le NaOH demeure isocratique à 40 mM pour 5 min, et par la suite, un gradient descendant de NaOH de 40 mM à 5 mM se fait en 5 min. Finalement, le NaOH reste isocratique à 5 mM pour les 5 min restantes résultant à un cycle d'analyse de 45 min par échantillon. Le débit utilisé a été de 1 mL/minute à température de 35°C.

## 2.2 Isolement des bactéries

### 2.2.1 Techniques d'ensemencement et d'isolement

Les biomasses et microflores conservées furent inoculées sur différents milieux semi-liquides pour l'isolement bactérien et pour ensemencer les différents enrichissements. Provenant d'un consortium bactérien ou d'une souche pure, le premier échantillon d'une série à être mis sur gélose se fait par la méthode d'étalement. Un volume de culture de 0,1 mL à 0,3 mL est tout d'abord transféré sur la gélose stérile. Puis, à l'aide d'un manche en verre stérile ou de billes de verre stériles, la culture a été répandue sur la totalité de la gélose. Après avoir sélectionnées les colonies à morphologie différente sur les géloses, chacune d'entre elles ont été repiquées individuellement sur une nouvelle gélose. Le tout permettra de trouver des isolats potentiels à identifier et à tester individuellement pour connaître s'ils ont un rôle ou non dans la dégradation de l'une ou l'autre des molécules.

Les biomasses du biotraitement de la mine LaRonde ont été inoculées sur des géloses de milieux non-définis pour oligotrophes soit le R2A, le BHI à concentration de 10%, le NB à concentration de 10% et sur géloses de milieux définis et sélectifs (A1 à A6) (Tableau 5). Pour ces derniers, ils contiennent soit du  $\text{SCN}^-$  ou de l' $\text{OCN}^-$  pour seul source de carbone et/ou d'azote. Ces milieux sont composés des mêmes ingrédients que les enrichissements et ils devraient permettre d'isoler les microorganismes pouvant utiliser le  $\text{SCN}^-$  ou l' $\text{OCN}^-$ . Quant aux microflores obtenues suite aux enrichissements 1, 4, 5, 6, 7, 10, 11 et 12 (Tableau 5), ils ont été inoculés sur les mêmes milieux gélosés cités ci-haut ainsi que sur du LB et du YPD pour accroître les chances de récupérer les bactéries et les levures (pour le YPD). Cette tâche est critique puisqu'elle permettra d'isoler des candidats microbiens jouant un rôle dans la biodégradation de l'une ou l'autre des molécules. L'incubation des géloses a été faite à température pièce ( $25^\circ\text{C}$ ), dans l'obscurité et observées quotidiennement pour l'apparition de colonies à concurrence de 21 jours.

### **2.2.2 Recettes des géloses**

Les biomasses et microflores ont été inoculées sur des milieux non-sélectifs pour aller chercher la plus grande diversité possible, mais également sur des géloses reproduisant les milieux d'enrichissements (A1 à A6). Les détails de ces géloses se retrouvent en annexe 2.

## **2.3 Techniques de biologie moléculaire**

### **2.3.1 Extraction d'ADN**

#### **2.3.1.1 Extraction d'ADN total de biomasse et d'enrichissement**

L'identité des bactéries isolées a été déterminée par la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S). Tout d'abord, l'ADN est extrait à partir d'un enrichissement ou d'une biomasse de départ par une méthode qui combine l'extraction chimique (phénol/chloroforme) et physique (broyage par billes de verre) décrit ci-dessous (Labbé *et al.* 2007). Un volume de 1 mL a été prélevé et transféré dans un microtube de 1,5 mL. Un culot a été obtenu par centrifugation à vitesse maximale pendant 5 min puis resuspendu dans un volume de 0,5 mL de TEN (Tris-HCl 50 mM, EDTA) 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8). Un second lavage des cellules a été effectué et ces dernières ont été resuspendues dans 0,5 mL TEN et transférées dans un microtube vissé contenant 250 mg de billes de verre (0,25 à 0,50 mm) stériles. Ensuite, sur glace, 0,5 mL de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25 :24 :1) a été ajouté au microtube. Les cellules ont ensuite été broyées au moyen de l'appareil FastPrep FP120 (Thermo savant, Holbrook, É.-U.) et ce, à deux reprises pendant 40 secondes à force de 4 m/s avec un intervalle de 5 min sur glace. Puis, le mélange a été centrifugé 15 min à et la phase supérieure résultante, équivalent à environ 0,4 mL, a été transférée dans un nouveau microtube. À cette quantité, un volume égal de chloroforme:alcool isoamylique (49:1) a été ajouté et après avoir mélangé par inversion, une centrifugation de 1 minute à 13 000 rpm a été réalisée. La phase supérieure, soit environ 0,35 mL, a été transférée dans un nouveau microtube et l'ADN précipitée par l'ajout de deux volumes (environ 0,7 mL) d'éthanol 95% (Éthanol Greenfield Inc., Brampton, Canada) et d'un quart de volume, soit

environ 0,0875 mL d'acétate d'ammonium (10 N) (A&C Produits chimiques américains, Montréal, Canada). Le tout a ensuite été placé à -20°C pour une période d'au moins 30 min. Puis, le mélange a été centrifugé 15 minutes à vitesse maximale (Sarstedt-Gruppe, Desaga, Allemagne), le culot obtenu a été conservé et lavé avec 0,5 mL d'éthanol 70% et recentrifugé 5 minutes à vitesse maximale. Puis, le culot résultant a été séché sous la hotte biologique. Finalement, le culot asséché a été dissous dans 0,05 mL d'eau stérile. La concentration de l'ADN obtenu est mesurée par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Nanodrop products, Wilmington, É.-U.) et sa qualité a été visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

Le spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 est une mesure de l'absorbance, plus particulièrement à 260 nm (pour les acides nucléiques). La concentration est alors donnée en ng/ $\mu$ L et afin de s'assurer de la pureté de l'échantillon, le ratio de l'absorbance à 260 nm sur 230 nm est utilisé. Le ratio est dit conforme lorsque la valeur se situe entre 2.0 et 2.2 d'après les spécifications du manufacturier.

### **2.3.1.2 Extraction d'ADN total de souches pures**

L'extraction d'ADN de souches pures peut se faire par la méthode phénol/chloroforme et billes de verre décrite à la section précédente, mais dues au grand nombre d'extractions d'ADN de souches pures à effectuer, une méthode alternative a été privilégiée (Lemarchand *et al.* 2005). Tout d'abord, une culture en bouillon de l'isolat a été faite de 12 à 36 heures avant l'extraction. Après le transfert de la culture dans un microtube de 1,5 mL et une centrifugation de 10 minutes à vitesse maximale (Sarstedt-Gruppe, Desaga, Allemagne), le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA-2Na 5 mM à pH 8, sodium dodécyl sulfate (SDS) 3%). Le tout a ensuite été transféré dans un microtube vissé contenant 250 mg de billes de verre préalablement stérilisés par autoclavage. L'appareil FastPrep FP120 permet de broyer par les billes de verre les cellules. Pour ce protocole, l'échantillon a été broyé à deux reprises pendant 150 secondes à force de 4 m/s à intervalle de 2 minutes pendant lequel le microtube a été remis sur glace. Puis, le mélange a été centrifugé 10 minutes à

vitesse maximale et environ 0,9 mL de surnageant a été récolté et transféré dans un nouveau microtube. Puis, environ 0,18 mL d'acétate d'ammonium (10N) a été ajouté au surnageant, soit 20%, une homogénéisation est faite. Une fois refroidi sur glace pour 5 min, une centrifugation de 15 min à vitesse maximale a été réalisée à 4°C pour recueillir de nouveau le surnageant. Cette étape a été répétée une seconde fois et par la suite, un volume égal, soit environ 0,75 mL d'isopropanol (Anachemia, Montréal, Canada) conservé à -20°C a été rajouté à l'échantillon. Une dernière centrifugation est faite à vitesse maximale pendant 15 minutes à 4°C. À cette étape-ci, le culot a été conservé et lavé avec 0,5 mL d'éthanol 70% par une centrifugation de 5 min à vitesse maximale à température ambiante. Puis, le culot a été asséché sous la hotte biologique et dissous dans 0,05 mL d'eau filtrée et autoclavée. La concentration de l'ADN a été déterminée tel que décrit ci-dessus à 2.3.1.1.

### **2.3.2 Electrophorèse sur gel d'agarose**

Afin de vérifier la présence d'ADN après une extraction ou une réaction PCR, les échantillons ont été séparés par migration sur gel d'agarose (Invitrogen, Grand Island, É.-U.) à concentration de 1%. L'électrophorèse a été faite dans une solution tampon TAE (Tris-HCl 40 mM, acide acétique glacial 40 mM, EDTA-2Na 1 mM) à un voltage de 80 V pour environ 60 min. Dans chacun des puits, un volume de 5 µL d'échantillon a été mélangé à 1 µL de tampon de chargement 6X de bleu de bromophénol (0,25% bleu de bromophénol et 30% glycérol). À titre d'indication, un marqueur d'ADN de poids moléculaire, soit l'ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme StyI (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canada) a été utilisé afin d'estimer la longueur des séquences d'ADN obtenue. Après la migration, les séquences de nucléotides des échantillons ont été révélées grâce à une solution de 10 µg/mL de bromure d'éthidium (Sigma-Aldrich St-Louis, É.-U.) visualisées sous des rayons ultraviolets de l'appareil AlphaImager™ 3400 (Alpha Innotec Corp., San Leandro, É.-U.).

### **2.3.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour le gène de l'ARN ribosomal 16S**

Afin de déterminer la séquence d'ADN d'un échantillon, il est nécessaire de répliquer enzymatiquement celle-ci pour avoir assez de copies pour les étapes subséquentes. Chaque échantillon d'ADN qui est amplifié par une réaction PCR a été concentré (par précipitation éthanol/acétate d'ammonium) ou dilué afin d'avoir une concentration d'environ 2 ng/ $\mu$ L dans la réaction finale qui a un volume final de 50  $\mu$ L. Une solution réactionnelle a été préparée sur glace et sous un environnement stérile. Cette solution contenait 0,5 unité de Taq polymérase (NEB, Pickering, Canada) et 4,5 unités de diluent de Taq polymérase, 200  $\mu$ M de dNTP (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Canada), 10 pmoles/réaction d'amorces pA-27f-YM et pH (Tableau 6), 200 nM et du tampon à PCR (GE Healthcare Chalfont St.Giles, UK)). La réaction a été faite dans le thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosciences, Foster City, É.-U.) selon le programme suivant : 94°C pour 5 minutes, puis 55°C pour 5 minutes suivi de 72°C pour 45 secondes, 94°C pour 45 secondes et 55°C pour 45 secondes le tout répété 30 fois et finalement 72°C pour 10 minutes. Les produits d'amplification obtenus ont été par la suite visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

### **2.3.4 Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)**

L'analyse des communautés microbiennes a été faite par PCR-DGGE (Muyzer *et al.* 1993). Les amorces 341F-GC avec la pince riche en nucléotide G et C et l'amorce 534R ont été utilisées (Tableau 6). L'électrophorèse des DGGE a été effectuée à concentration de 8% d'acrylamide avec un gradient dénaturant allant de 0% à 80% d'un mélange de formamide et d'urée. Tout d'abord, une solution de polyacrylamide (acrylamide : bis N,N'-méthylène-bis-acrylamide (37,5 : 1)) (Bio-Rad) à 40% et filtrée sur 0,45  $\mu$ m a été utilisée. La solution non dénaturante comprend 20% de la solution de polyacrylamide et 2% de solution tampon TAE 50X tandis que la solution dénaturante contient 20% de la solution de polyacrylamide, 2% de solution tampon TAE 50X, 32% de formamide (Fisher Scientific) déionisé et 7 M d'urée (Bio-Rad). Ces deux dernières ont été filtrées à l'aide d'une seringue sur un filtre de 0,45  $\mu$ m et dégazées séparément

sous atmosphère d'azote avant que le gradient du gel soit produit. Pour qu'il y ait polymérisation du gel, il a été nécessaire d'ajouter 5% (v/v) de persulfate d'ammonium 10% (p/v) et 0,5% (v/v) de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Bio-Rad). Le gradient du gel a été généré dans une chambre à gradient avant d'être versé dans le support du module pour DGGE (Bio-Rad).

Avec la présence d'un tampon de chargement à base de bleu de bromophénol, de xylène cyanole (Sigma Chemicals, St-Louis, É.-U.) et de glycérol (Fisher Scientific), les produits de la réaction PCR ont été transférés dans les puits du gel de polyacrylamide. La migration a été effectuée dans une solution tampon TAE à 60°C, à un voltage de 100 V pour 16 heures. La quantité des échantillons à charger a varié d'un puit à l'autre afin d'avoir une similarité entre elles. Donc, la quantité de l'échantillon à charger a été estimée par l'intensité relative des bandes des produits de PCR à partir de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Les profils ont été comparés à un marqueur moléculaire maison comprenant les espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans* (Hupé 2008).

## **2.4 Élaboration de génothèques du gène de l'ARN ribosomal 16S**

### **2.4.1 Échantillon, purification des produits PCR, ligation et transformation**

L'ADN total de chaque échantillon est extrait par la méthode décrite à la section 2.3.1.1 et amplifiée par la réaction PCR décrite à la section 2.3.3 avec les amorces pA-27f-YM et pH (Tableau 6) pour obtenir le gène codant pour l'ARNr 16. La réaction a été faite en triplicata afin d'obtenir une quantité suffisante d'amplicons, qui eux, ont été purifiés avec un kit commercial (Promega) avant d'être ligués dans le vecteur commercial pGEM-T Easy selon les directives du manufacturier (Promega). La ligation a été effectuée comme suit : 5 µL de tampon de ligation sont mélangés avec 50 ng en solution du vecteur pGEM-T Easy, 2 µL d'amplicon, 3 unités de la ligase T4 DNA, et 1 µL d'eau stérile. Après une incubation de 60 min à température pièce, les microtubes contenant la

réaction ont été transférés à 4°C pour une période de 16 h. Le produit de ligation a été ensuite transformé dans des cellules compétentes d'*E coli* DH5α (*Escherichia coli* DH5α F-φ80lacZΔM15Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-) selon les directives du manufacturier (Invitrogen). Cette transformation a été accomplie par choc thermique, c'est-à-dire que dans le tube contenant le produit de ligation, 50 µL de culture de cellules compétentes y ont été ajoutés. Le tout a reposé sur glace pour 20 minutes et par la suite, transféré à 42°C pour 50 secondes. Enfin, après avoir reposé sur glace pour 2 minutes, 950 µL de milieu SOC (Bacto-tryptone, Bacto extrait de levure, NaCl 1M, KCl 1M, Mg<sup>2+</sup> 2M et glucose 2M) (Invitrogen) ont été ajoutés et l'incubation des cultures a été faite à 37°C pour 90 minutes. Les cellules ont ensuite étéensemencées sur géloses LB (Wisent Inc, Rocklin, É.-U.) contenant 100 ml/L carbenicilline (Gold Biotechnology) et 800 mg/L X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) afin de sélectionner les cellules transformées avec un vecteur contenant un insert. Ensuite, chacune des cultures sur gélose a été incubée à 37°C pour 16 heures et par la suite à 4°C pour 3h afin de permettre à la couleur d'être révélée.

**Tableau 6. Amorces universelles utilisées lors des amplifications.**

Amorce	Séquence	Gène ciblé	Référence
Sp6ext	5' -AGCTATTTAGGTGACACTA TAG-3'	Insert (produit cloné)	pGEM®-T Easy (Promega)
T7ext	5' -TTGTAATACGACTCACTA TAGGG- 3'	Insert (produit cloné)	pGEM®-T Easy (Promega)
pA-27f- YM	5' -AGAGTTTGATYMTGG-3'	ADN ribosomal 16S	Edwards 1989, Fernandez 1999
pH	5' -AAGGAGGTGATCCARCCG CA - 3'	ADN ribosomal 16S	Edwards 1989, Fernandez 1999
341F- GC	5'- <u>CGCCCGCCGCGCGCGGCG</u> <u>GGCGGGGCGGGGGCACGG</u> <u>GGGGCCT ACGGGAGGCAGCAG</u> -3'	ADN ribosomal 16S	Muyzer 1993, Luxmy 2000, Onuki 2000
534R	5' ATT ACC GCG GCT GCT 3'	ADN ribosomal 16S	Muyzer 1993, Luxmy 2000, Onuki 2000

#### 2.4.2 Sélection de clones, extraction plasmidique et criblage

La cellule compétente contenant le plasmide avec l'insert se nomme un clone. La sélection des clones a été faite par une sélection de la couleur de la colonie produite par le gène lacZ présent sur le plasmide. Une couleur blanche signifie qu'un insert est cloné puisque le gène est rompu par cette dernière et que le X-Gal présent dans le milieu n'a pas pu être clivé pour obtenir une couleur bleue. La colonie blanche a ensuite été récupérée et transférée individuellement en milieu liquide LB additionné de 100 mg/L carbenicilline afin de pouvoir faire par la suite l'extraction du vecteur contenant l'insert. L'incubation a été faite pour 16 heures à 37°C. Une partie de cette culture a été congelée tandis que le reste a servi à l'extraction plasmidique de type lyse alcaline (miniprep). Pour chaque clone cultivé, 1 ml de la culture a été transféré dans un microtube et culotté par centrifugation à vitesse maximale pour 60 secondes. Le culot a été resuspendu dans

une solution tampon TE (Tris 50 mM, EDTA 10 mM) avec 2  $\mu$ L de RNase A 10  $\mu$ g/ $\mu$ L. Une seconde solution tampon de lyse (NaOH 200 mM, SDS 1%) a ensuite été rajoutée dans l'échantillon. Après homogénéisation, l'ensemble a été incubé à température pièce pour 3 minutes. Puis, la dernière solution (KOAc 3 M, acide acétique glacial 11,5%) a été ajoutée visant à précipiter l'ADN plasmidique. Après un repos de 3 min à température pièce, le tout a été centrifugé 15 min toujours à vitesse maximale et le culot résultant contient le vecteur. Celui-ci a été nettoyé dans 500  $\mu$ L d'éthanol à 70% et puis dissous dans 50  $\mu$ L d'eau stérile. Cette procédure a été effectuée pour tous les clones potentiels sélectionnés.

### **2.4.3 Séquençage, et analyses statistiques et phylogéniques**

À partir de l'ADN plasmidique obtenu avec la miniprep, une réaction d'amplification PCR a été faite selon la méthode décrite au point 3.3.3 et avec les amorces Sp6ext et T7ext (Tableau 6) afin d'amplifier l'insert contenant la séquence du gène de l'ARNr 16S. Les produits d'amplification obtenus ont ensuite été envoyés au Centre d'Innovation de Génome Québec (Montréal, Canada) pour le séquençage. Les séquences obtenues ont par la suite été corrigées, alignées et assemblées informatiquement avec le programme CloneSuite (<http://clonesuite.com>) et manuellement d'après la clareté du chromatogramme avec le logiciel BioEdit (Hall, 2009). À ce point, les contigs ont été comparés informatiquement avec d'autres séquences présentes dans des banques de données telles que BLAST du National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Afin de vérifier statistiquement si la diversité bactérienne au sein d'un groupe est atteinte, les séquences ont été statistiquement analysées. Ce sont le coefficient de Chao I et la courbe de raréfaction qui ont été privilégiées pour l'analyse de la biodiversité par le logiciel BioDiversity Pro (<http://www.sams.ac.uk/dml/projects/benthic/bdpro>). De plus, pour comparer les séquences entre elles mais de manière phylogénique, il est possible de créer des arbres phylogéniques, d'après les séquences obtenues, avec le logiciel ARB (Ludwig et al., 2004). Les séquences ont ensuite été alignées avec le logiciel ClustalW

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), puis analysés avec SEQBOOT/ CONSENSE (l'analyse bootstrap) du logiciel PHYLIP 3.65 (Felsenstein 1989). Les arbres générés ont permis de regrouper les genres et les espèces bactériens les plus rapprochés entre eux. La mise en page de ces arbres a été faite par le logiciel Adobe Illustrator® CS3.

## 2.5 Tests de biodégradation par isolat

Afin de déterminer quelles bactéries dégradent le  $\text{SCN}^-$  et l' $\text{OCN}^-$  dans un consortium, des candidats parmi les isolats obtenus des consortiums ont été sélectionnés, d'après leur abondance qui fut parmi les critères de sélection. Chacun a été mis en préculture en R2A liquide supplémenté de  $\text{SCN}^-$  à 600 ppm ou d' $\text{OCN}^-$  à 75 ppm pendant 16h avant le début de l'échantillonnage pour les tests de biodégradation. Chaque candidat à tester a été incubé dans un flasque de type Erlenmeyer à 10% v/v, à 200 rpm, à température pièce.

Après croissance de l'isolat en préculture, la culture a été centrifugée et lavée à trois reprises à 4000 x g pour 5 minutes. Le lavage a été effectué dans la solution d'affluent synthétique dans un volume de 10 mL. Puis, le volume à ajouter pour le test de biodégradation a été ajusté à  $\text{DO}_{600}$  de 0,05. Pour chaque isolat, au lieu de faire des replica, quatre milieux différents ont été testés, soit les milieux M1, M2, M3 et M4. Chacun contient 600 ppm de  $\text{SCN}^-$  ou de 75 ppm d' $\text{OCN}^-$ . Le milieu M1 est un milieu R2A stérile. Le milieu M2 est composé de l'affluent synthétique filtré et la solution vitamines de Wolfe filtrée. Le troisième milieu est constitué de l'affluent synthétique filtré, la solution vitamines de Wolfe filtrée et du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en solution et filtré. Finalement, le milieu M4 est composé de l'affluent synthétique filtré, la solution vitamines de Wolfe filtrée et d'une solution d'extrait de levure et d'acétate de sodium filtré. Le pH de chacun des milieux a été ajusté à pH 7,5 et le tout a été incubé à température pièce dans un incubateur rotatif à 200 rpm. Un contrôle abiotique représentant le milieu M2 non inoculé a été utilisé en guise de contrôle négatif.

Une plage d'échantillonnage a par la suite été déterminée afin d'avoir une cinétique de dégradation pour chaque isolat. L'échantillon pris a été de 1 mL et a été transférés dans des microtubes de 1,5 mL préalablement pesés. L'échantillon a été alcalinisé avec 2  $\mu$ L de NaOH 10 N avant d'être centrifugé 15 minutes à 13 000 rpm. Ainsi, les cellules se sont accumulées au fond et le surnageant a été transféré dans un vial de verre de 1,5 mL. Quant au culot, il a été utilisé pour la mesure du poids sec de l'échantillon qui a été séché à 60°C pour 16 heures et les microtubes ont ensuite été pesés. La quantification du  $\text{SCN}^-$  et d' $\text{OCN}^-$  ont été faite par CLHP selon la méthode décrite à la section 3.1.4. Finalement, chaque valeur a été déterminée à l'aide d'échantillons formant une courbe standard injectés au même moment que l'échantillon de la cinétique.

## 3. Résultats

### 3.1 Suivi de la flore bactérienne des enrichissements

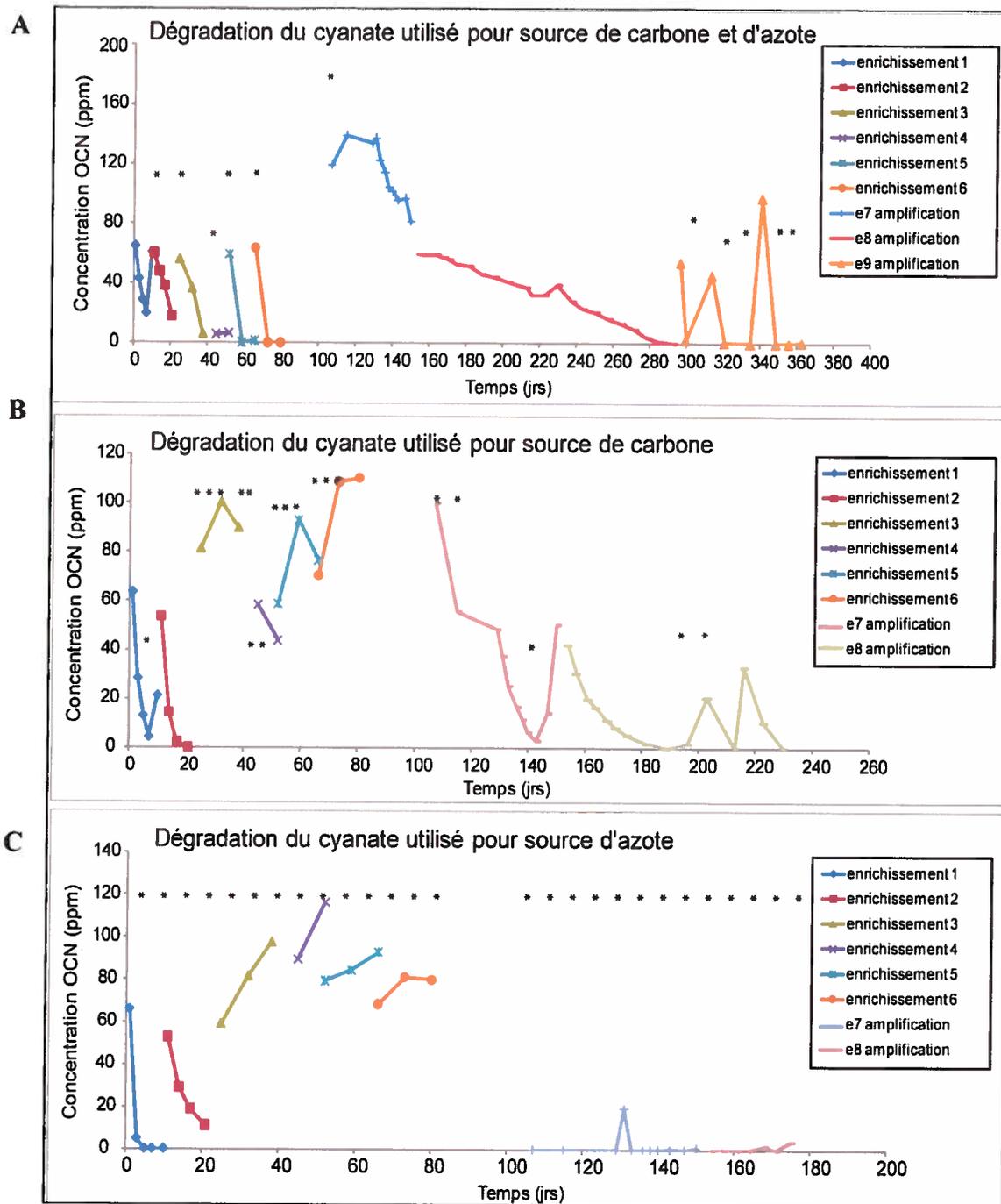
#### 3.1.1 Suivi de la microflore par CLHP pour la consommation du $\text{SCN}^-$ et $\text{l'OCN}^-$

Au cours de l'échantillonnage au site minier, deux échantillons de biomasse ont été prélevés soit en provenance d'un bassin ayant un RBC pour support fixe et d'un second bassin ayant pour support les MBBR pour supports mobiles. Le premier échantillon provient du bassin 1.1 (1121) tandis que le deuxième échantillon provient du bassin 3.1 et 4.1 (3141) (Fig.8). Les échantillons ont été gardés à 4°C jusqu'à leur arrivée au laboratoire. Après homogénéisation, douze enrichissements ont été inoculés (Tableau 5). Chaque enrichissement a été effectué en conditions sélectives, avec le  $\text{SCN}^-$  (600 ppm) ou  $\text{l'OCN}^-$  (75 ppm) présent comme seule source d'azote, de carbone, ou de carbone et azote. Les enrichissements ont été incubés à température pièce (25°C), sous agitation (200 rpm) et dans l'obscurité. Les passages ont été déterminés d'après l'analyse par CHLP des molécules  $\text{SCN}^-$  et  $\text{OCN}^-$  et si les transferts étaient requis, 10% du volume des enrichissements et les supports à lits mobiles étaient transférés dans les milieux frais.

Afin de savoir si les enrichissements étaient capables d'utiliser soit  $\text{l'OCN}^-$  ou le  $\text{SCN}^-$ , des échantillons ont été prélevés régulièrement et analysés par CLHP. L'ajout de nutriments (carbone et/ou azote) s'est fait lorsque la dépletion totale était observée au CHLP. Les figures 9, 10, 11 et 12 représentent le bilan des douze enrichissements effectués entre le 23 janvier 2009 et le 28 janvier 2010. Parmi ces courbes, la consommation des deux molécules n'est pas constante. Les enrichissements où  $\text{l'OCN}^-$  est fourni pour source d'azote ont été rapides; après sept transferts accomplis en moins de 180 jours, le taux de  $\text{l'OCN}^-$  était constante (Fig. 9C et 11C). Pour les enrichissements où  $\text{l'OCN}^-$  était fourni pour source de carbone, il a fallu sept transferts entre 230 jours et 260 jours pour obtenir de la biomasse dégradante (Fig. 9B et 11B). Pour l'enrichissement de  $\text{l'OCN}^-$  pour seule source de carbone et d'azote du RBC, il a fallu huit transferts en 360

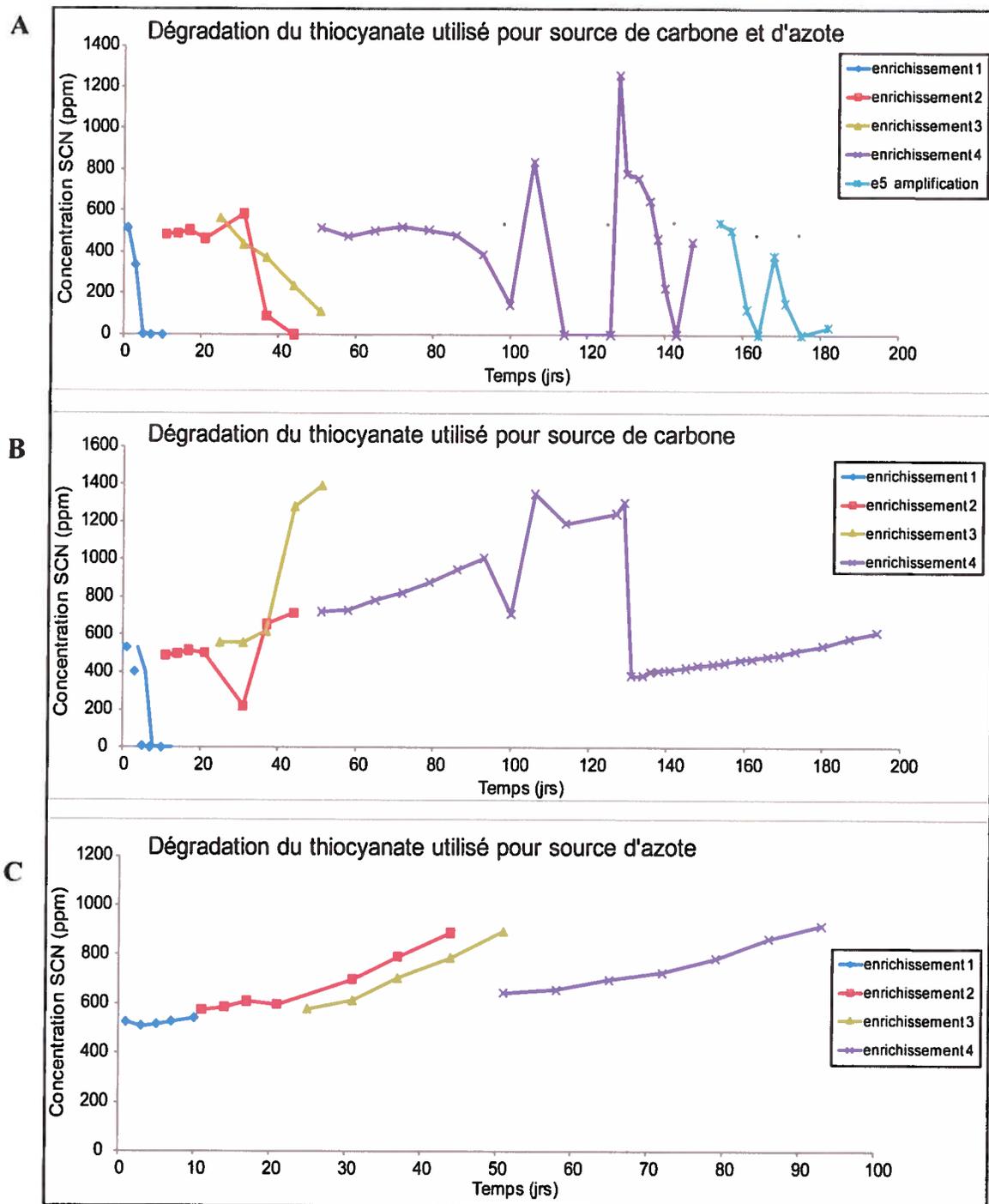
jours pour un taux de dégradation constant (Fig. 9A). Pour les enrichissements du  $\text{SCN}^-$ , pour seule source de carbone et d'azote, il a fallu quatre transferts accomplis en 180 jours pour avoir une dégradation constante (Fig. 10A et 12A). Pour les autres enrichissements, ils n'ont tout simplement pas fonctionné dans les conditions expérimentales testées soit les conditions physico-chimiques du biotraitement de la mine. D'autres enrichissements, tels que  $\text{SCN}(\text{CN})$  RBC (Fig. 10A),  $\text{SCN}(\text{CN})$  MBBR (Fig. 12A) et  $\text{CNO}(\text{CN})$  RBC (Fig. 11A) ont eu la capacité d'utiliser leur molécule respective et par conséquent, des analyses plus en profondeur ont été effectuées quant à leur diversité bactérienne puisqu'ils ont démontré la capacité à dégrader certes, mais ils ont également des traits uniques (voir section 3.2).

Pour certains enrichissements, il y a eu accroissement graduel de la concentration de l'une ou l'autre des molécules sans qu'il y ait ajout de celle-ci. Ce phénomène est dû à l'évaporation ce qui entraîne l'augmentation de la concentration (Fig. 10B). Dans d'autres cas où il y a eu de fortes augmentations dues à l'ajout de dose (Fig. 12A), c'est qu'une moyenne de consommation a été calculée à partir des deux premiers transferts, mais il y a eu un lap de temps entre le temps d'analyse et de l'ajout. Par conséquent, des doses ont été ajoutées dans ces enrichissements malgré le ralentissement de la vitesse de dégradation et même certains enrichissements ont cessé de fonctionner. Suite à cette erreur, il a fallu réajuster les doses à ajouter en se fiant non pas à une moyenne mais après chaque analyse CLHP (Fig. 9B). Ce fut seulement pour les enrichissements où l' $\text{OCN}^-$  est utilisé pour source d'azote que ce calcul fut valable tout au long des passages, c'est-à-dire que la consommation de la dose de l' $\text{OCN}^-$  était de 5 jours pour le RBC et de 2 jours pour le MBBR.



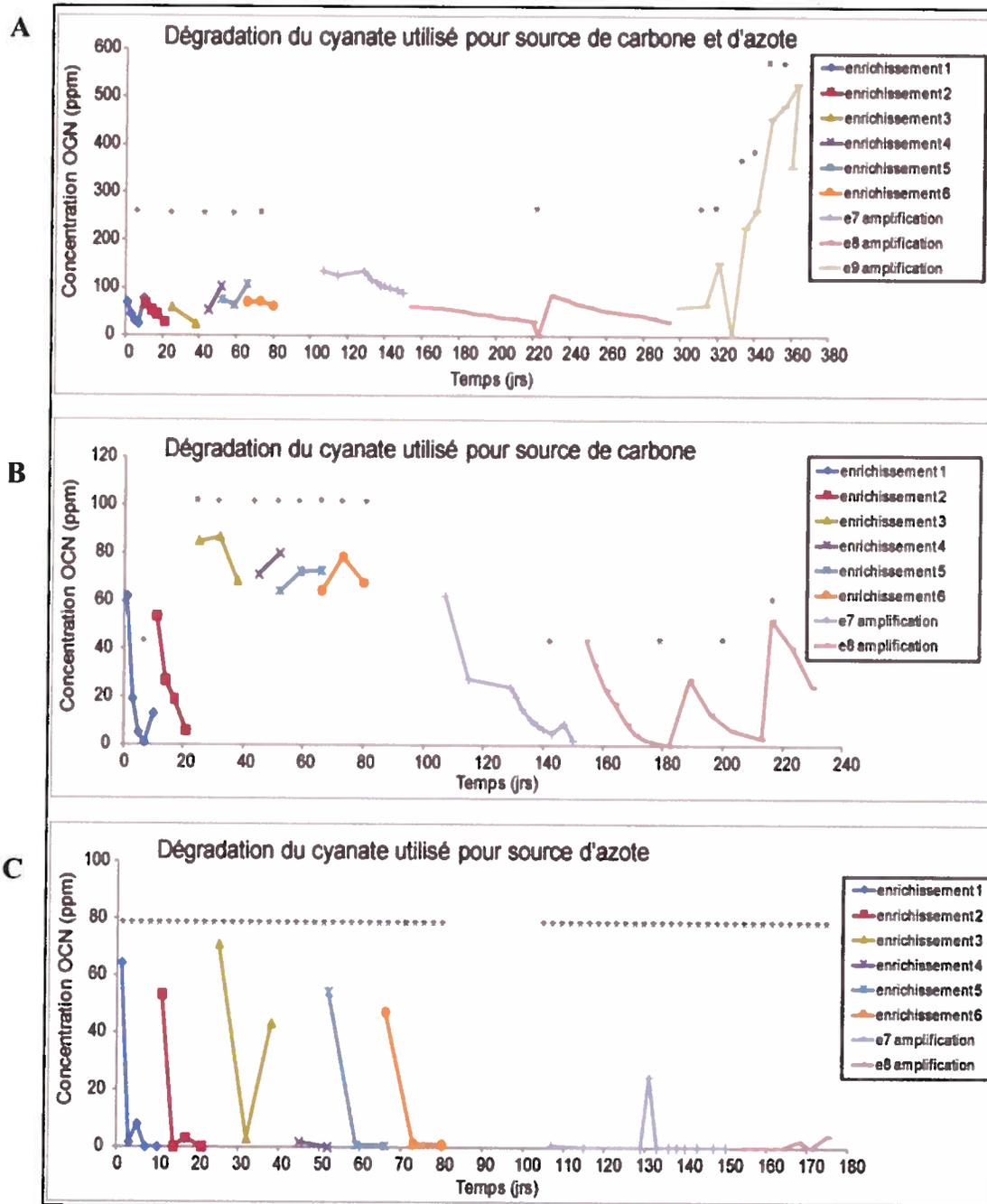
**Figure 9. Suivi des enrichissements par CLHP sur le cyanate ensemencés avec la biomasse provenant du RBC utilisé (A) pour source de carbone et d'azote ; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote.**

La présence d'étoiles signifie qu'il y a eu ajout d'OCN<sup>-</sup> dans le milieu, tandis que chaque couleur de courbes représente un transfert de la microflore dans un milieu frais. Les amplifications ont été fait à grand volume mais avec les mêmes concentrations afin d'augmenter la biomasse pour les étapes subséquentes.



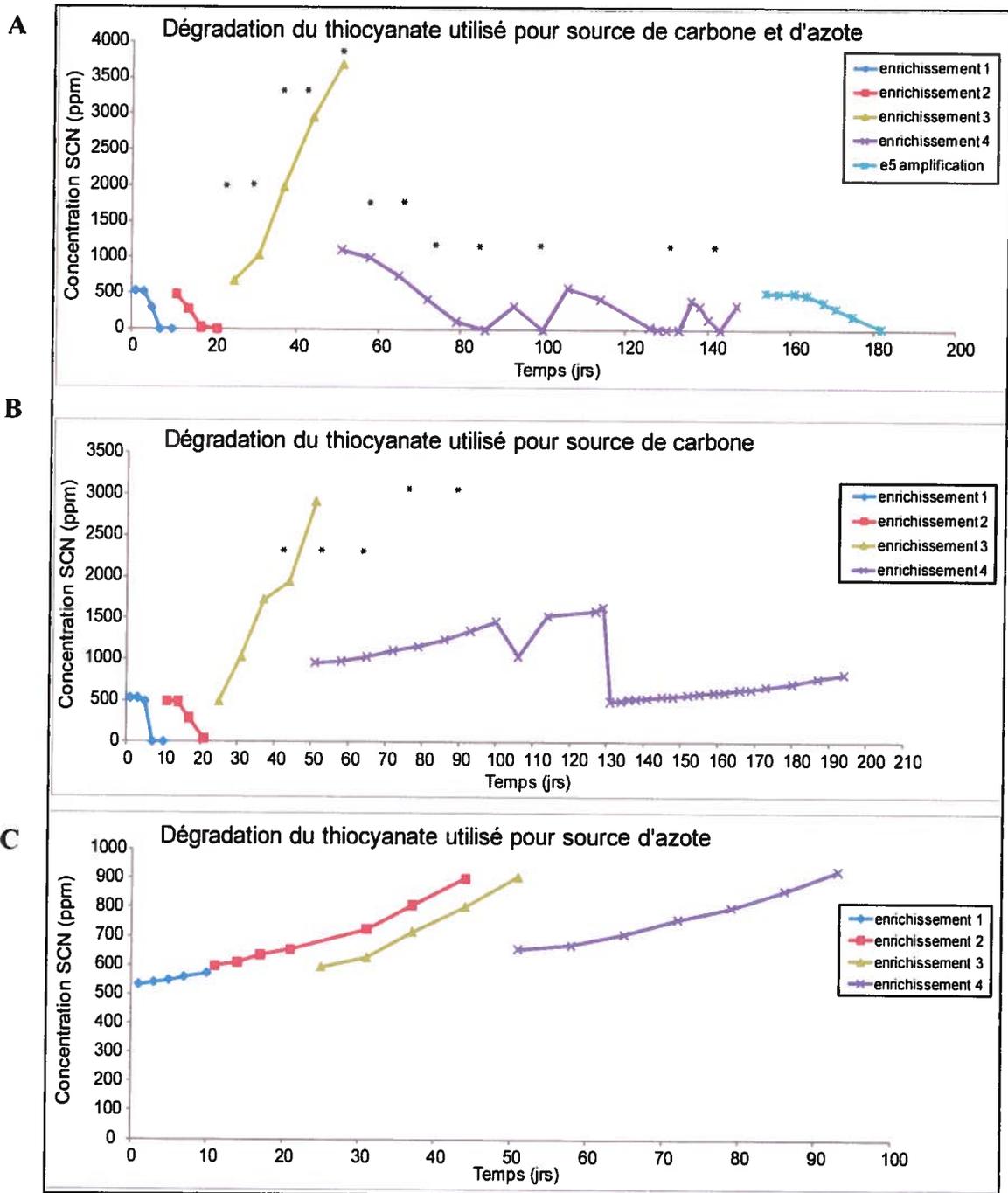
**Figure 10. Suivi des enrichissements par CLHP sur le thiocyanate ensemencés avec la biomasse provenant du RBC utilisé (A) pour source de carbone et d'azote ; (B) Suivi pour source de carbone ; (C). pour source d'azote.**

La présence d'étoiles signifie qu'il y a eu ajout de  $SCN^-$  dans le milieu, tandis que chaque couleur de courbes représente un transfert de la microflore dans un milieu frais. Les amplifications ont été fait à grand volume mais avec les mêmes concentrations afin d'augmenter la biomasse pour les étapes subséquentes.



**Figure 11. Suivi des enrichissements par CLHP et provenant du MBBR pour le cyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote ; (B) pour source de carbone ; (C) pour source d'azote.**

La présence d'étoiles signifie qu'il y a eu ajout d'OCN<sup>-</sup> dans le milieu, tandis que chaque couleur de courbes représente un transfert de la microflore dans un milieu frais. Les amplifications ont été fait à grand volume mais avec les mêmes concentrations afin d'augmenter la biomasse pour les étapes subséquentes.



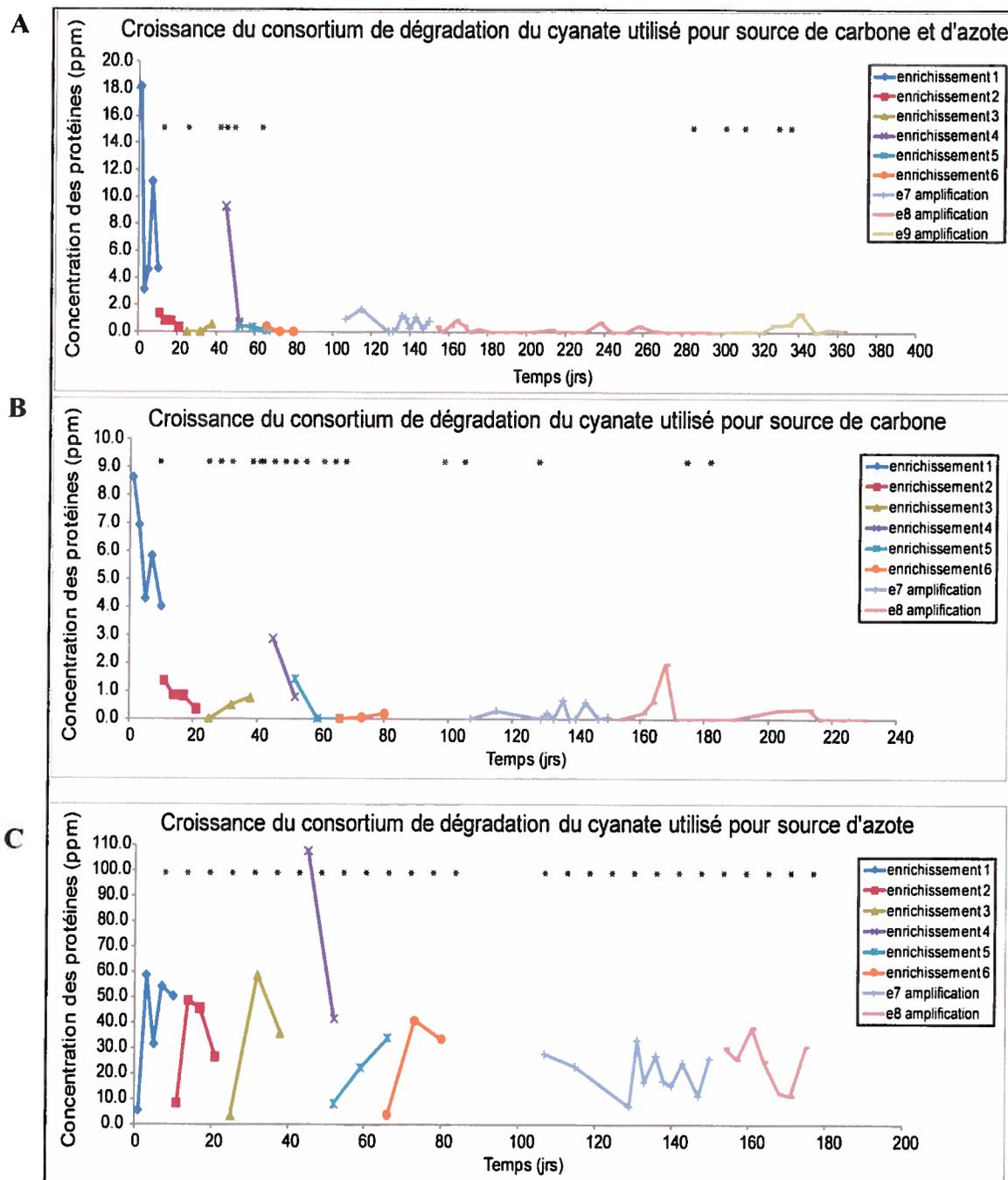
**Figure 12. Suivi des enrichissements par CLHP et provenant du MBBR pour le thiocyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote.**

La présence d'étoiles signifie qu'il y a eu ajout de SCN<sup>-</sup> dans le milieu, tandis que chaque couleur de courbes représente un transfert de la microflore dans un milieu frais. Les amplifications ont été fait à grand volume mais avec les mêmes concentrations afin d'augmenter la biomasse pour les étapes subséquentes.

### **3.1.2 Suivi de la croissance des microflores par protéines totales (Bradford)**

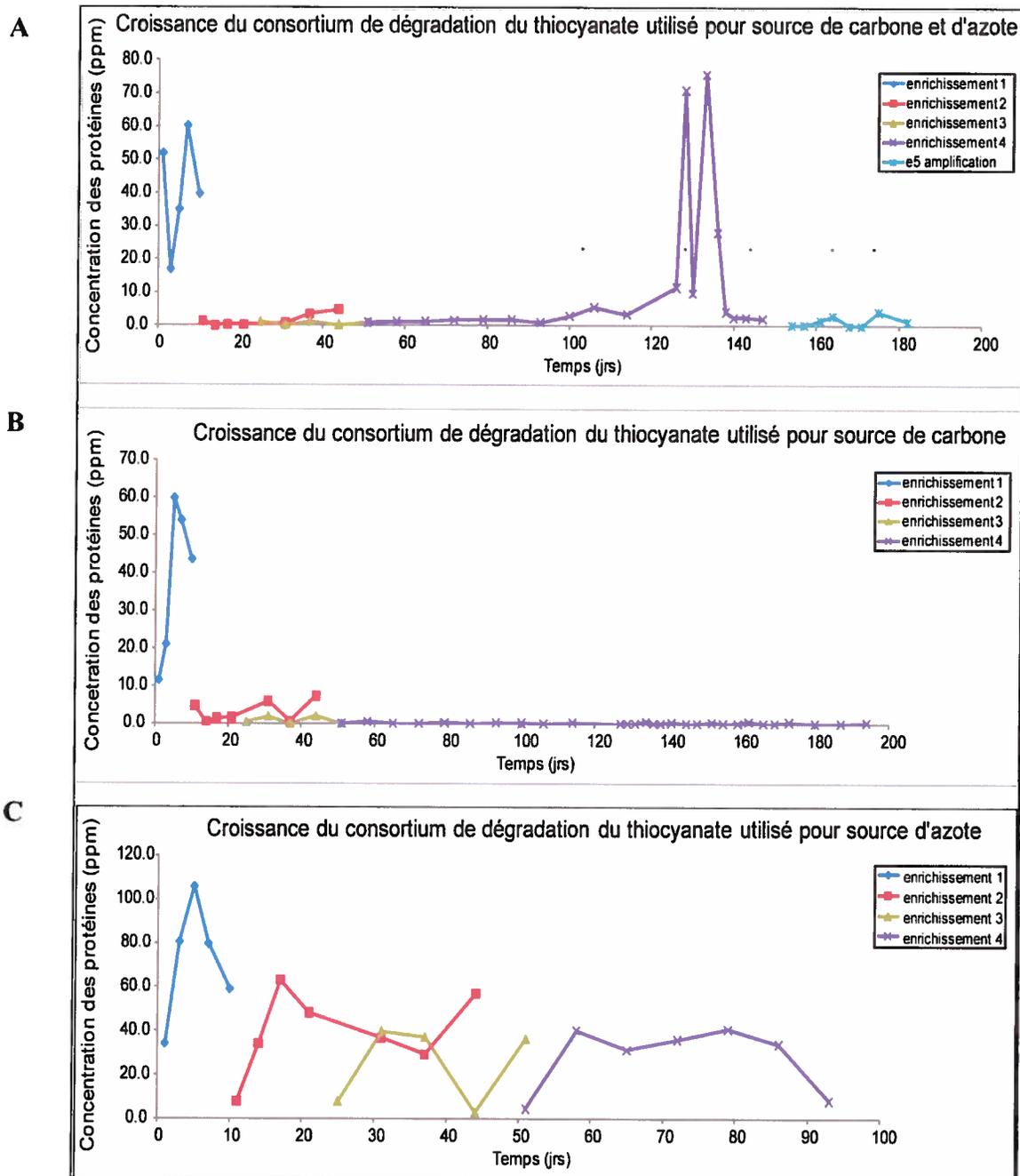
Afin de quantifier la croissance microbienne dans les enrichissements, le suivi de la biomasse a été fait par la quantification des protéines totales. Donc, à partir des mêmes échantillons prélevés pour l'analyse au CLHP, les culots récupérés ont servi à l'analyse des protéines totales selon la méthode décrite à la section 2.1.3. Les enrichissements contenant de l'extrait de levure présentaient évidemment une forte croissance qui ne concordait pas nécessairement avec la capacité de dégradation du  $\text{SCN}^-$  ou de l' $\text{OCN}^-$ . Le contraire est également vrai; selon les données récoltées par CHLP, il y a diminution des molécules, mais les microflores des enrichissements n'étaient pas visibles et selon les résultats de spectrophotométrie obtenus, sous la limite de détection. Les figures 13 et 14 représentent la croissance pour les enrichissements provenant du RBC pour l' $\text{OCN}^-$  et le  $\text{SCN}^-$ , tandis que les figures 15 et 16 sont pour les enrichissements provenant des MBBR. Rappelons que les échantillons de la figure 13 sont les mêmes que ceux de la figure 9 ; les échantillons de la figure 14 correspondent à ceux de la figure 10 ; ceux de la figure 15 sont les mêmes que la figure 11 tandis que ceux de la figure 16 correspondent à ceux de la figure 12.

Les figures sont peu concluantes ; il n'y a pas de tendance observable. Elles ne coïncident pas avec l'augmentation de la dégradation du  $\text{SCN}^-$  ou de l' $\text{OCN}^-$ . De plus, lors des passages, il ne semble pas y avoir de changement comme une diminution de la biomasse. De plus, pour une majorité d'échantillons, la croissance semble être sous le seuil de détection.



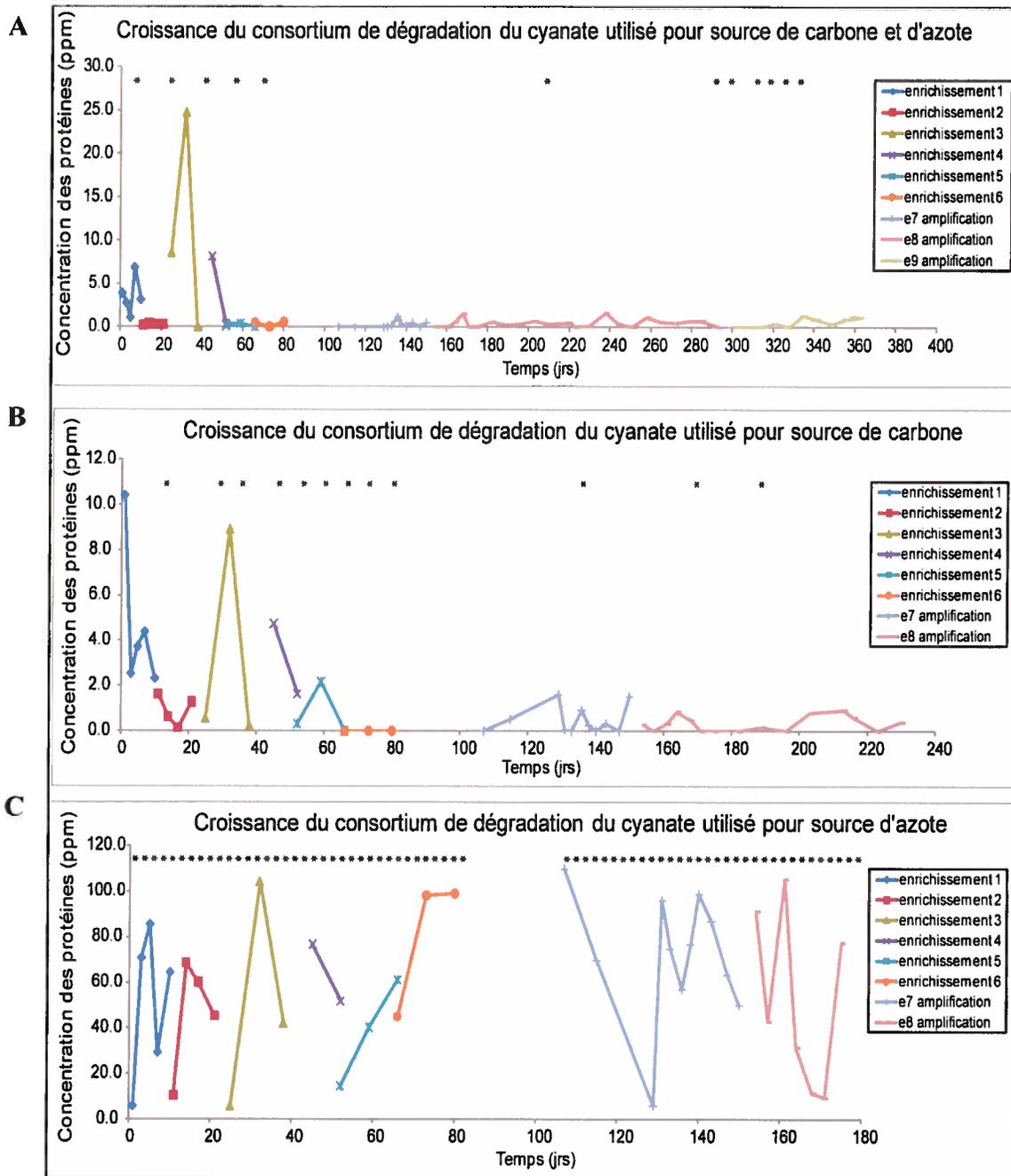
**Figure 13. Suivi de la croissance des enrichissements provenant du RBC pour le cyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote.**

La présence d'étoiles signifie qu'il y a eu ajout d' $\text{OCN}^-$  dans le milieu, tandis que chaque couleur de courbes représente un transfert de la microflore dans un milieu frais. Les amplifications ont été fait à grand volume mais avec les mêmes concentrations afin d'augmenter la biomasse pour les étapes subséquentes.



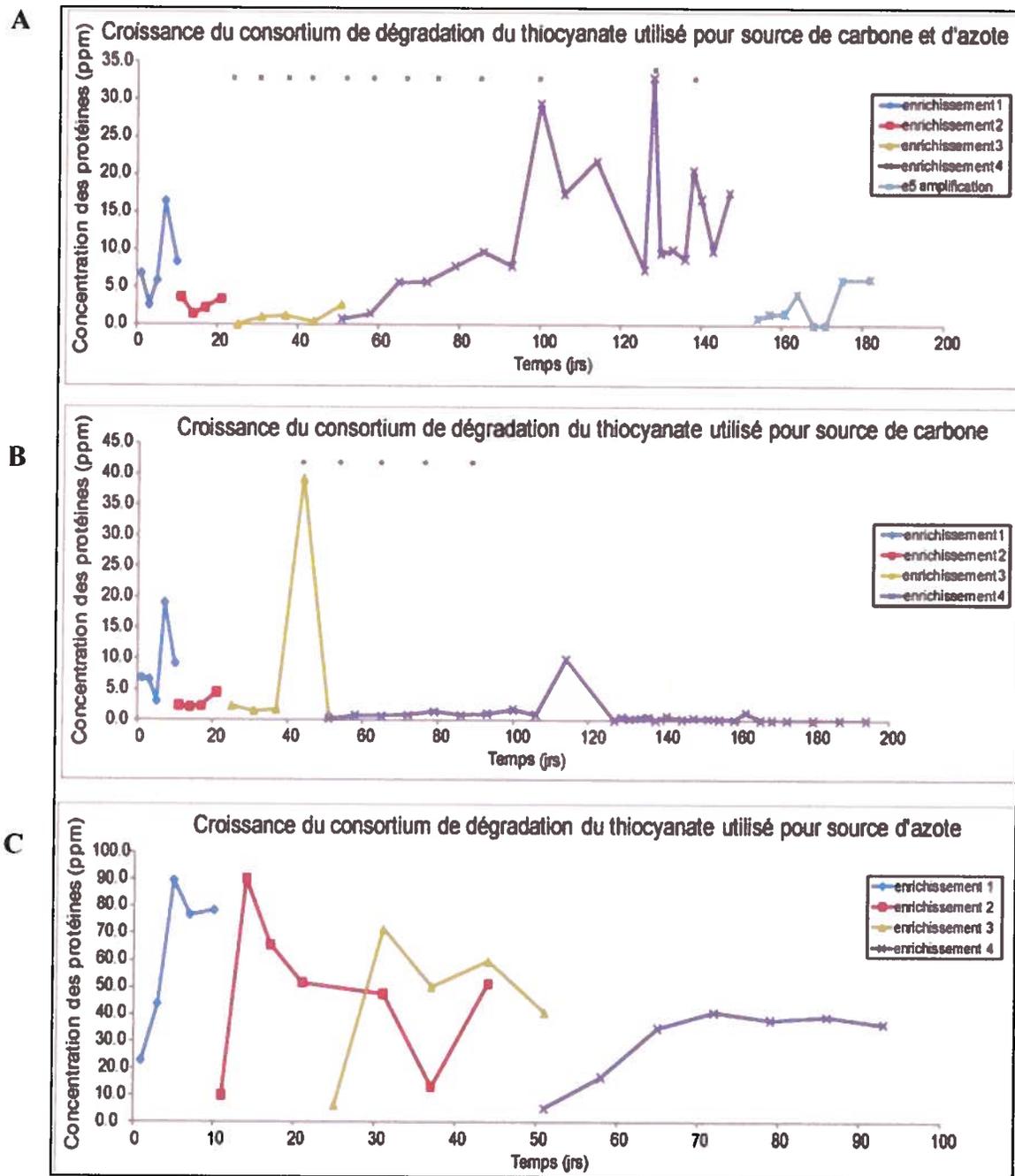
**Figure 14. Suivi de la croissance des enrichissements provenant du RBC pour le thiocyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote.**

La présence d'étoiles signifie qu'il y a eu ajout de  $SCN^-$  dans le milieu, tandis que chaque couleur de courbes représente un transfert de la microflore dans un milieu frais. Les amplifications ont été fait à grand volume mais avec les mêmes concentrations afin d'augmenter la biomasse pour les étapes subséquentes.



**Figure 15. Suivi de la croissance des enrichissements provenant du MBBR pour le cyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote.**

La présence d'étoiles signifie qu'il y a eu ajout d' $\text{OCN}^-$  dans le milieu, tandis que chaque couleur de courbes représente un transfert de la microflore dans un milieu frais. Les amplifications ont été fait à grand volume mais avec les mêmes concentrations afin d'augmenter la biomasse pour les étapes subséquentes.



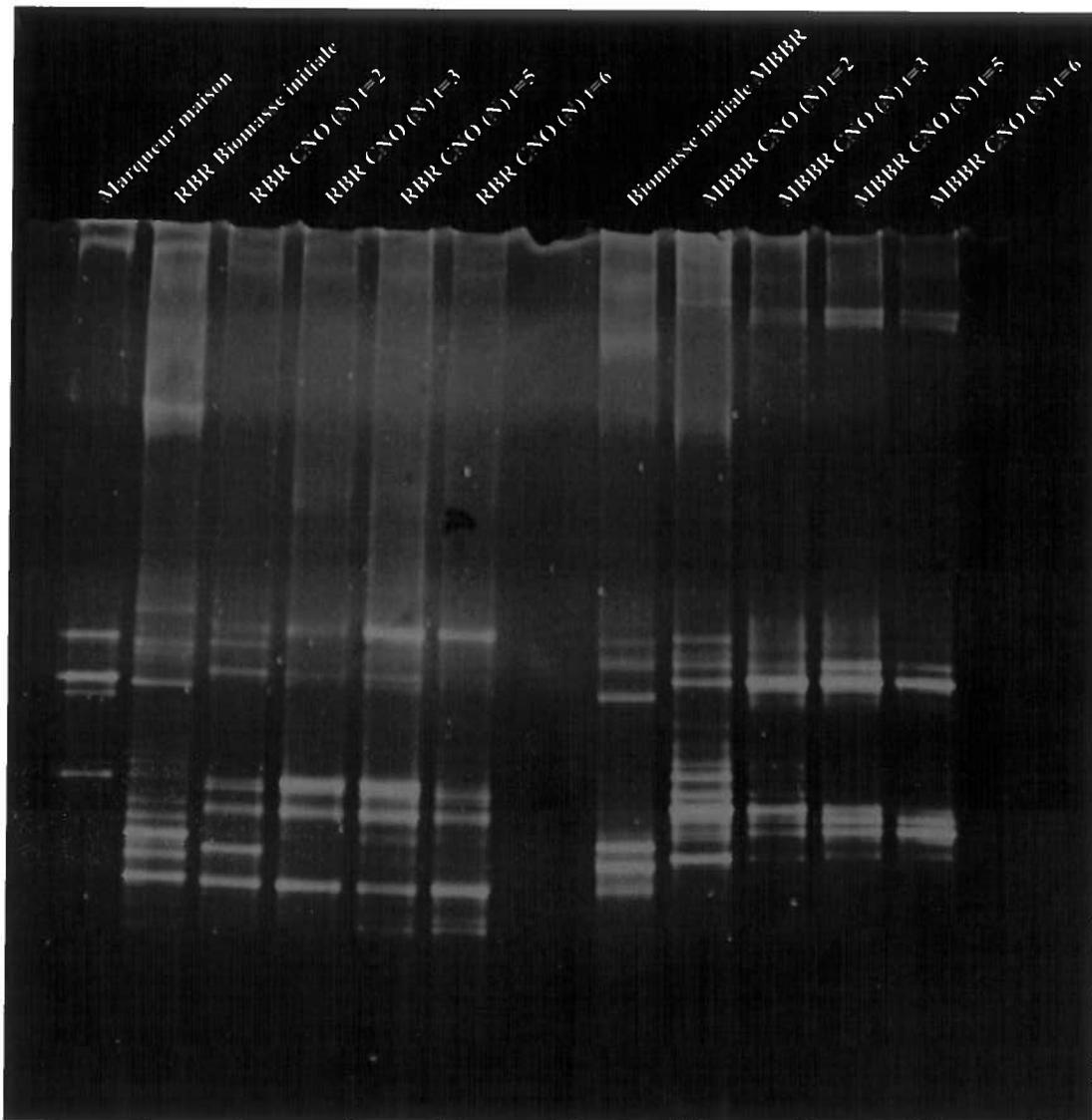
**Figure 16.** Suivi de la croissance des enrichissements provenant du MBBR pour le thiocyanate utilisé (A) pour source de carbone et d'azote; (B) pour source de carbone; (C) pour source d'azote.

La présence d'étoiles signifie qu'il y a eu ajout de  $\text{SCN}^-$  dans le milieu, tandis que chaque couleur de courbes représente un transfert de la microflore dans un milieu frais. Les amplifications ont été fait à grand volume mais avec les mêmes concentrations afin d'augmenter la biomasse pour les étapes subséquentes.

### 3.1.3 Suivi de la microflore par PCR-DGGE

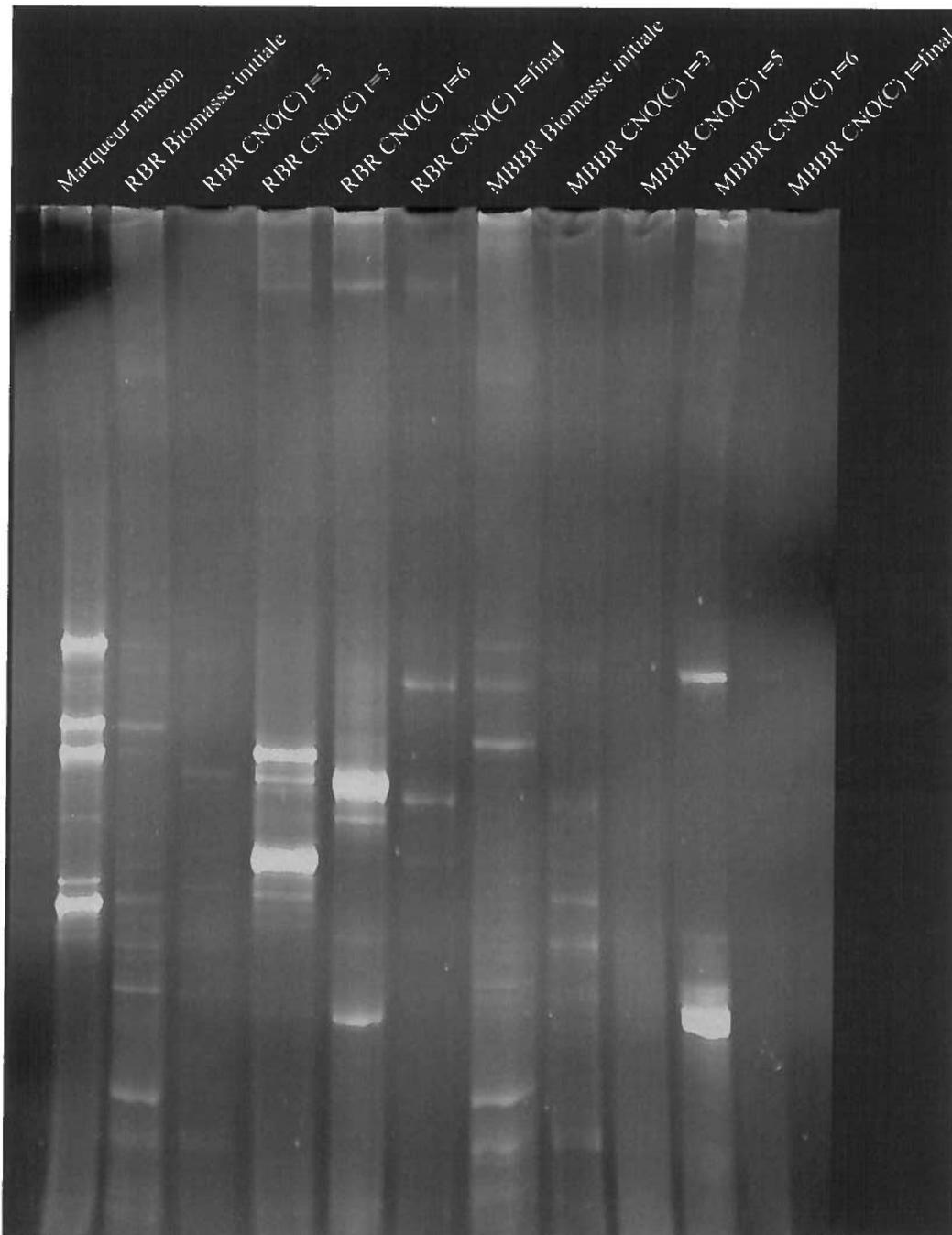
Afin de suivre les consortiums dans le temps, des échantillons des biomasses initiales, ainsi que des échantillons des enrichissements entre les passages dans de nouveaux milieux ont été collectés et entreposés à  $-80^{\circ}\text{C}$  tout au long du processus. Sur ces échantillons, une extraction de l'ADN totale a été effectuée suivie d'une amplification par PCR d'une partie des gènes de l'ARNr 16S (Tableau 6), afin d'obtenir un profil des populations par DGGE. La figure 17 montre le profil PCR-DGGE des enrichissements microbiens des microflores où l' $\text{OCN}^-$  est utilisé pour source d'azote seulement (CNO(N)), ensemencés avec la biomasse du RBC et du MBBR. Le nombre de bandes diminue dans le temps, suggérant que la diversité de la population diminue, alors que certaines bactéries s'enrichissent par la présence d'une bande plus dense. La figure 18, quant à elle, représente les profils PCR-DGGE des enrichissements microbiens provenant du RBC et du MBBR où l' $\text{OCN}^-$  est utilisé pour source de carbone seulement (CNO(C)). Pour ces profils, il semble y avoir une diminution de la diversité de la population dans le temps. La figure 19 montre les profils PCR-DGGE des enrichissements de RBC où l' $\text{OCN}^-$  est utilisé pour source de carbone et d'azote (CNO(CN)), le  $\text{SCN}^-$  est utilisé pour source de carbone et d'azote (SCN(CN)) et finalement, l'enrichissement provenant du MBBR où le  $\text{SCN}^-$  est utilisé pour source de carbone et d'azote (SCN(CN)). Pour chacun des enrichissements de cette dernière figure, l'organisation initiale des populations, via chacune des bandes, s'intensifie pour les espèces dominantes, signifiant que les espèces critiques ont s'enrichissement et se stabilisent dans le temps. Toutefois, les figures montrent que les enrichissements sont diversifiés et différentes entre elles. On peut conclure avec ces figures que les biomasses de chaque enrichissement s'enrichissent et se stabilisent avec le temps.

Pour ce qui est des sept autres enrichissements, où le  $\text{SCN}^-$  est utilisé pour source de carbone (SCN(C)) ou pour source d'azote (SCN(N)) provenant du RBC ou du MBBR et l' $\text{OCN}^-$  utilisé pour source de carbone et d'azote combiné (CNO(CN)) en provenance du MBBR, les profils PCR-DGGE n'ont pas été faits puisque les quantités de biomasse étaient sous le seuil de détection.



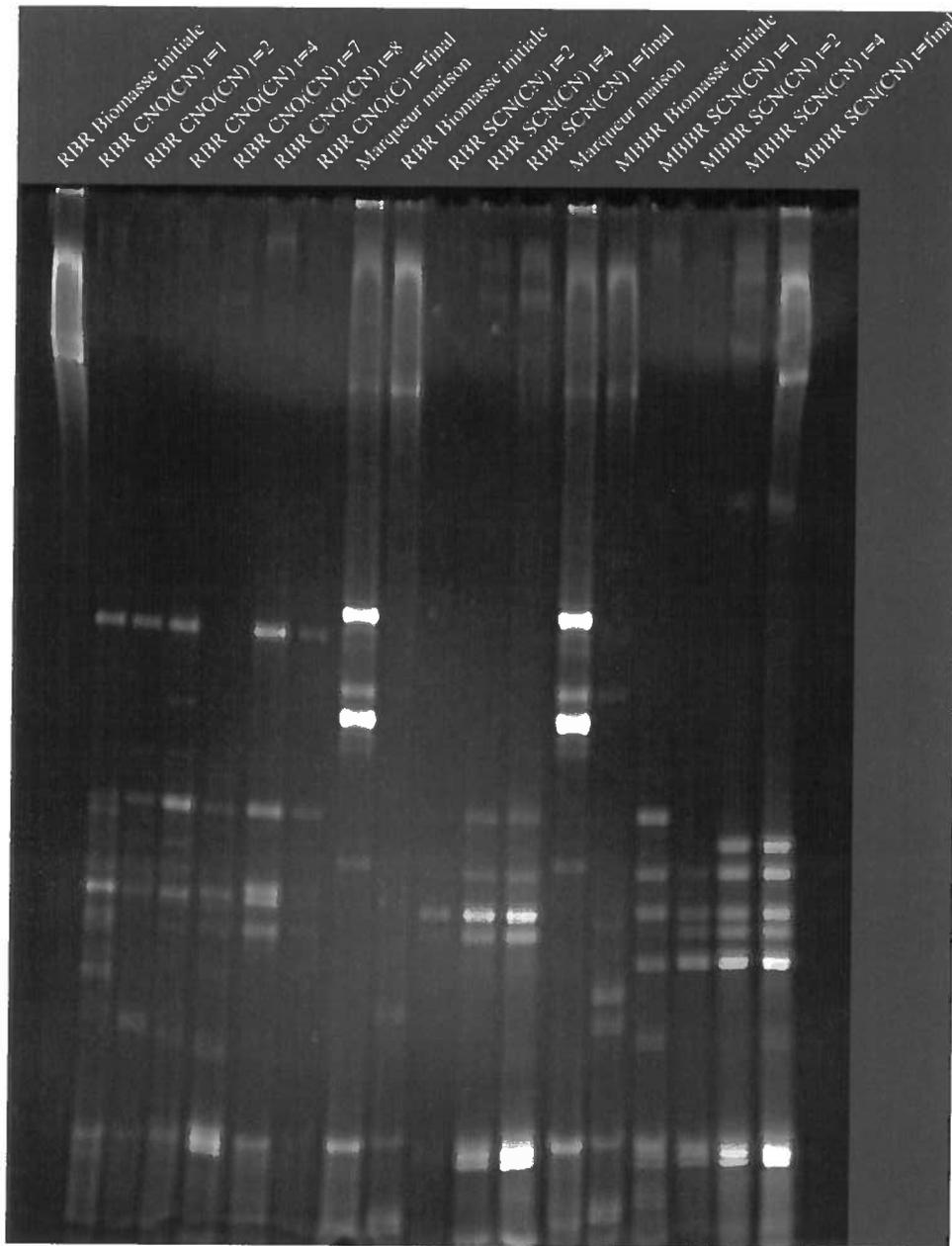
**Figure 17. Profil PCR-DGGE de la diversité microbienne des enrichissements RBC et MBBR (CNO(N)).**

Le premier puit est le marqueur maison comprenant les espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans* (Hupé 2008); dans le deuxième puit, il y a la biomasse initiale du RBC ; dans les puits 3 à 6 inclusivement, ce sont la microflore RBC CNO(N) au 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> passage (Fig. 9C); dans le puit 7, il y a la biomasse initiale du MBBR ; dans les puits 8 à 11 ce sont la microflore MBBR CNO(N) au 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> passage (Fig. 11C). Pour chaque échantillon, 24  $\mu$ L ont été chargés sur le gel avec 24  $\mu$ L de tampon de charge. Le gradient dénaturation utilisé pour ce gel était de 20% à 70%.



**Figure 18. Profil PCR-DGGE de la diversité microbienne des enrichissements RBC et MBBR (CNO(C)).**

Le premier puits est le marqueur maison comprenant les espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans* (Hupé 2008); dans le deuxième puits, il y a la biomasse initiale du RBC ; dans les puits 3 à 6 inclusivement, ce sont la microflore RBC CNO(C) au 3<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> passage et la microflore finale (Fig. 9B); dans le puits 7, il y a la biomasse initiale du MBBR ; dans les puits 8 à 11 ce sont la microflore MBBR CNO(C) au 3<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup> 6<sup>e</sup> passage et la microflore finale (Fig. 11B). Le gradient utilisé pour ce gel fut de 30% à 60% et de 20 µL à 30 µL d'échantillon ont été chargé avec une équivalence pour le tampon de charge.



**Figure 19. Profils PCR-DGGE de la diversité microbienne des enrichissements RBC (CNO(CN)), RBC SCN(CN) et MBBR SCN(CN).**

Le premier puit constitue la biomasse initiale du RBC ; les puits 2 à 7 font partie de l'enrichissement CNO(CN) provenant du RBC au 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup> passage et la microflore finale (Fig. 9A). Le huitième et treizième puit représente le marqueur maison comprenant les espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans* (Hupé 2008) tandis que le puit 9 représente la biomasse initiale du RBC. Les puits 10 à 12 montrent l'enrichissement SCN(CN) provenant du RBC au 2<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> passage et la microflore finale (Fig. 10A). Le puit 14 représente la biomasse initiale du MBBR. Finalement, les puits 15 à 18 font partie de l'enrichissement SCN(CN) provenant du MBBR. Dans l'ordre de ces derniers puits, il y a le 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> passage ainsi que la microflore finale (Fig. 12A). De 22  $\mu$ L à 40  $\mu$ L d'échantillon a été chargé dans chaque puits avec un volume équivalent de tampon de charge et le gradient de dénaturation était de 30% à 60%.

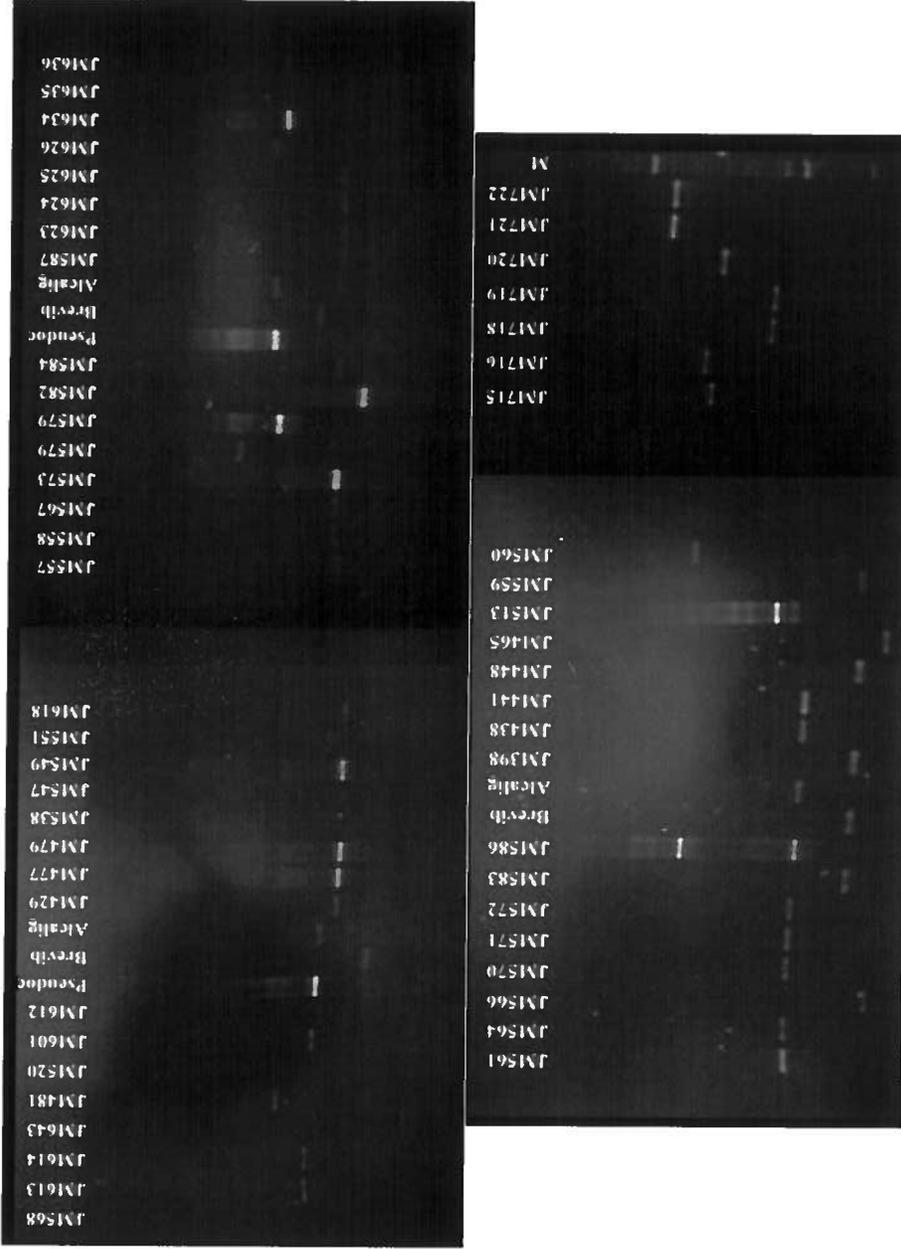
## **3.2 Analyse biomoléculaire des séquences provenant des isolats**

### **3.2.1 Isolement d'isolats bactériens**

À partir des biomasses de départ et des enrichissements finaux ayant démontré une dégradation de l'une ou l'autre des molécules, des isolats bactériens ont été obtenus par repiquage sur différents milieux gélosés afin d'obtenir le plus de grand nombre de bactéries différentes possible. La sélection des isolats a été faite d'après la morphologie des colonies. Ensuite, après une extraction de leur ADN chromosomique, le gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR. Pour restreindre le nombre de séquençage à faire, car il y avait de grandes chances d'avoir des bactéries identiques malgré le tri, un criblage a été fait par DGGE.

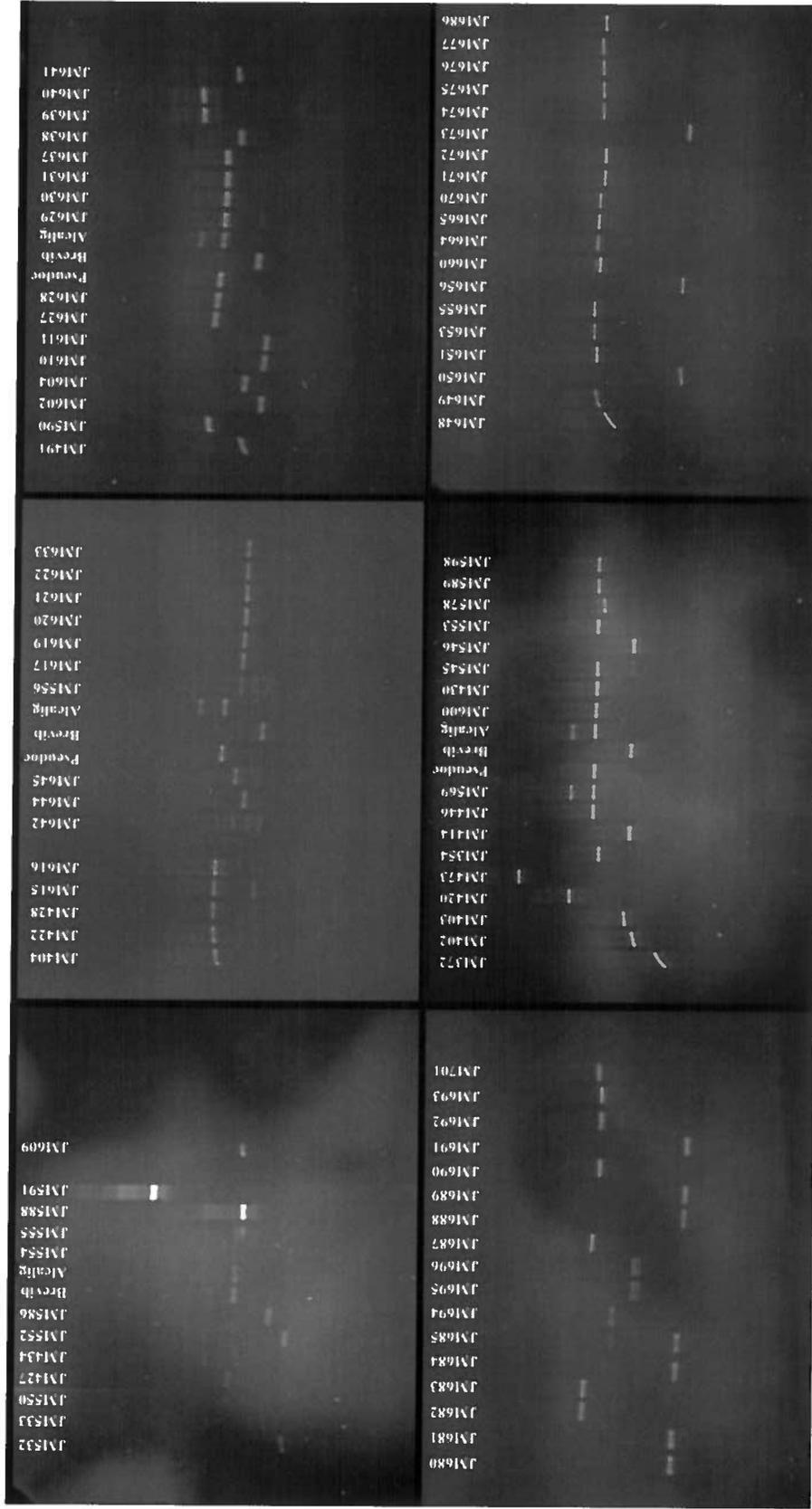
### **3.2.2 Sélection des isolats par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)**

La méthode du criblage par PCR-DGGE a été adoptée afin d'éliminer la redondance dans les isolats. Un nouveau PCR a été effectué sur l'ADN des isolats pour cibler le gène de l'ARNr 16S avec les amorces 341f-GC et 534r. Donc, d'après la séquence qui est différente pour chaque isolat, la migration sera également différente. Cette méthode a été efficace pour éliminer les isolats d'espèces identiques puisqu'une seule bande est générée pour chaque profil et ainsi, les bandes aux mêmes niveaux de migration représentent des séquences identiques. De plus, en utilisant des bactéries séquencées comme marqueur, il fut facile d'éliminer plusieurs candidats qui avaient les mêmes fragments. Les figures 20 représentent l'ensemble des profils des isolats obtenus par cette méthode. La soixante dizaine d'isolats différents obtenus par cette technique, sur près de 300 isolats, ont été par la suite identifiés par séquençage de gène codant pour l'ARN 16S ribosomal (Tableaux 7 à 16, annexe 3).



**Figure 20A. Profil PCR-DGGE des isolats obtenus après enrichissement.**

Un marqueur maison (M) a été utilisé à titre indicatif. Egalement, des isolats déjà séquencés ont été utilisés à titre de comparaison. Parmi ceux-ci, il y a *Pseudochrobactrum* sp. kss (Pseudoc), *Brevibacillus brevis* (Brevib) et *Alcaligenes faecalis* (Alcalig). Les isolats sont les échantillons commençant par JM suivi d'un chiffre séquentiel. Le gradient utilisé pour ce gel fut de 30% à 60% et de 20 µL à 30 µL d'échantillon ont été chargé avec une équivalence pour le tampon de coloration.



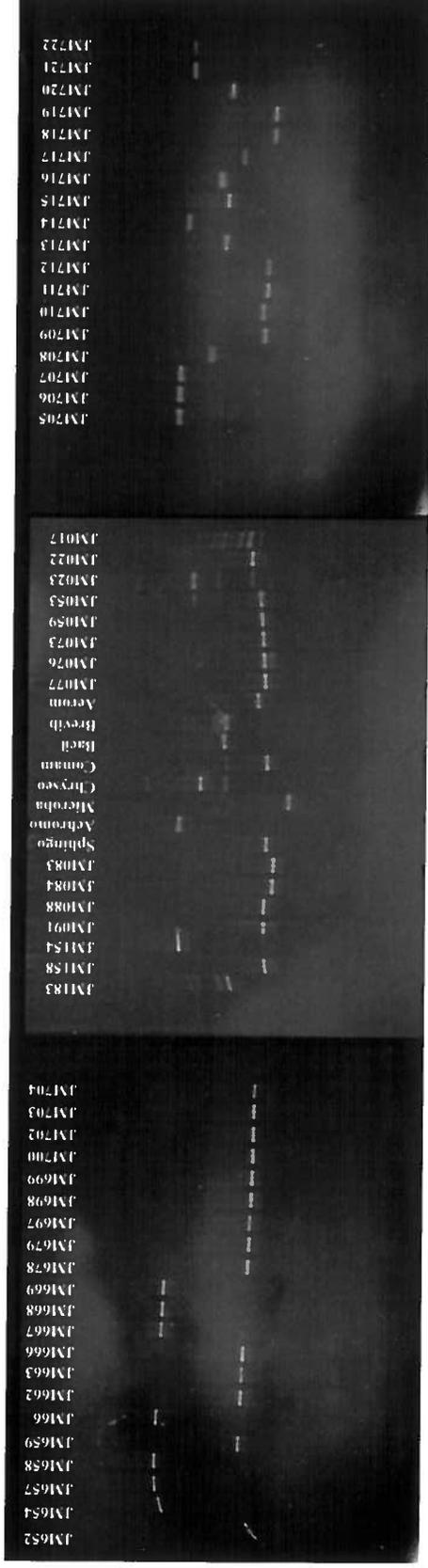
**Figure 20B. Profil PCR-DGGE des isolats obtenus après enrichissement.**

Des isolats déjà séquencés ont été utilisés à titre de comparaison. Parmi ceux-ci, il y a *Pseudochrobactrum* sp. kss (Pseudoc), *Brevibacillus brevis* (Brevib) et *Alcaligenes faecalis* (Alcalig). Les isolats sont les échantillons commençant par JM suivi d'un chiffre séquentiel. Le gradient utilisé pour ce gel fut de 30% à 60% et de 20 µL à 30 µL d'échantillon ont été chargé avec une équivalence pour le tampon de coloration.



**Figure 20C. Profil PCR-DGGE des isolats obtenus après enrichissement.**

Des isolats déjà séquencés ont été utilisés à titre de comparaison. Parmi ceux-ci, il y a *Pseudochrobacterium* sp. kss (Pseudoc), *Brevibacillus brevis* (Brevib), *Alcaligenes faecalis* (Alcalig), *Sphingomonas* sp. EZ41 (Sphingo), *Achromobacter* sp. P3 (Achromo), *Microbacterium oxydans* (Microba), *Chryseobacterium* sp. NX12 (Chryseo), *Comamonas* sp. N19-3 (Comam), *Aeromonas hydrophila* (Aerom) et *Bacillus* sp. C2(2008) (Bacil). Les isolats sont les échantillons commençant par JM suivi d'un chiffre séquentiel. Le gradient utilisé pour ce gel fut de 30% à 60% et de 20 µL à 30 µL d'échantillon ont été chargé avec une équivalence pour le tampon de coloration.

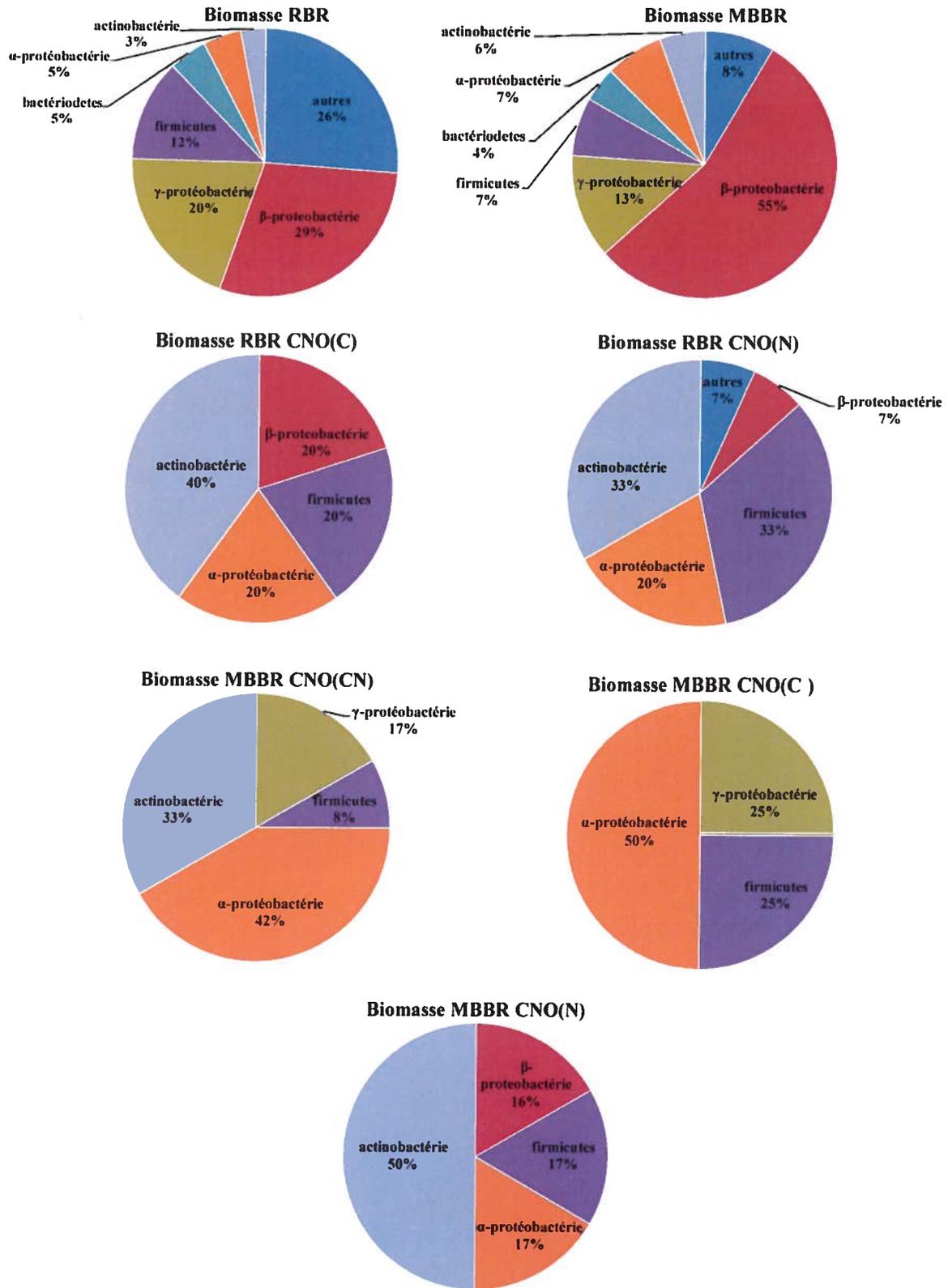


**Figure 20D. Profil PCR-DGGE des isolats obtenus après enrichissement.**

Des isolats déjà séquencés ont été utilisés à titre de comparaison. Parmi ceux-ci, il y a *Brevibacillus brevis* (Brevib), *Sphingomonas* sp. EZ41 (Spingo), *Achromobacter* sp. P3 (Achromo), *Microbacterium oxydans* (Microba), *Chryseobacterium* sp. NX12 (Chryseo), *Comamonas* sp. N19-3 (Comam), *Aeromonas hydrophila* (Aerom) et *Bacillus* sp. C2(2008) (Bacil). Les isolats sont les échantillons commençant par JM suivi d'un chiffre séquentiel. Le gradient utilisé pour ce gel fut de 30% à 60% et de 20  $\mu$ L à 30  $\mu$ L d'échantillon ont été chargé avec une équivalence pour le tampon de coloration.

Suite à ces analyses, le séquençage a été fait sur les isolats sélectionnés qui sont ceux ayant une bande dont la migration est différente des isolats déjà séquencés (*Brevibacillus brevis*, *Sphingomonas* sp. EZ41, *Achromobacter* sp. P3, *Microbacterium oxydans*, *Chryseobacterium* sp. NX12, *Comamonas* sp. N19-3, *Aeromonas hydrophila* et *Bacillus* sp. C2 (2008)). A la figure 21, les graphiques en secteurs représentent la distribution des microflores attribuable à chaque enrichissement. D'après ces données, les biomasses initiales sont plus diversifiées : on y retrouve des firmicutes, des actinobactéries, des bacteroidetes, des  $\alpha$ -  $\beta$ - et  $\gamma$ -protéobactéries. Pour les microflores des enrichissements, l'abondance des classes varie d'une microflore à l'autre mais les phylums et les classes demeurent les mêmes : les actinobactéries, les firmicutes, les  $\alpha$ - et  $\beta$ - protéobactéries.

En parallèle, l'identité des isolats a été regroupée par microflores. Les résultats proviennent soit du séquençage ou de la comparaison des bandes par DGGE. Les tableaux 7 à 11 en sont le résultat (annexe 3). Pour les tableaux 12 à 16 inclusivement, ce sont des enrichissements qui ont fonctionné mais qui n'ont pas été retenus pour la caractérisation (annexe 3). Cette identification a été commencée mais demeure partielle ; plusieurs isolats restent à être identifiés pour les enrichissements non retenus (isolats non présentés). Pour les enrichissements SCN(N) RBC et MBBR, aucun isolat n'a été obtenu puisque ces enrichissements n'ont pas fonctionné.



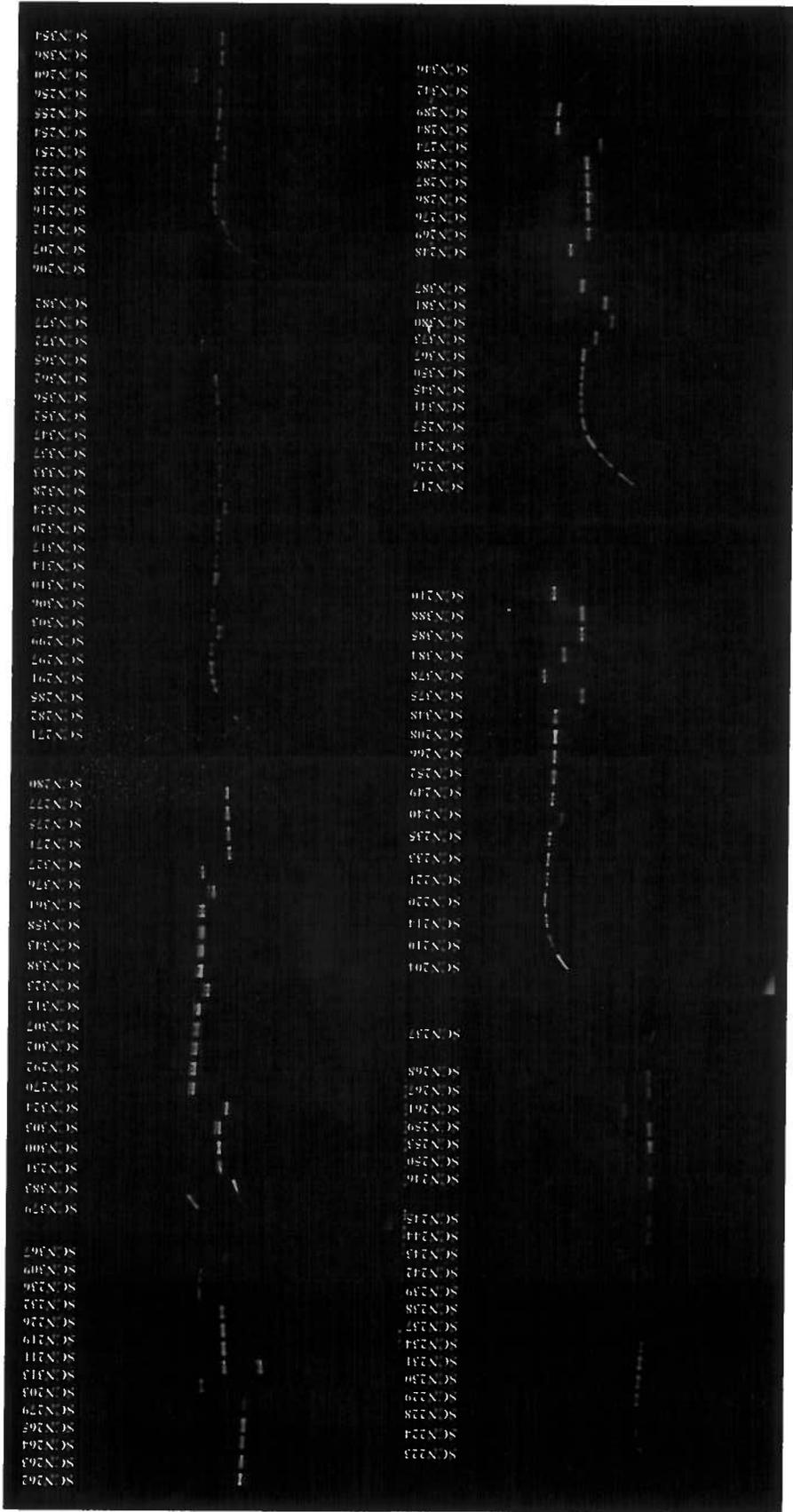
**Figure 21. Abondance et diversité bactérienne des biomasses d'origine, et des microflores des enrichissements.**

### 3.3 Analyse phylogénique des séquences provenant des génothèques 16S

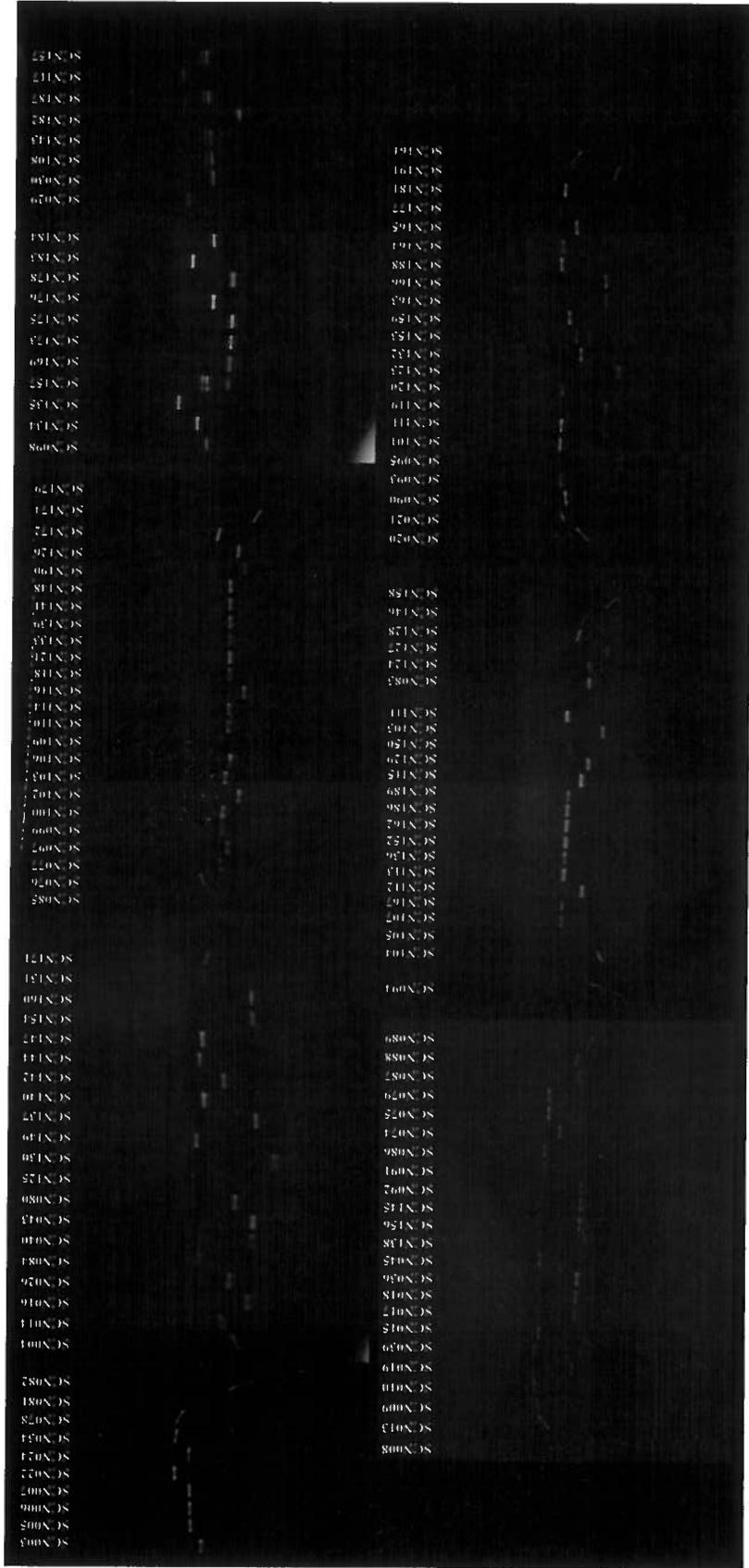
#### 3.3.1 Sélection des candidats par PCR-DGGE

Puisque le criblage de sélection effectuée avec les profils RFLP n'a pas été pleinement concluant pour les clones (données non présentées), le criblage de sélection par PCR-DGGE a été adopté une fois de plus. Une réaction PCR a été effectuée sur l'ADN plasmidique des clones pour cibler le gène de l'ADNr 16S avec les amorces 341f-GC et 534r. La figure 22 représente les profils obtenus par cette technique pour l'ensemble des clones de l'enrichissement SCN(CN) RBC. La figure 23 montre les profils des clones de l'enrichissement SCN(CN) MBBR, tandis que la figure 24 représente ceux de l'enrichissement CNO(CN) RBC. Il a été plus facile de comparer chaque clone par cette technique puisqu'il y a qu'une bande pour chaque profil et ainsi, des bandes aux mêmes niveaux de migration représentent des séquences identiques. Ainsi, le nombre de clones à séquencer est efficacement restreint. Finalement, un résumé des résultats obtenus selon les genres bactériens est présenté à la figure 25.

La diversité des génothèques est plus diversifiée que celle des isolats pour les enrichissements correspondants. L'observation la plus frappante est que la majorité des clones appartiennent à l'ordre des rhizobiales : *Methylobacterium* sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Afipia* sp., *Nitrobacter* sp., *Mesorhizobium* sp., *Oligotropha* sp., *Sinorhizobium* sp., et *Bosea* sp. Les clones dominants des enrichissements du SCN<sup>-</sup> sont *Oligotropha carboxidovorans* pour l'un et *Thiobacillus* sp. pour l'autre, mais aucun n'a été obtenu par isolement.

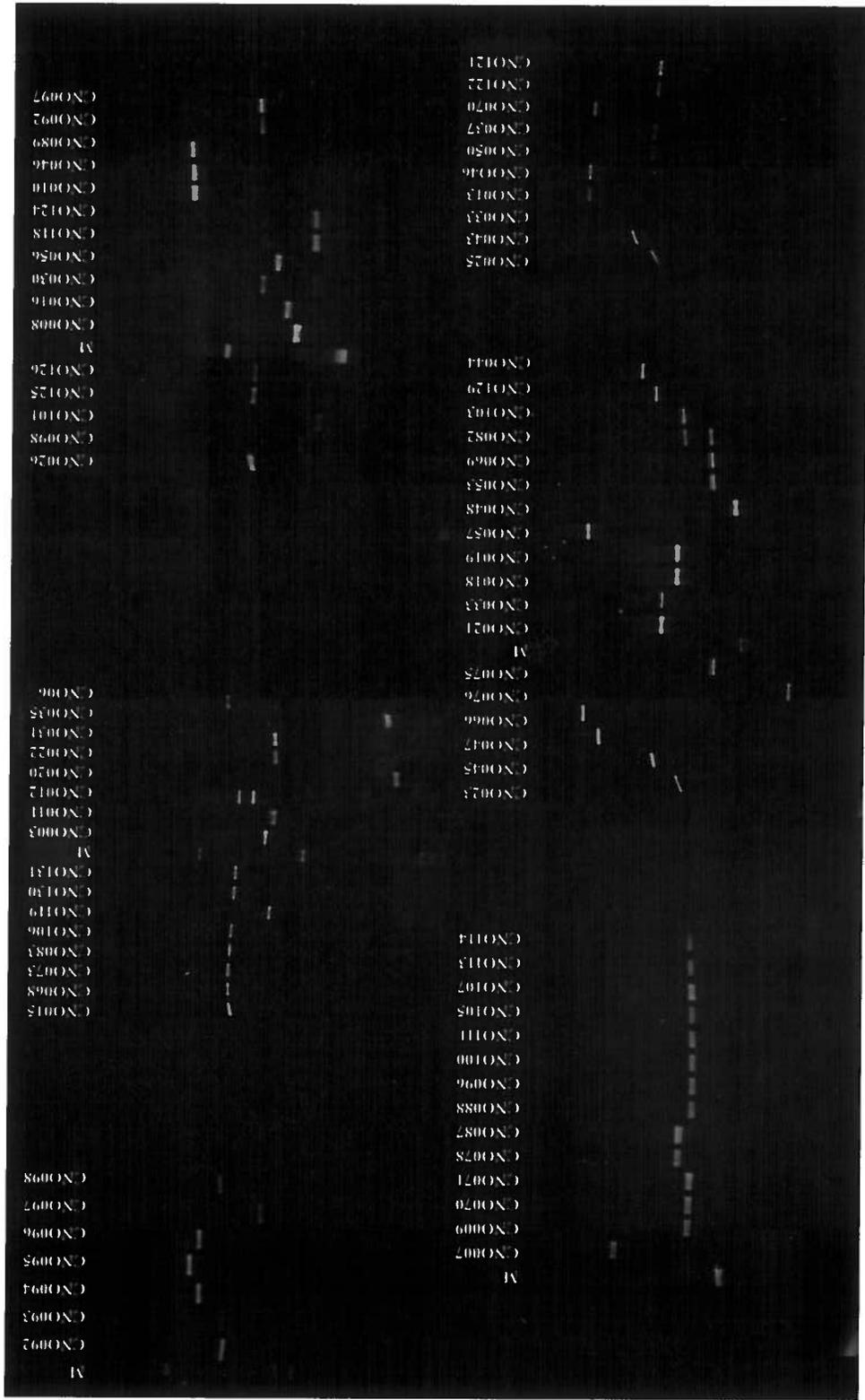


**Figure 22. Profil PCR-DGGE des clones provenant du RBC SCN(CN).**  
 Un marqueur maison a été utilisé à titre indicatif. Le gradient utilisé pour ce gel fut de 30% à 60% et de 20 µL à 30 µL d'échantillon ont été chargés avec une équivalence pour le tampon de coloration.

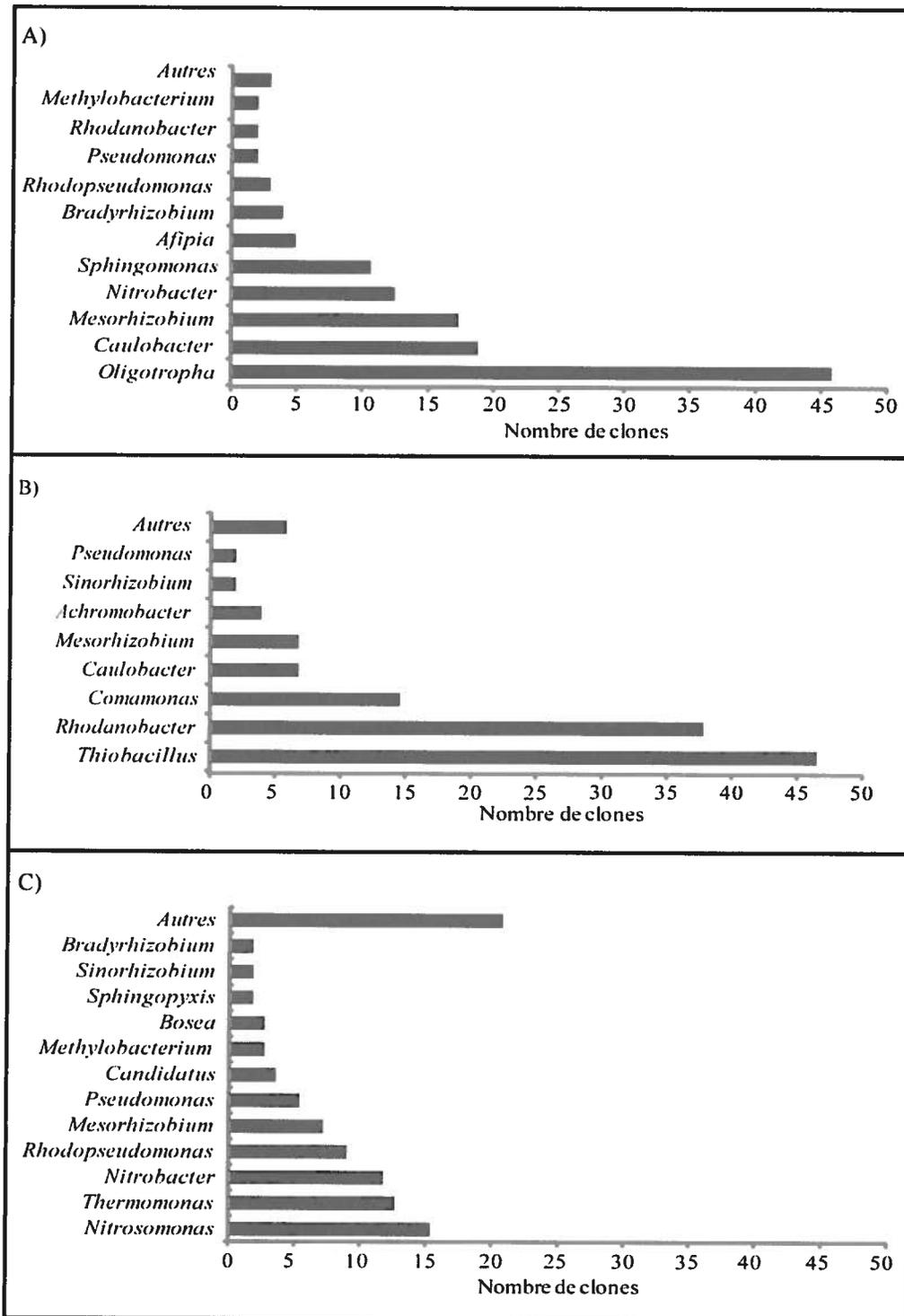


**Figure 23. Profil PCR-DGGE des clones provenant du MBBR SCN(CN).**

Un marqueur maison a été utilisé à titre indicatif. Le gradient utilisé pour ce gel fut de 30% à 60% et de 20 µL à 30 µL d'échantillon ont été chargé avec une équivalence pour le tampon de coloration.



**Figure 24. Profil PCR-DGGE des clones provenant du RBC CNO(CN).**  
 Un marqueur maison a été utilisé à titre indicatif. Le gradient utilisé pour ce gel fut de 30% à 60% et de 20  $\mu$ L à 30  $\mu$ L d'échantillon ont été chargé avec une équivalence pour le tampon de coloration.

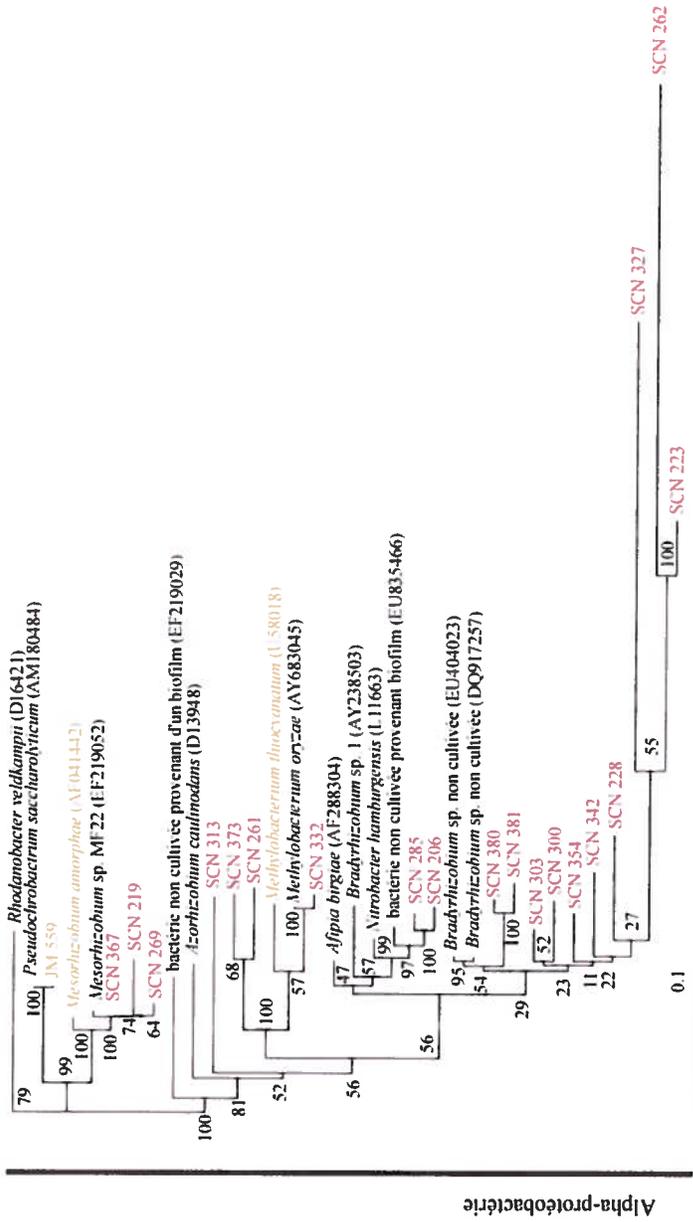


**Figure 25. Abondance et diversité des séquences du gène de l'ADNr 16S des géothèques.**

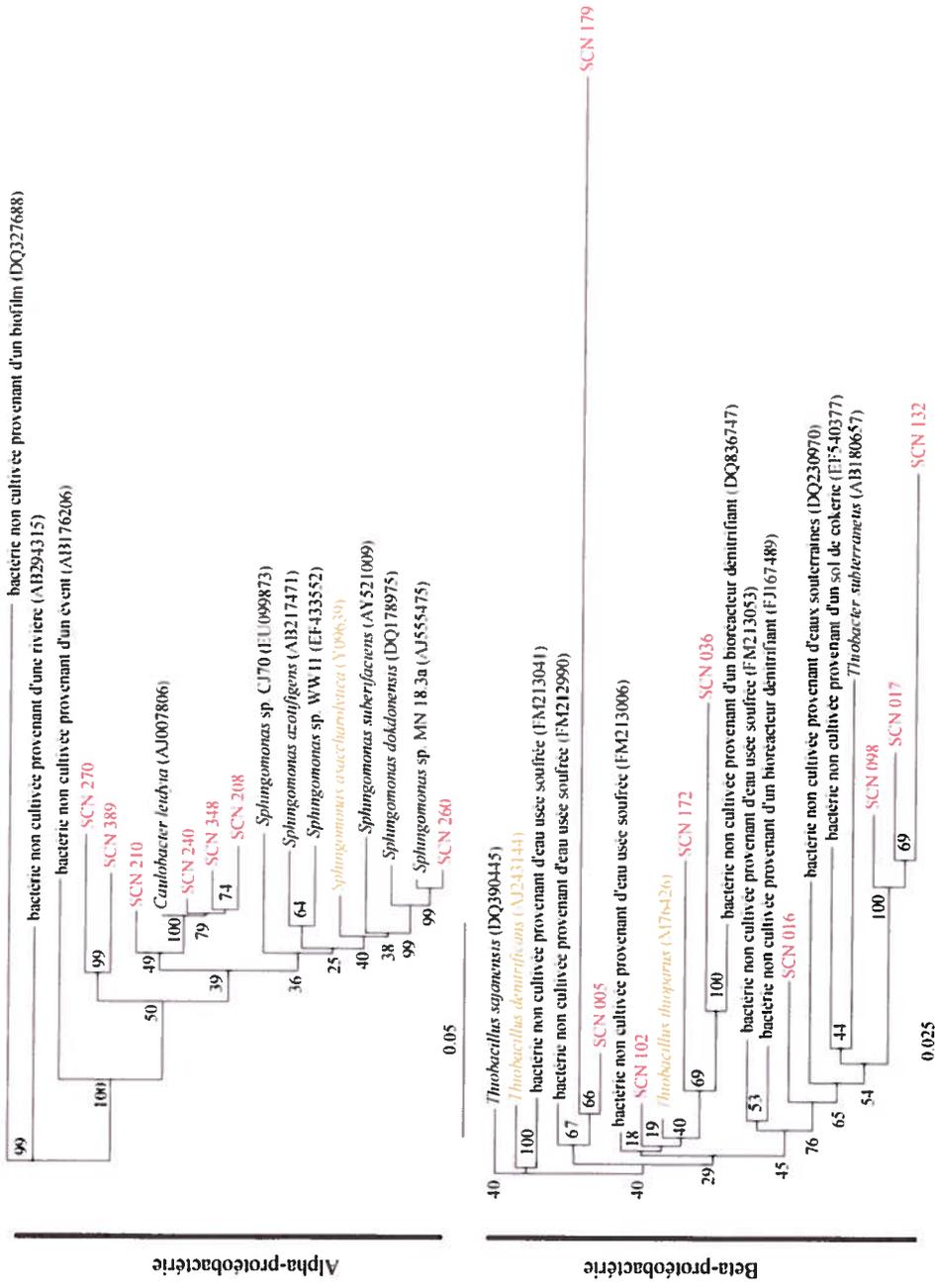
A) obtenus à partir de l'enrichment SCN(CN) RBC; B) obtenus à partir de l'enrichment SCN(CN) MBBR et; C) obtenus à partir de l'enrichment OCN(CN) RBC.

### 3.3.2 Analyse de la biodiversité par ARB

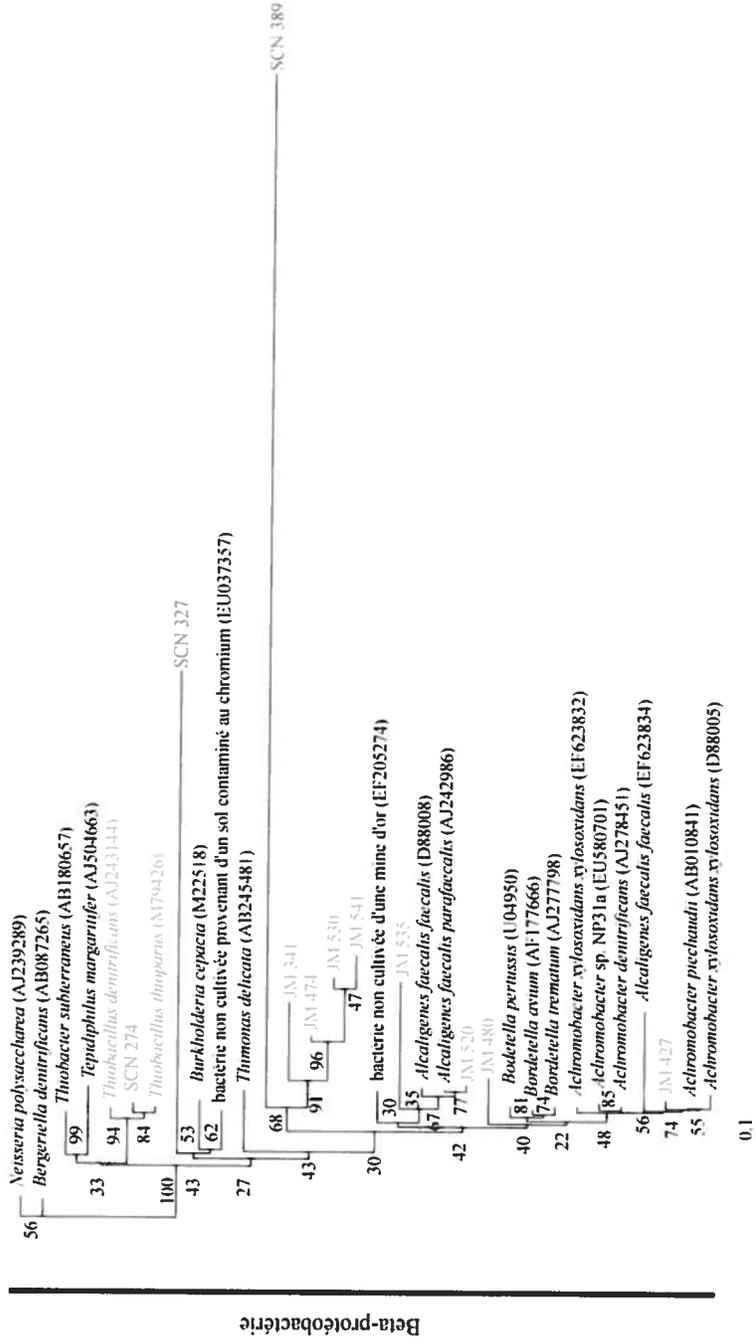
Une fois que toutes les données concernant les isolats et les clones pour les enrichissements SCN(CN) RBC, SCN(CN) MBBR et CNO(CN) RBC ont été récoltées, il fut possible de comparer la relation entre ces derniers par rapport aux bactéries connues. Pour ce faire, une analyse phylogénique a été faite avec le logiciel ARB ainsi qu'une analyse de distance Bootstrap (Ludwig *et al.* 2004). La figure 26 représente les embranchements de l'arbre l'ensemble de la population obtenue après l'enrichissement pour le SCN<sup>-</sup> utilisé pour source de carbone et d'azote provenant du RBC. La figure 27 illustre, quant à elle, la population microbienne obtenue après l'enrichissement pour le SCN<sup>-</sup> utilisé pour source de carbone et d'azote provenant du MBBR. Finalement, la figure 28 représente l'ensemble obtenu après l'enrichissement pour l'OCN<sup>-</sup> utilisé pour source de carbone et d'azote provenant du RBC. Puisque la qualité de certaines séquences et/ou leur longueur étaient faibles, certaines séquences n'ont pu être ajoutées aux arbres. Somme toute, cette vue d'ensemble des arbres générés permet de localiser les isolats et les clones pour les trois enrichissements retenus par rapport aux espèces bactériennes connues provenant d'environnements similaires présentant du SCN<sup>-</sup>, de l'OCN<sup>-</sup>, de biofilm et/ou provenant d'effluent minier. Les arbres permettent également de voir la relation entre isolats-isolats, clones-clones et isolats-clones pour les trois enrichissements. En dernier lieu, cette importante étape d'analyse permet d'affilier nos séquences (des isolats et des clones) à des espèces connues.



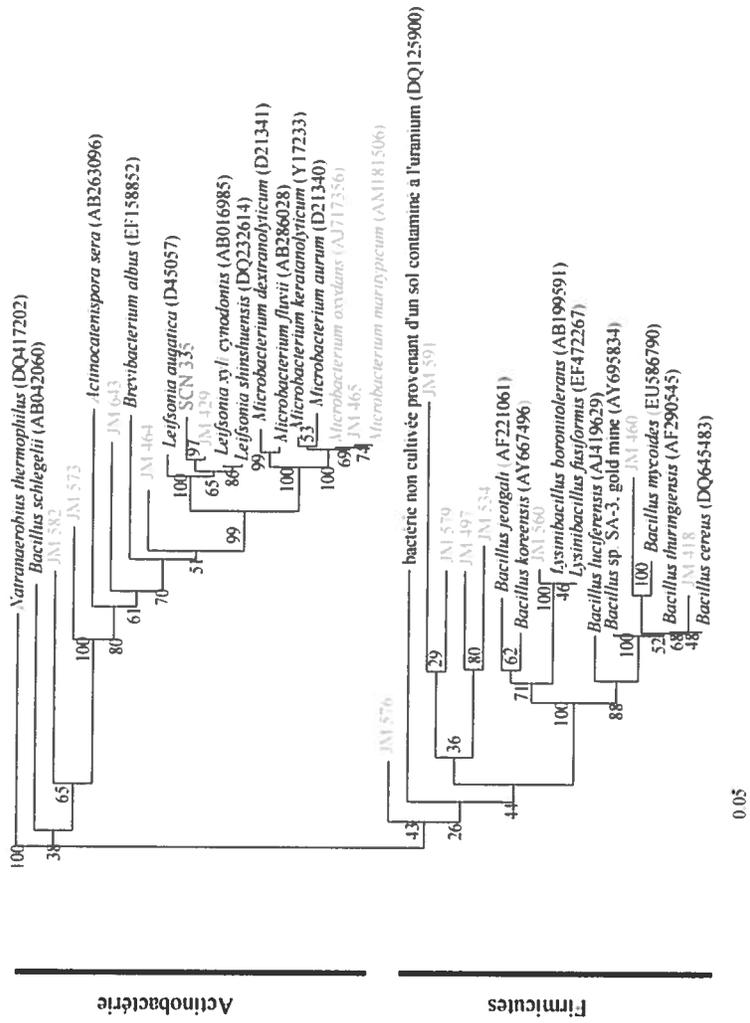
**Figure 26A. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) RBC pour les alpha-protéobactéries.** Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence de SCN\*.



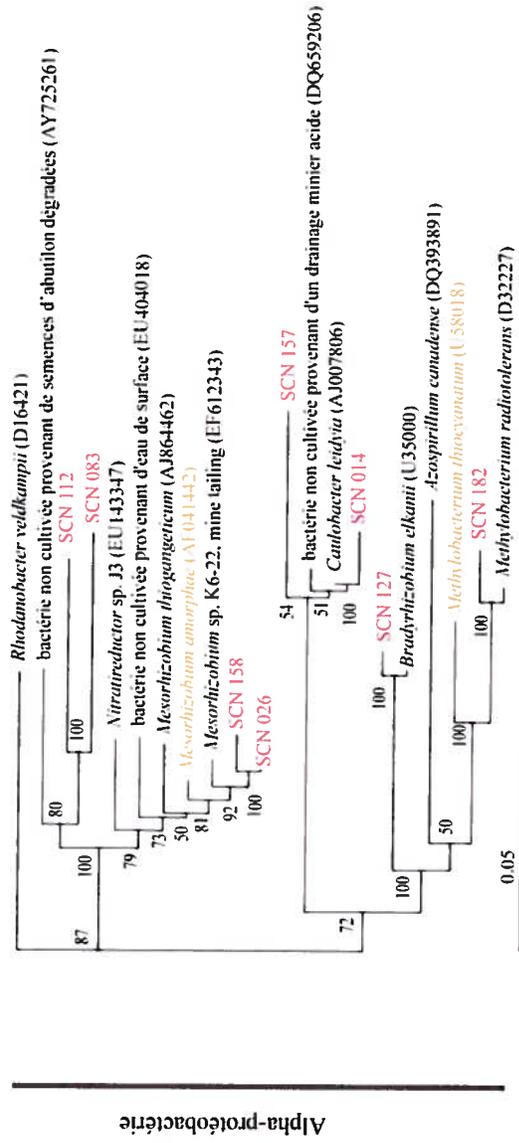
**Figure 26B. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) RBC pour les alpha et beta-protéobactéries.**  
 Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence de SCN.



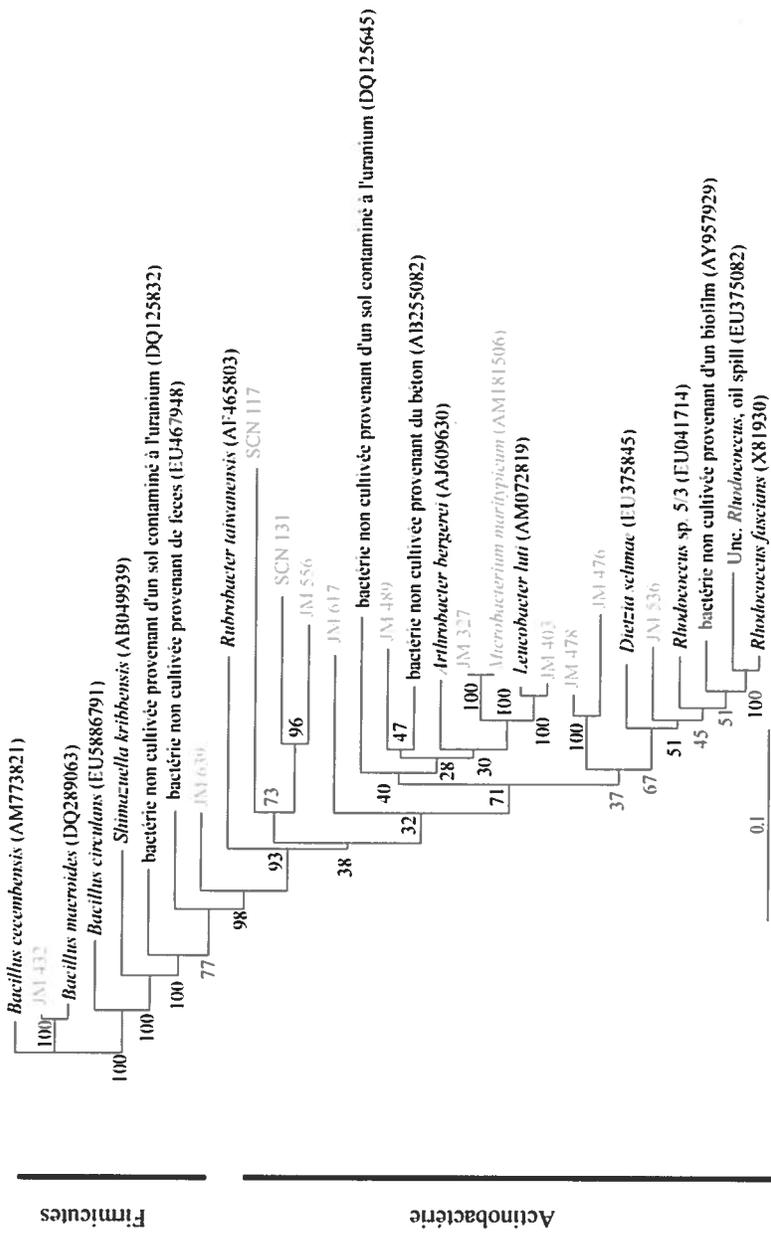
**Figure 26C. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) RBC pour les beta-protéobactéries.** Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence de SCN<sup>+</sup>.



**Figure 26D. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) RBC pour les actinobactéries et firmicutes.** Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence de SCN.

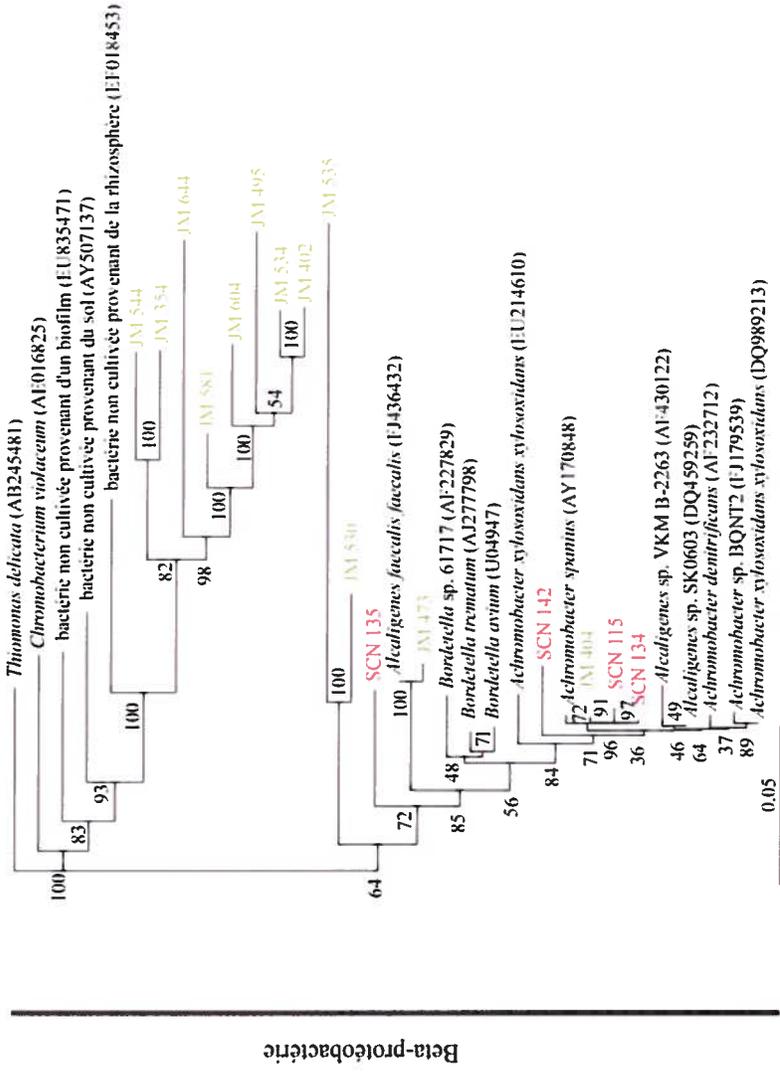


**Figure 27A. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) MBBR pour les alpha-protéobactéries.** Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence de SCN<sup>+</sup>.



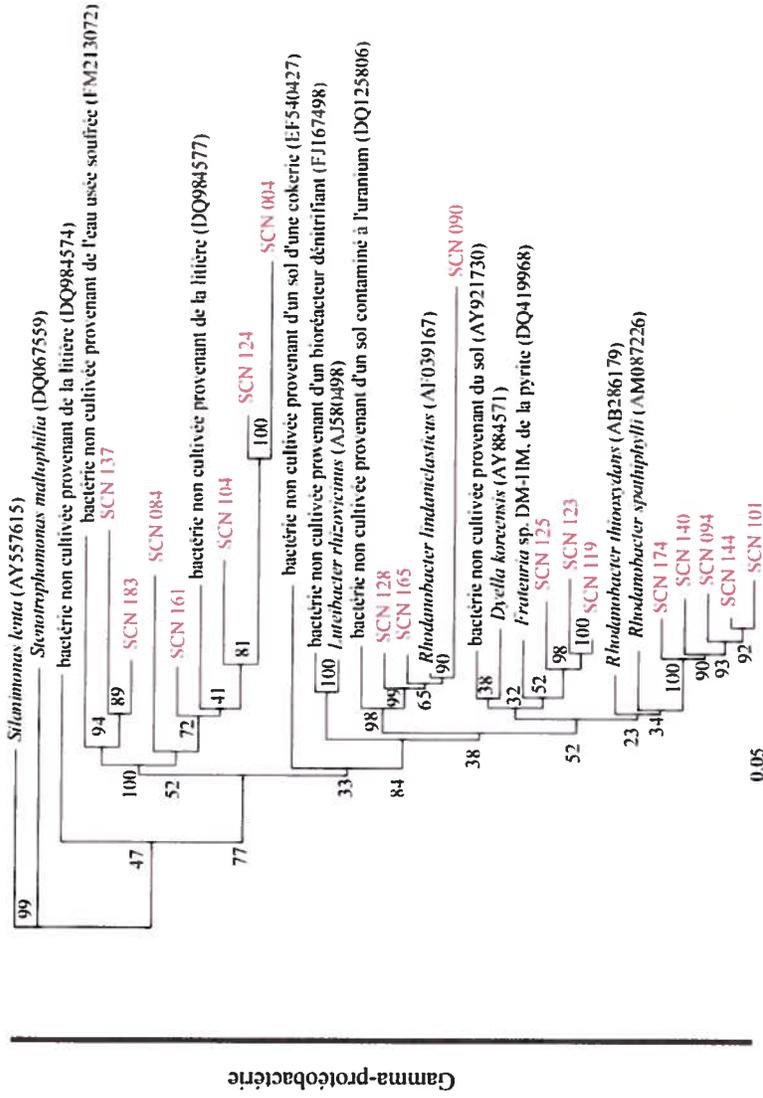
**Figure 27B. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) MBBR pour les firmicutes et les actinobactéries.**

Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence de SCN.

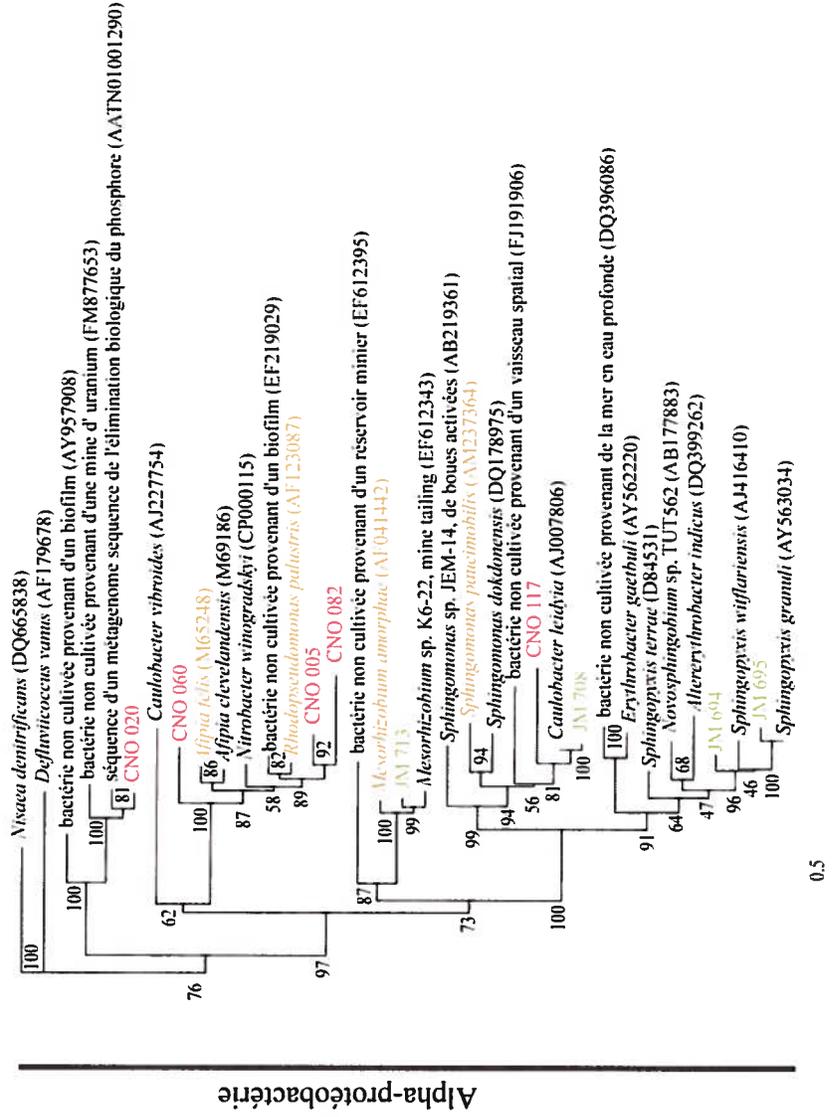


**Figure 27C. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) MBBR pour les beta-protéobactéries.**

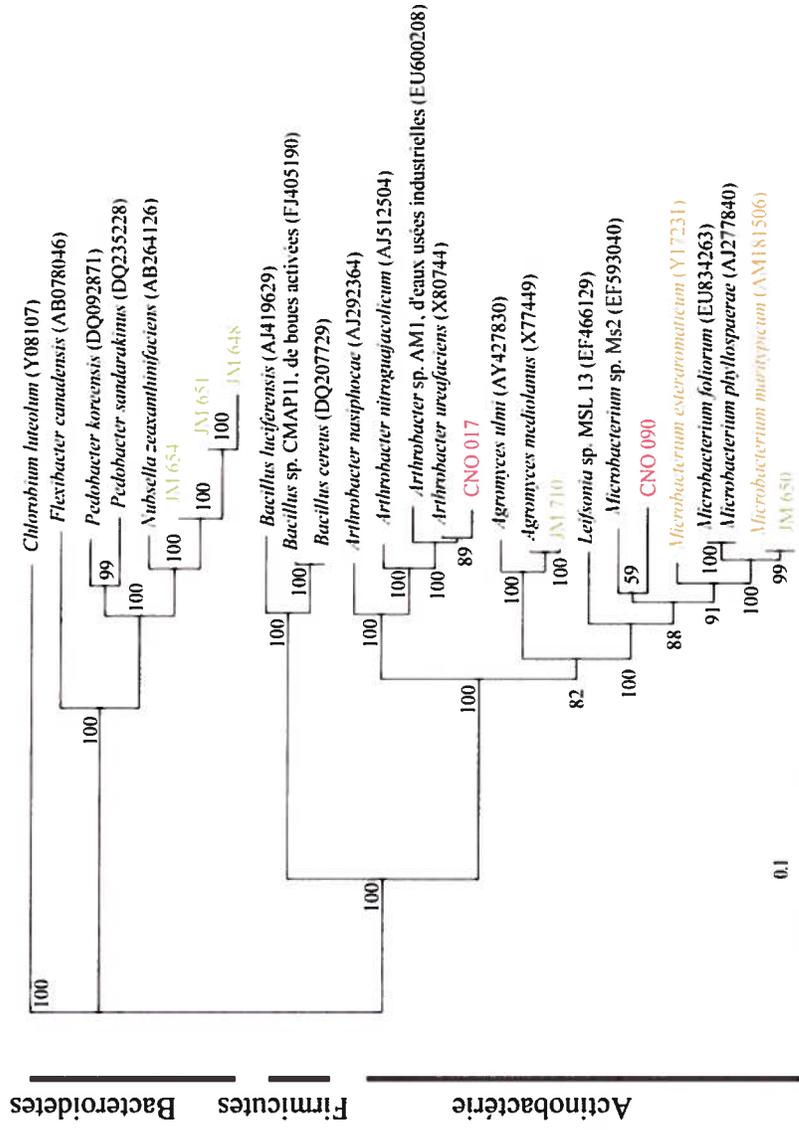
Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence de SCN.



**Figure 27D. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement SCN(CN) MBBR pour les classes gamma-protéobactéries.**  
 Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence de SCN.

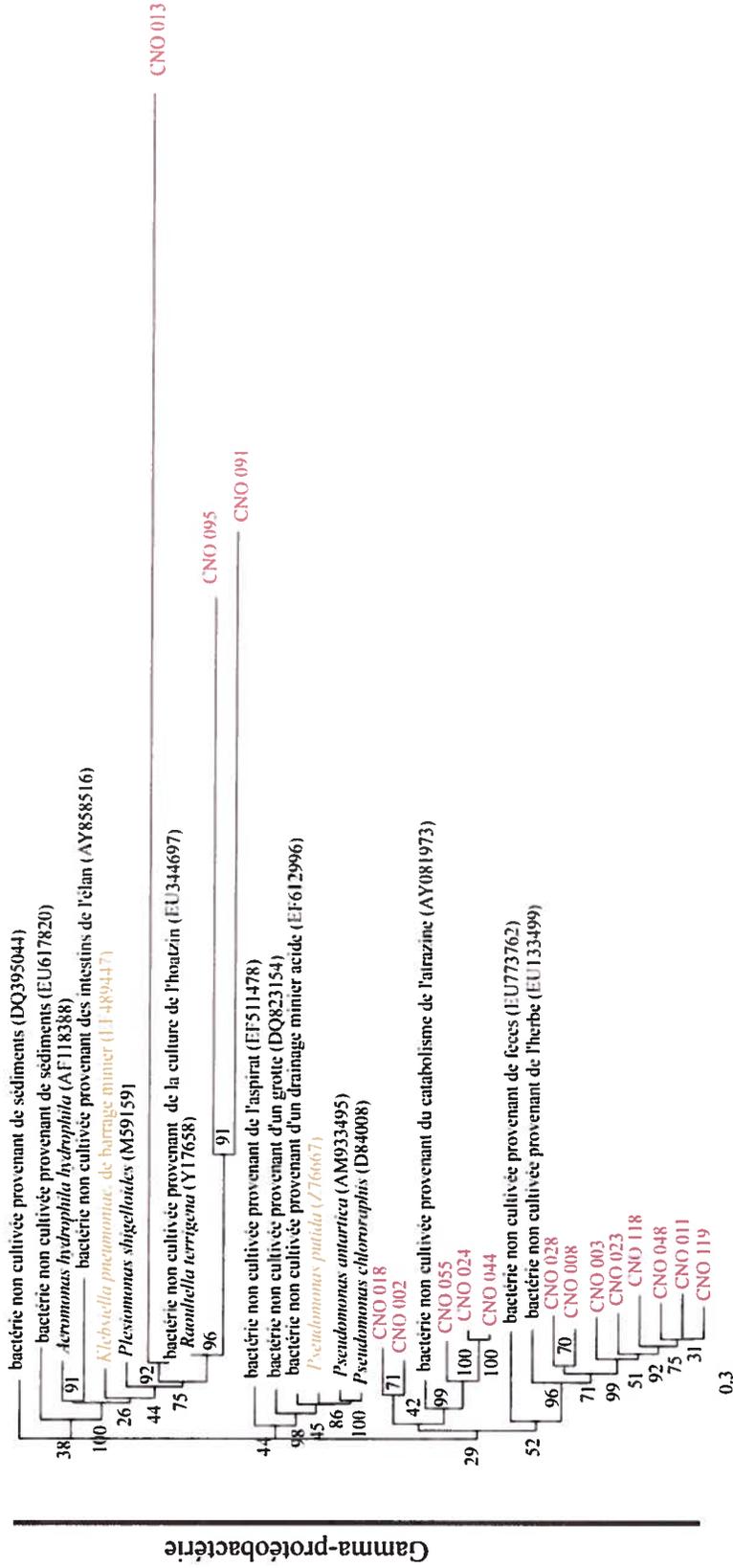


**Figure 28A. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement CNO(CN) RBC pour les alpha-protéobactéries.** Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence d'OCN<sup>-</sup>.

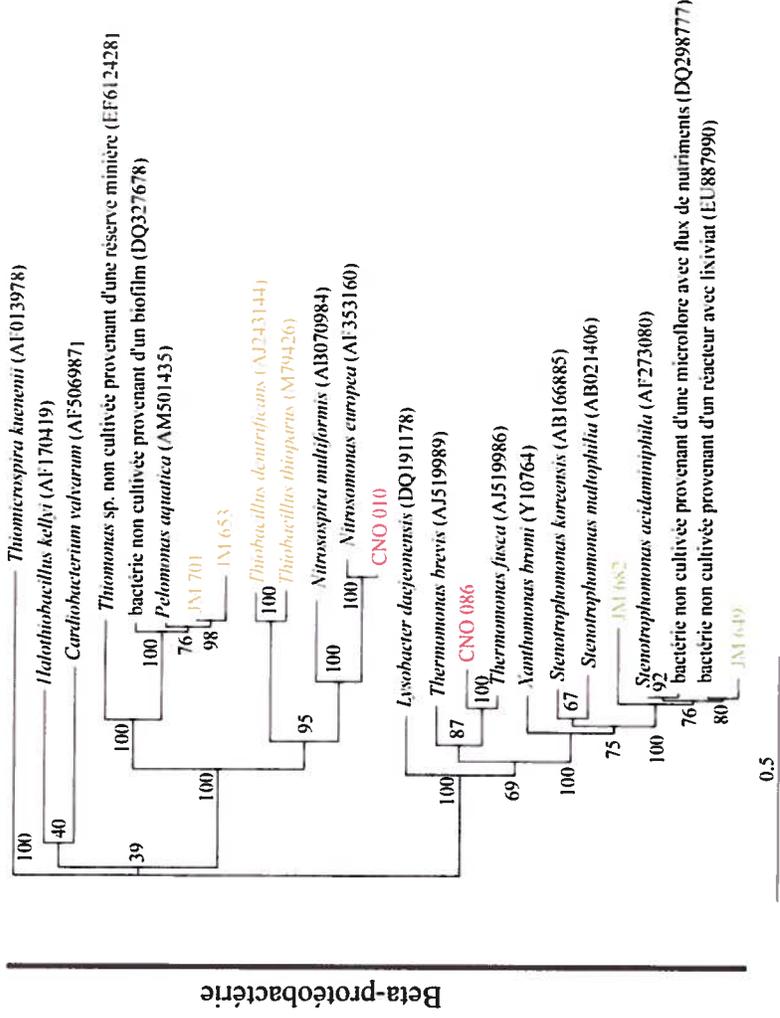


**Figure 28B. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement CNO(CN) RBC pour les bacteroidetes, les firmicutes et les actinobactéries.**

Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence d'OCN'.



**Figure 28C. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement CNO(CN) RBC pour les gamma-protéobactéries.** Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence d'OCN.

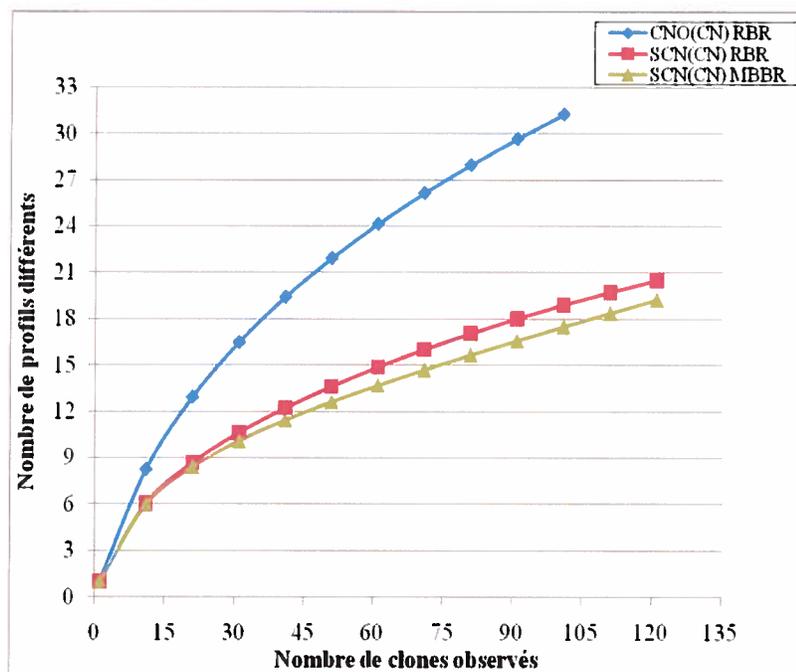


**Figure 28D. Analyse phylogénique de la population de l'enrichissement CNO(CN) RBC pour les beta-protéobactéries.**

Les caractères en rouge représentent les clones, en vert les isolats et en brunâtre les bactéries retrouvées dans des environnements similaires, c'est-à-dire des sites miniers avec et/ou présence d'OCN<sup>-</sup>.

### 3.3.3 Analyse de la biodiversité des clones par Biodiversity Pro

Afin de vérifier statistiquement si la biodiversité des clones atteint son maximum par rapport au nombre d'individus, deux valeurs ont été comparées soit le coefficient de Chao I et la courbe de raréfaction. Ces valeurs permettent de déterminer s'il y a assez de clones choisis pour représenter une population donnée en déterminant le nombre de profils qui diffère. Précisément, la courbe de raréfaction permet de prédire en quelque sorte le nombre d'espèces par rapport au nombre d'individu d'une population. Visuellement, lorsqu'il n'y a plus d'augmentation dans la courbe, le nombre maximum d'espèces est atteint. Des courbes ont été faites pour les enrichissements SCN(CN) RBC, SCN(CN) MBBR et CNO(CN) RBC à la figure 29. Pour l'indice Chao I, il permet d'établir une valeur au nombre d'espèces maximum se basant sur la taille d'une population. Pour l'enrichissement SCN(CN), RBC, l'indice Chao I est de 31.13 et celui de la courbe de raréfaction est d'environ 20. Pour l'enrichissement SCN(CN), MBBR, la valeur du Chao I est de 80.5 tandis que celle de la courbe de raréfaction est d'un peu moins que 20 (Fig. 29). Finalement, pour l'enrichissement CNO(CN), RBC, le coefficient Chao I est estimé à 64 tandis que la courbe de raréfaction estime la diversité entre 30 et 33.



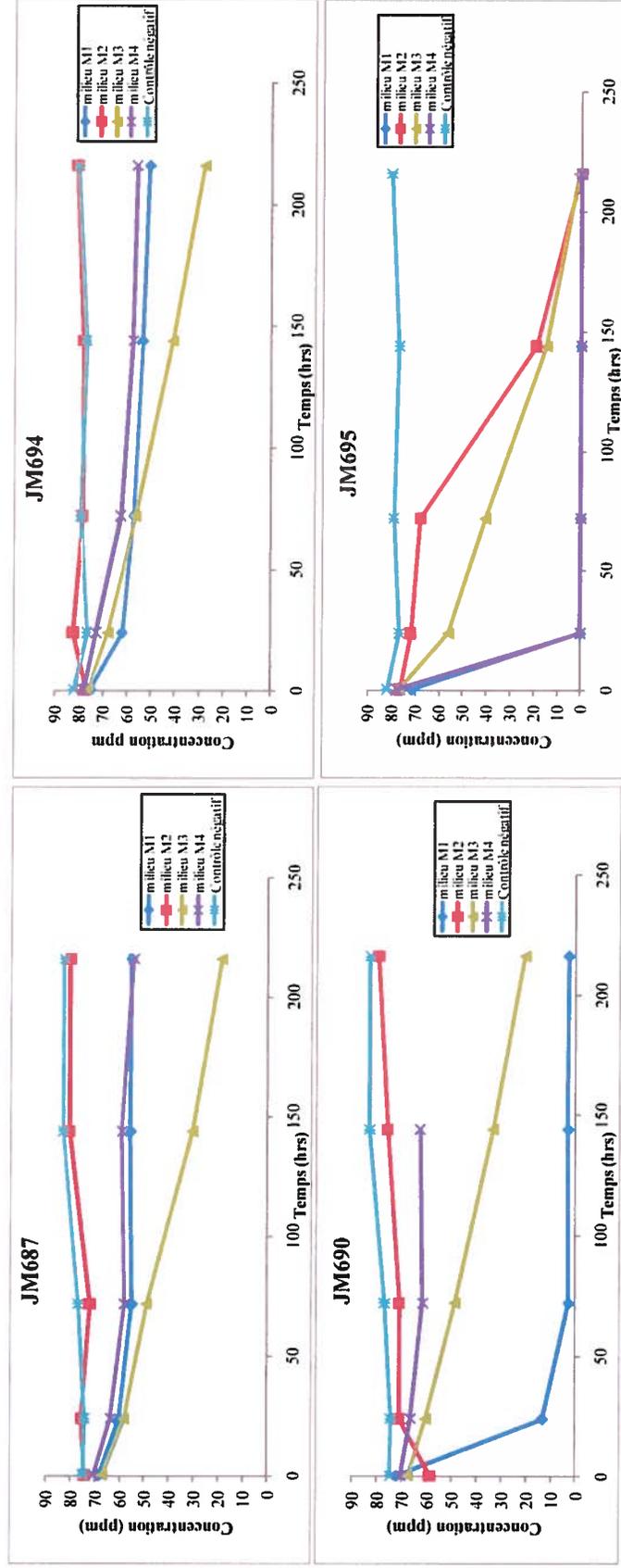
**Figure 29. Courbe de raréfaction des clones des enrichissements.** (CNO(CN) RBC (bleu), SCN(CN) RBC (rouge) et SCN(CN) MBBR (vert)).

### **3.4 Analyse de la biodégradation du $\text{SCN}^-$ et de l' $\text{OCN}^-$ par les isolats microbiens sélectionnés provenant des enrichissements CNO(CN) RBC, SCN(CN) RBC et SCN(CN) MBBR**

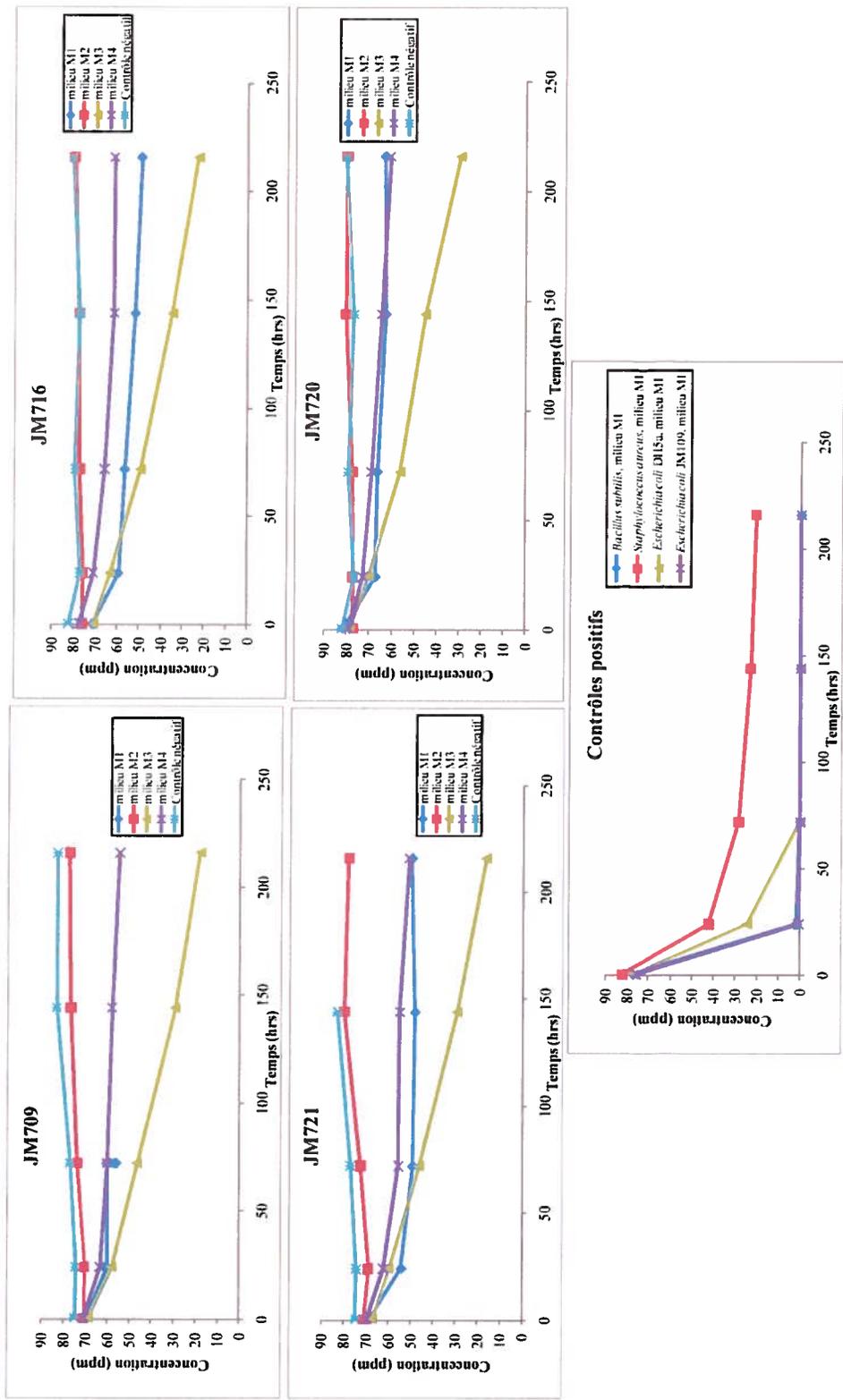
#### **3.4.1 Suivi de la dégradation des molécules par CLHP**

D'après l'ensemble des données sur la population CNO(CN) RBC, huit isolats ont été sélectionnés basé sur leur prévalence pour analyser leur capacité de dégrader individuellement l' $\text{OCN}^-$ . Quatre bouillons nutritifs ont été optimisés afin de vérifier cette capacité. Les milieux maisons M1, M2, M3 et M4 visent à déterminer si la bactérie sélectionnée dégrade la molécule (à dose de 75 ppm) pour source de carbone (M3), d'azote (M4), de carbone et d'azote (M2), ou sans restriction (M1). L'analyse a été faite par CHLP de la même façon que cité à la section 2.1.4. Ensuite, des courbes de cinétique ont pu être tracées pour chaque isolat choisi. Les résultats sont présentés à la figure 30. Chaque isolat testé pour l' $\text{OCN}^-$  est capable de le consommer dans l'un ou l'autre des milieux. De plus, des contrôles ont été faits avec les bactéries *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*. Dans tous les cas, l' $\text{OCN}^-$  peut être consommé pour source de carbone (M3). Pour l'isolat JM690, il peut également dégrader l' $\text{OCN}^-$  en présence de R2A (M1), plus rapidement que pour source de carbone (M3). Pour l'isolat JM695, il peut dégrader l' $\text{OCN}^-$  plus rapidement pour source d'azote (M4) que pour source de carbone (M3). Ce sont ces deux isolats qui sont les plus intéressants puisqu'ils peuvent dégrader l' $\text{OCN}^-$  dans plus d'une condition.

D'après l'ensemble des données sur les populations SCN(CN) RBC et SCN(CN) MBBR, neuf isolats ont été sélectionnés basé sur leur abondance pour analyser leur capacité de dégrader individuellement le  $\text{SCN}^-$ . Les quatre mêmes bouillons nutritifs ont été utilisés à l'exception que l' $\text{OCN}^-$  a été remplacé par le  $\text{SCN}^-$  (à 600 ppm). Les résultats sont présentés à la figure 31. Malheureusement, aucun isolat sélectionné n'a été capable d'utiliser le  $\text{SCN}^-$  dans les conditions testées.

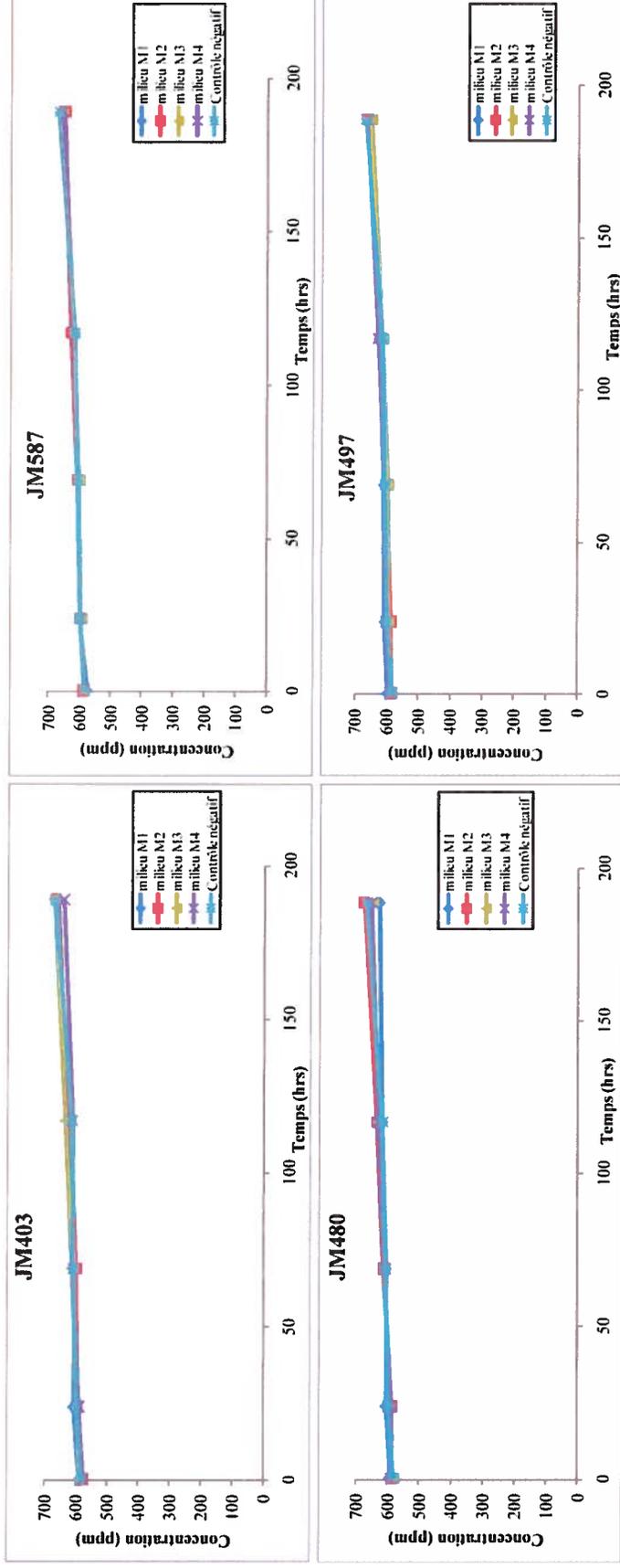


**Figure 30A. Dégradation de l'OCN<sup>-</sup> par des isolats obtenus après enrichissement CNO(CN) RBC.** Les courbes bleues représentent le milieu M1 (R2A et 75ppm OCN<sup>-</sup>) ; en rouge le milieu M2 (affluent synthétique et solution vitamines de Wolfe et 75 ppm OCN<sup>-</sup>) ; en vert, le milieu M3 (affluent synthétique, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et solution vitamines de Wolfe et 75 ppm OCN<sup>-</sup>) ; en violet, le milieu M4 (affluent synthétique, solution vitamines de Wolfe, solution d'extrait de levure et d'acétate de sodium et 75 ppm OCN<sup>-</sup>) et ; en bleu clair, le témoin. Les fioles ont été incubées à 200 rpm à température pièce (voir section 2.5).



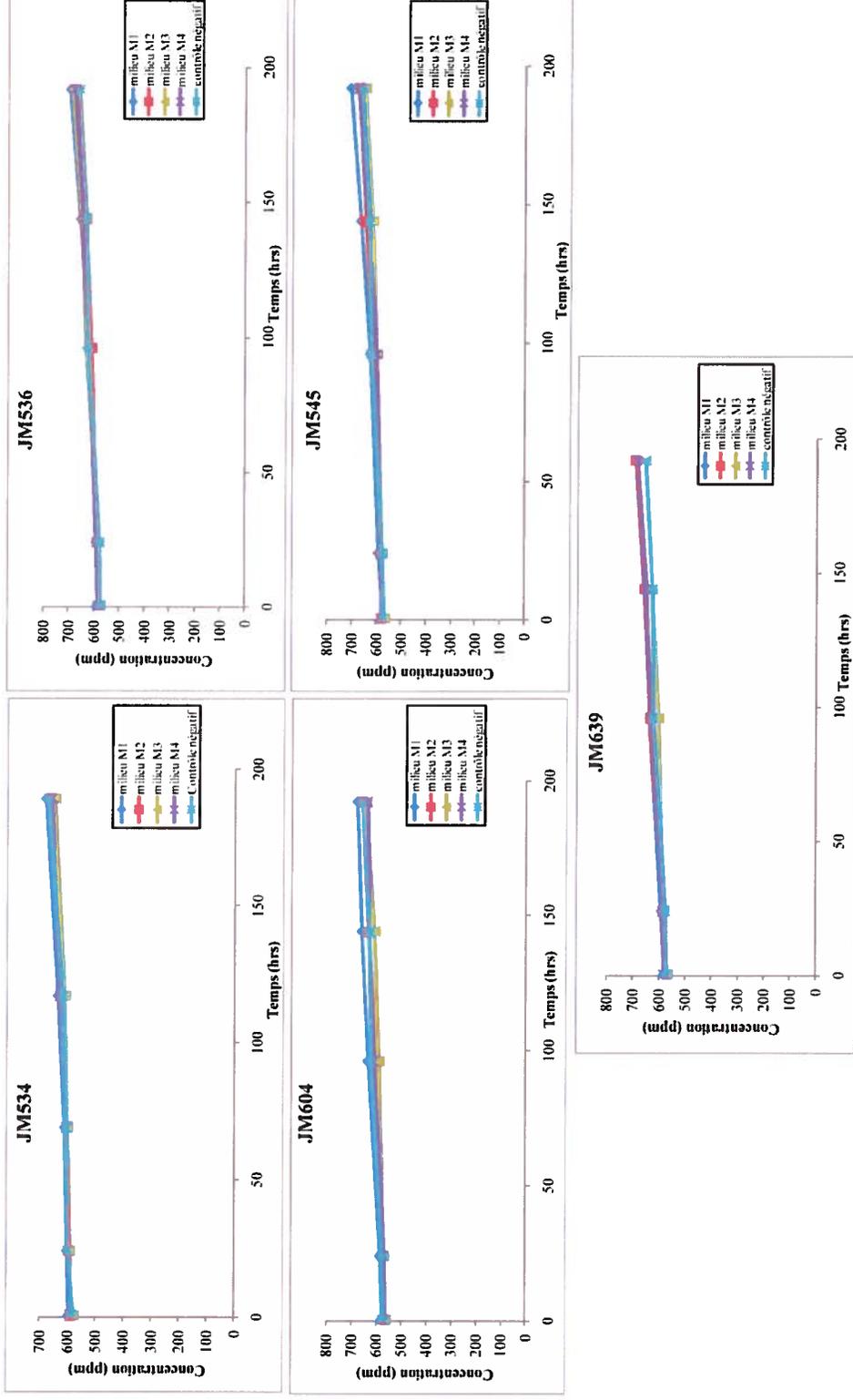
**Figure 30B. Dégradation de l'OCN<sup>-</sup> par des isolats obtenus après enrichissement CNO(CN) RBC.**

Les courbes bleues représentent le milieu M1 (R2A et 75ppm OCN<sup>-</sup>) ; en rouge le milieu M2 (affluent synthétique et solution vitamines de Wolfe et 75 ppm OCN<sup>-</sup>) ; en vert, le milieu M3 (affluent synthétique, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et solution vitamines de Wolfe et 75 ppm OCN<sup>-</sup>) ; en violet, le milieu M4 (affluent synthétique, solution vitamines de Wolfe, solution d'extrait de levure et d'acétate de sodium et 75 ppm OCN<sup>-</sup>) et ; en bleu clair, le témoin. Les fioles ont été incubées à 200 rpm à température pièce (voir section 2.5).



**Figure 31B. Dégradation du SCN<sup>-</sup> par des isolats obtenus après enrichissement.**

Les courbes bleues représentent le milieu M1 (R2A et 600 ppm SCN<sup>-</sup>) ; en rouge le milieu M2 (affluent synthétique et solution vitamines de Wolfe et 600 ppm SCN<sup>-</sup>) ; en vert, le milieu M3 (affluent synthétique, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et solution vitamines de Wolfe et 600 ppm SCN<sup>-</sup>) ; en violet, le milieu M4 (affluent synthétique, solution vitamines de Wolfe, solution d'extrait de levure et d'acétate de sodium et 600 ppm SCN<sup>-</sup>) et ; en bleu clair, le témoin. Les flasques ont été incubés à 200 rpm à température pièce (voir section 2.5).



**Figure 31B. Dégradation du SCN- par des isolats obtenus après enrichissement.**

Les courbes bleues représentent le milieu M1 (R2A et 600 ppm SCN<sup>-</sup>) ; en rouge le milieu M2 (affluent synthétique et solution vitamines de Wolfe et 600 ppm SCN<sup>-</sup>) ; en vert, le milieu M3 (affluent synthétique, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et solution vitamines de Wolfe et 600 ppm SCN<sup>-</sup>) ; en violet, le milieu M4 (affluent synthétique, solution vitamines de Wolfe, solution d'extrait de levure et d'acétate de sodium et 600 ppm SCN<sup>-</sup>) et ; en bleu clair, le témoin. Les flasks ont été incubés à 200 rpm à température pièce (voir section 2.5).

## 4. Discussion

### 4.1 Enrichissement

Dans ce projet sur l'étude de la biomasse du biotraitement minier et des enrichissements contenant du  $\text{SCN}^-$  et de  $\text{l'OCN}^-$ , des consortiums ont été enrichis dans différentes conditions nutritionnelles. A partir des biomasses collectées à la mine, huit enrichissements sur douze ont fonctionné, c'est-à-dire que ces huit microflores peuvent dégrader le  $\text{SCN}^-$  ou  $\text{l'OCN}^-$  dans les conditions représentant l'environnement du biotraitement de l'effluent minier. Au total, deux enrichissements ont été efficaces pour la consommation du  $\text{SCN}^-$  ( $\text{SCN}(\text{CN})$  RBC et  $\text{SCN}(\text{CN})$  MBBR) à 600 ppm et tous les six enrichissements de  $\text{l'OCN}^-$  ( $\text{CNO}(\text{CN})$   $\text{CNO}(\text{C})$  et  $\text{CNO}(\text{N})$ ) à 75 ppm ont fonctionnés. Tous ces enrichissements se sont comportés différemment en ce qui concerne les temps d'enrichissements, même ceux dont la différence n'était qu'au niveau des sources d'ensemencements (RBC vs MBBR) ce qui veut dire que chacun était unique et enrichi différemment. Seuls les enrichissements  $\text{SCN}(\text{CN})$  RBC,  $\text{SCN}(\text{CN})$  MBBR et  $\text{CNO}(\text{CN})$  RBC ont été gardés pour être caractériser à l'aide des techniques biomoléculaires et par isolement parce qu'ils sont plus d'intérêts, c'est-à-dire qu'ils utilisent les deux éléments, le carbone et l'azote, et qu'ils sont plus rare au niveau de la littérature. Bref, ces trois enrichissements pouvaient apporter de nouvelles informations scientifiques sur l'utilisation bactérienne de ces molécules.

En présence d'une source externe d'azote, soit le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et lorsque le  $\text{SCN}^-$  est utilisé pour source de carbone seulement, la consommation de ce dernier est difficile et l'efficacité des enrichissements est diminuée. Autrement dit, avec les biomasses initiales, il y avait consommation du  $\text{SCN}^-$ , mais qu'ensuite, les microflores restantes n'étaient plus capables de dégrader la molécule. Ce phénomène peut être expliqué par une microflore pas assez nombreuse, spécialisée et/ou affaiblie par une trop grande dose de  $\text{SCN}^-$  afin de pouvoir le dégrader. Il en demeure toutefois que le comportement biologique des microflores, surtout à leur implantation, est difficile à installer et difficile à prédire. Il est possible que la source d'azote ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) soit difficilement assimilable pour les bactéries de ces microflores. Il en va du même concept pour le carbone. Dans les

enrichissements SCN(N), une source externe de carbone a été ajoutée, soit un mélange d'acétate et d'extrait de levure. Il est possible que ce mélange favorise la croissance de bactéries non spécifiques et qui n'ont aucun lien avec la consommation de notre molécule puisque ce sont des sources de carbone facilement assimilables. Dans les enrichissements dont la source de carbone et d'azote proviennent du SCN<sup>-</sup>, étonnamment, les microorganismes peuvent consommer la molécule. Logiquement, nous nous attendions à ce que la consommation soit plus facile lorsque l'azote et le carbone étaient séparés, mais c'est le contraire qui s'est produit. Pour l'enrichissement SCN(CN) RBC, une stabilité dans le rythme de consommation de la molécule a été observée après quatre transferts. A ce moment, la microflore était capable de consommer 600 ppm de SCN<sup>-</sup> en 120 heures. Quant à l'enrichissement SCN(CN) MBBR, 600 ppm était complétée en 168 heures. Ces résultats sont difficilement comparables avec la littérature puisque les conditions d'enrichissements sont différentes (ie. pH alcalin, salinité et présence de phénol) (Sorokin *et al.* 2004; Felfoldi *et al.* 2010). Les données dans la littérature stipulent que le SCN<sup>-</sup> peut être consommable à concentration entre 240 ppm pour 24h et 7000 ppm pour 36h (Boucabeille *et al.* 1994; du Plessis *et al.* 2001; Jeong et Chung 2006; Jeong *et al.* 2005; Karavaiko *et al.* 2000; Lee *et al.* 2008; Paruchuri *et al.* 1990; Grigor'eva *et al.* 1999). Nos microflores se retrouvent donc dans cette gamme de concentrations, mais présentement, aucun cas similaire n'a été rapporté dans la littérature, soit la dégradation du SCN<sup>-</sup> sans ajout de carbone ni d'azote provenant de l'effluent minier.

Pour les enrichissements à l'OCN<sup>-</sup>, les six microflores ont utilisé la molécule autant pour source de carbone et/ou d'azote. L'assimilation semble facile à concentration de 75 ppm pour les enrichissements CNO(N). L'enrichissement CNO(N) MBBR suggère que l'assimilation de l'OCN<sup>-</sup> pour source d'azote semble être la plus facile, selon la vitesse de consommation, soit 72h pour dégrader 75 ppm. Pour les deux enrichissements de CNO(C), la molécule est relativement bien assimilée, mais est un peu plus lente à comparer des enrichissements CNO(N). Ces résultats sont toutefois logiques puisqu'un des produits de dégradation de l'OCN<sup>-</sup>, à l'occurrence l'ammonium, est connu pour être facilement assimilable. Pour les enrichissements où les sources de carbone et d'azote sont combinées (CNO(CN)), la consommation est relativement lente tout comme la croissance

microbienne. Les conditions nutritives de ces dernières sont plus restrictives et donc les bactéries prennent plus de temps à croître, puisque l'OCN<sup>-</sup> est vraisemblablement plus difficiles à assimiler que de l'extrait de levure avec l'acétate ou l'ammonium. Il en va de même pour les enrichissements SCN(CN). Il serait possible d'expliquer la faible persistance de l'OCN<sup>-</sup> à comparer du SCN<sup>-</sup> puisqu'il tend à s'hydrolyser peut-être même spontanément (Boening et Chew 1999; Hung et Pavlostathis 1997). De plus, la biodégradation de l'OCN<sup>-</sup> est bien connue; elle est retrouvée chez plusieurs plantes et bactéries (Anderson *et al.* 1990; Sung et Fuchs 1988). La cyanase, l'enzyme connue de la voie de dégradation du cyanate et qui pourrait être également impliquée dans nos enrichissements, est retrouvée chez plusieurs espèces et sa grande distribution chez les bactéries pourrait expliquer en partie les résultats de ce projet (Sung et Fuchs 1988; Anderson *et al.* 1990). Quant aux études de biodégradation de l'OCN<sup>-</sup>, il existe beaucoup d'informations sur la biodégradation et de la voie de dégradation, mais très peu en consortium et dans les rejets miniers.

Basée sur la littérature, on pouvait s'attendre à une meilleure dégradation en termes de nombre d'espèces pouvant dégrader le SCN<sup>-</sup> et l'OCN<sup>-</sup>. En effet, ce qui est le plus documenté dans la littérature est axé sur la dégradation du SCN<sup>-</sup> en culture pure utilisé pour source de soufre, d'énergie, mais surtout d'azote. Pour l'OCN<sup>-</sup>, c'est surtout pour sa source d'azote que les recherches ont été effectuées (Stratford *et al.* 1994; Wood *et al.* 1998). Parmi les produits de dégradation de l'OCN<sup>-</sup>, notons que l'azote sous forme d'ammonium est majoritaire et que cette forme d'azote est facilement assimilable pour plusieurs espèces, ce qui explique la grand quantité d'information disponible sur le sujet.

Au niveau technique, la méthode d'analyse ionique au Dionex® demande plus de 45 min par échantillon et donc son utilisation ne peut pas être en continu. Les analyses ont donc été effectuées sur une base hebdomadaire. Le suivi était parfois difficile car l'estimation de la vitesse de dégradation au début des enrichissements n'était pas nécessairement représentative après un passage ou même quelques jours plus tard. Donc, dans les premiers temps, certains enrichissements pouvaient être en carence de nutriments, tandis que d'autres recevaient une dose supplémentaire sans en nécessité. Par

exemple, des carences ont été observées dans les enrichissements CNO(N) et à l'opposé, des surdoses ont été notées au deuxième passage des enrichissements au SCN(C) MBBR et SCN(CN) MBBR. Quoique l'analyse par CLHP soit l'option la plus efficace, une alternative aurait été d'utiliser des méthodes colorimétriques pour effectuer les dosages autant pour l'OCN<sup>-</sup> que pour le SCN<sup>-</sup> (Greenberg *et al.* 1995). D'un autre côté, la limite de détection serait grandement réduite avec les méthodes colorimétriques (Brown et Morra 1991; ASTM 1994).

Quelques obstacles sont également survenus lors de la quantification de la croissance. La méthode privilégiée au moment des expériences était le dosage des protéines par Bradford puisqu'il y avait la formation d'agrégats et une seule mesure de la turbidité des enrichissements n'aurait pas été représentative. Cependant, après l'analyse globale des résultats, ce dosage n'était pas assez sensible pour quantifier la microflore de des enrichissements. Donc, les valeurs obtenues n'ont pas été prises en compte pour tirer de conclusions sur la croissance des microflore des enrichissements. Il en va de même pour la quantification par le poids sec (dry weight) qui a été utilisée notamment lors des tests finaux de biodégradation des isolats; les valeurs obtenues n'ont pas été prises en compte puisque la méthode n'était pas assez sensible pour nos tests (voir section 4.4).

Au niveau de l'évolution dans le temps de microbienne des microflore, les profils PCR-DGGE ont montré que dans les trois enrichissements retenus, les populations se sont stabilisées après quelques transferts (Fig. 17, 18, 19). Aucune identification n'a été faite à partir des bandes des gels de DGGE puisque la distance entre les bandes ne permettait pas. Il semble toutefois y avoir enrichissement des bandes dominantes (donc des espèces dominantes) à la fin des enrichissements malgré la faible diversité observée sur les gels.

D'un point de vue global, l'objectif d'enrichir des consortiums pouvant utiliser le SCN<sup>-</sup> ou l'OCN<sup>-</sup> pour source d'azote et/ou de carbone dans le but de isoler des bactéries a été atteint. Cependant, il pourrait y avoir des améliorations à apporter pour des projets futurs de même nature. Le principe des enrichissements permet d'éliminer les bactéries

qui sont moins importantes dans la dégradation ou qui présentent une trop faible tolérance envers la molécule testée. Cependant, une analyse approfondie de la population initiale pourrait permettre de voir l'ensemble de la population sur place. Une approche méta génomique, aurait pu être intéressante avant tout le processus d'enrichissement (Chandler 2008). Cette démarche peut être utilisée pour l'identification totale des microorganismes présents selon leur séquence et ensuite les classer par espèces ou par fonctionnalité c'est-à-dire d'identifier les espèces qui possèdent un gène ou un ensemble de gènes caractéristiques. Elle aurait permis de trouver la voie de dégradation utilisée par les consortiums (voie de l'oxysulfure de carbone ou du cyanate) que présentement nous ne pouvons pas y répondre. De plus, nous aurions eu un portrait de la population avant et après l'enrichissement ce qui aurait pu permettre de trouver des bactéries non connues pour la consommation du  $\text{SCN}^-$  et de  $\text{OCN}^-$ . Certes, certaines bactéries n'ont pas de rôles directs dans la dégradation, mais il est possible que la biomasse initiale soit plus représentative, car les conditions physiques et chimiques sont idéales et proviennent directement de l'environnement à étudier. La création d'une génothèque à partir de la biomasse de départ aurait permis de comparer l'abondance des espèces avec la fin des enrichissements. L'enrichissement permet tout de même de favoriser les bactéries ayant un rôle dans la biodégradation permettant ainsi de les identifier plus facilement.

Au niveau global des enrichissements, il aurait été bien d'étudier les niveaux d'inhibitions, c'est-à-dire plusieurs concentrations pour le  $\text{SCN}^-$  et  $\text{OCN}^-$  afin de connaître les concentrations maximales pouvant être consommées. En effet, il a été rapporté qu'une concentration de 58 ppm de  $\text{SCN}^-$  peut être toxique pour certains microorganismes (Jeong et Chung 2006; Wood *et al.* 1998). Même si les valeurs auxquels les tests ont été effectués, soit les valeurs retrouvées dans le traitement biologique, la connaissance des valeurs maximales pouvant être dégradées par les deux molécules aurait probablement permis de faire fonctionner tous les enrichissements selon la capacité de chacun et même d'augmenter la concentration pour d'autres. Cependant, la toxicité ne semble pas la cause du non-fonctionnement de certains enrichissements; chez les bactéries, il a été montré que 2500 ppm peut être dégradé par *Klebsiella pneumoniae* et *Ralstonia* sp. (Chaudhari et Kodam 2010). Il est plus vraisemblable que la cause soit

multifactorielle incluant le volet nutritionnel et interrelationnel entre les espèces du biofilm. Ce dernier pourrait être fragmenté au niveau des enrichissements à comparer du site d'origine et pourrait expliquer le non-fonctionnement.

La tendance des enrichissements aux mêmes conditions nutritionnelles, mais d'inoculum différents ne sont pas tout à fait comparables selon nos résultats. Premièrement, ces différences doivent être largement expliquées par l'échantillonnage du départ ; les bassins comprenant les MBBR ont une homogénéité plus uniforme que ceux ayant un RBC. Dans ce dernier cas, lorsque l'échantillon a été prélevé sur le RBC, ce n'est qu'au tout début du disque et en surface que l'échantillon a été pris ce qui est probablement peu représentatif de toute la microflore. Il est à noter que près de la moitié des isolats se retrouvent autant dans la biomasse RBC que MBBR mais à abondance différente. Cependant, il est difficile de savoir s'il y a des rendements meilleurs avec l'un ou l'autre des supports (RBC vs MBBR) puisque ces bassins représentent que la première partie de la série du traitement biologique (voir section 2.1.1).

D'un autre côté, par la particularité du procédé de traitement biologique de la mine et par les résultats obtenus lors des enrichissements, ce projet apporte un brin d'information nouvelle dans le domaine. Ce biotraitement est unique puisqu'il combine à la fois la présence du  $\text{SCN}^-$  et de l' $\text{OCN}^-$  sans aucun autre cyanure ni de source externe de carbone (Kwon *et al.* 2002; Felfoldi *et al.* 2010). En cette matière, plusieurs recherches ont porté sur l'isolement, après enrichissement, de souches halophiles et alcaliphiles (Sorokin *et al.* 2010; Sorokin *et al.* 2004; Sorokin *et al.* 2007; Sorokin *et al.* 2001; Sorokin *et al.* 2002). D'autres chercheurs ont seulement étudié les populations sans enrichissement ni culture, c'est-à-dire par des outils de biologie moléculaire tels que le SIP, le DGGE, l'hybridation et le PCR de gènes ciblés (Manefield *et al.* 2005; Whiteley et Bailey 2000; Yamasaki *et al.* 2002). Sinon, d'autres équipes n'ont pas fait d'enrichissements, mais ont plutôt opté pour un procédé en modèle réduit, communément appelé Lab-scale (Stott *et al.* 2001; Souza-Fagundes *et al.* 2004). Ce procédé est habituellement en continu ce qui est quelque peu différent des enrichissements. Une autre équipe a caractérisé la microflore que par enrichissement, par caractérisation biochimique

et par examen microscopique (Stott *et al.* 2001). La caractérisation biochimique et la microscopie peuvent fausser les résultats puisque plusieurs espèces peuvent s'avérer très similaires sous le microscope et dans les réactions enzymatiques (Lee *et al.* 2003). La majorité des articles reliée de près ou de loin au sujet parle d'efficacité du procédé de dégradation ou bien de la dégradation du cyanure, qui somme toute est la molécule principale générée en cyanuration (Dictor *et al.* 1997; Granato *et al.* 1996; Evangelho *et al.* 2001). Pour les études plus approfondies sur la dégradation du  $\text{SCN}^-$  ou de  $\text{l'OCN}^-$ , les tests ont été faits en culture pure ce qui est moins représentatif de la réalité des environnements étudiés malgré qu'il soit plus facile de comprendre les voies de dégradation et les gènes impliqués lorsque les bactéries sont en culture pure. Finalement, trois recherches spécifiques sont arrivées avec des résultats concluants en procédant par enrichissement de la microflore au  $\text{SCN}^-$ , puis par isolement sur géloses et ensuite par la comparaison du gène de l'ARNr 16S dans les banques de données (Wood *et al.* 1998; Lee *et al.* 2003; Grigor'eva *et al.* 2009).

Chez le premier, *Methylobacterium thiocyanatum* a été isolée à partir du sol environnant les racines d'*Allium aflatunense* (Wood *et al.* 1998). Cette bactérie peut utiliser autant le  $\text{SCN}^-$  que  $\text{l'OCN}^-$  pour source d'azote ( $\text{SCN}^-$  et  $\text{OCN}^-$ ) et de soufre ( $\text{SCN}^-$  seulement) (Wood *et al.* 1998). De plus, la présence de la cyanase a été confirmée chez cette bactérie et des polypeptides pouvant appartenir à un thiocyanate permease et un thiocyanate hydrolase ont été identifiées par SDS-PAGE (Wood *et al.* 1998). Cependant, aucune implication environnementale n'est mentionnée.

Pour le second article, un consortium pouvant croître sur 200 ppm de  $\text{SCN}^-$  a été isolé d'un sol minier contenant de l'or (Lee *et al.* 2003). Suite à l'enrichissement pour l'utilisation du  $\text{SCN}^-$  pour source de carbone et d'azote et leur isolement sur gélose, quelques souches ont été séquencées pour leur gène de l'ARNr 16S afin d'être identifiées (Lee *et al.* 2003). Pour la plupart, elles appartiennent au genre *Bacillus*, mais aussi à *Klebsiella ornitinolytica* (Lee *et al.* 2003).

Pour le troisième article, un consortium alcalitolerant a été enrichi à partir d'un rejet minier et pouvant dégrader le SCN<sup>-</sup> jusqu'à 350 ppm en aérobie et près de 400 ppm en anaérobie. Cependant, aucune bactérie n'a été identifiée (Grigor'eva *et al.* 2009).

#### **4.2 Isolement et identification**

L'identification des bactéries n'a été faite que sur les enrichissements SCN(CN) RBC, SCN(CN) MBBR et CNO(CN) RBC suite à l'isolement sur milieux gélosés. Sachant que moins de 5% des bactéries sont cultivables (Todar 2011), les milieux utilisés étaient autant sélectifs que non sélectifs afin de pouvoir isoler le maximum de candidats. Une grande diversité a été observée lors de l'identification visuelle par la morphologie des colonies et ce, sur tous les milieux. Dans un sens, cette manière de faire n'exclut aucun candidat, mais dans un autre sens, certaines bactéries peuvent probablement croître sur plus d'un milieu. Donc, cette sélection sur géloses a consisté en une tâche monumentale puisqu'elle a multiplié les candidats à isoler d'autant plus qu'un minimum de trois repiquages étaient nécessaires pour assurer la pureté de chacune des colonies. Donc, dans les résultats obtenus après l'identification, plusieurs bactéries se sont retrouvées sur plusieurs milieux. Un criblage a été rajouté pour diminuer le nombre d'isolats à séquencer après le premier lot de séquençage, soit le RFLP, qui a été généré avec l'enzyme *RsaI* sur les produits de l'amplification du gène de l'ARNr 16S. Malheureusement, la précision sur la longueur des bandes n'était pas assez claire et la fragmentation insuffisante (données non présentées). Il aurait fallu utiliser plusieurs enzymes de restriction soit trois ou quatre ou bien utiliser un polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (t-RFLP). La différence avec le RFLP se situe à l'amplification, puisque des marqueurs fluorescents sont incorporés aux produits de l'amplification au terminal 5'. Ensuite, la digestion enzymatique génère des fragments et ceux du terminal 5' possèdent la fluorescence. Finalement, un séquenceur fait la lecture des fragments ayant la fluorescence et génère des résultats sous forme de pics d'électrophorogramme (Marsh 1999). Ici, pour avoir de bons profils, il suffit d'utiliser plusieurs endonucléases pour générer le maximum de fragments différents. Une seconde

alternative aurait été d'augmenter la résolution comme avec une migration dans l'agarose NuSieve à 3% (Laguerre *et al.* 1994).

Nous avons donc opté pour une sélection par bande pour le gène 16S par PCR-DGGE. L'ADN de chacun des microorganismes isolés est amplifié pour le gène de l'ARNr 16S, avec les enzymes spécifiques pour le DGGE (ce qui génère des fragments de courtes longueurs avec une pince riche en nucléotides G et C attachée en 5' (Muyzer *et al.* 1993). Comme mentionnée précédemment, la migration sur l'électrophorèse dénaturante permet ensuite de différencier les segments selon la séquence des nucléotides. Ici, contrairement à une communauté microbienne, on n'obtient qu'une seule bande par isolat. Cette technique a donné de bons résultats, car la résolution est précise. De plus, en utilisant des bactéries séquencées comme marqueur, il fut facile d'éliminer plusieurs candidats qui avaient les mêmes fragments. Cependant, seulement une quarantaine d'isolats peuvent être analysés en même temps et le cycle est plus de 16 heures. Donc, beaucoup de temps est requis afin de passer tous les candidats isolés.

Pour les isolats des enrichissements SCN(CN), la diversité est restreinte car beaucoup d'isolats sont les mêmes; *Achromobacter xylooxidans* et *Microbacterium oxydans* sont parmi les espèces les plus abondantes retrouvées dans les deux enrichissements. Par contre, leur abondance varie. Pour les isolats de l'enrichissement SCN(CN) RBC, la bactérie la plus commune est une actinobactérie, soit *Leifsonia* sp. (Genbank: FJ784125.1). Certaines actinobactéries ont déjà été rapportées dans l'eau usée de cokerie (qui contient également du SCN<sup>-</sup>) (Felfoldi *et al.* 2010). Quant à l'enrichissement SCN(CN) MBBR, l'isolat le plus commun est *Achromobacter xylooxidans*. Les genres *Achromobacter*, *Microbacterium* et *Bacillus*, présents dans les deux enrichissements SCN(CN), sont également rapportés dans la littérature dans des environnements où il y a présence de SCN<sup>-</sup> (Jeong *et al.* 2005; Paruchuri *et al.* 1990; Yamasaki *et al.* 2002; du Plessis *et al.* 2001).

Pour l'enrichissement CNO(CN) RBC, les isolats identifiés sont bien différents de ceux isolés des microflore enrichis au SCN<sup>-</sup>, mais au niveau des clones, il y a plus de

similarités. Quoique la réaction biochimique de dégradation de l'OCN<sup>-</sup> soit bien connue chez *E. coli*, *P. fluorescens* et chez les cyanobactéries, peu de microorganismes provenant de l'environnement ont été recensés jusqu'à présent capables d'utiliser l'OCN<sup>-</sup> (Anderson *et al.* 1990; Harano *et al.* 1997). Néanmoins, parmi les isolats les plus abondants et identifiés pour notre projet, nous retrouvons *Microbacterium oxydans* (JM709), *Pedobacter* sp. (JM690), *Stenotrophomonas acidaminiphila* (JM687) et *Pelomonas saccharophila* (JM721) (Fig. 34A et 34B). Aucune de ces espèces ne semble être rapportée jusqu'à présent pour la dégradation de l'OCN<sup>-</sup>.

Concernant les géloses, sélectives et non-sélectives, plus de bactéries ont été isolées sur les milieux non-sélectifs. Ce résultat est logique puisque dans un premier temps, seuls les souches pouvant utiliser le SCN<sup>-</sup> ou l'OCN<sup>-</sup> de manière directe devraient pouvoir croître sur milieux sélectifs. Pourtant, puisqu'il y a eu croissance dans nos enrichissements, il est étonnant que peu de bactéries ont été isolées sur milieux sélectifs d'autant plus qu'elles devraient obligatoirement être capables de croître sur le SCN<sup>-</sup> ou l'OCN<sup>-</sup> pour source de carbone et/ou d'azote, même si statistiquement parlant un faible pourcentage (<5%) est capable de croître en gélose (Todar 2011; Ward *et al.* 1990). Plusieurs avenues peuvent expliquer le peu de résultats obtenus; il serait possible que la sélection n'ait pas fonctionné parce que les conditions n'étaient pas optimales pour exprimer les gènes impliqués; il serait possible que ces bactéries travaillent en consortium pour la dégradation de ces molécules (Boucabeille *et al.* 1994; Chaudhari et Kodam 2010; du Plessis *et al.* 2001); il serait encore plus possible que les géloses n'ont pas permis de les isoler dû à leurs besoins nutritionnels particuliers. Les génothèques, qui seront discutées plus bas, confirment cette dernière possibilité.

Pour le projet, les approches par enrichissement et isolement ont été choisies puisqu'elles semblaient plus logiques pour atteindre nos objectifs de trouver des isolats. Si le processus d'isolement des bactéries était à recommencer, la sélection des candidats commencerait par une description visuelle des colonies sur des milieux sélectifs seulement. Puis, pour les candidats ayant une apparence similaire, une identification microscopique avec coloration Gram suivie d'une caractérisation biochimique de base

pourrait certainement retrancher certains d'entre eux. Ensuite, pour les candidats restants, un criblage par DGGE des ADNr 16S préalablement amplifiés par PCR pourrait réduire le nombre d'isolats avant l'envoi final pour le séquençage. De plus, au lieu de ne mesurer que la diminution de la quantité des substrats, les molécules produites telles que  $\text{NH}_3$ ,  $\text{COS}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  pourraient eux aussi être quantifiés afin d'atteindre le but ultime du projet, soit l'identification des bactéries pouvant utiliser le  $\text{SCN}^-$  et l' $\text{OCN}^-$  et de connaître leur voie de dégradation puisque les molécules citées ci-haut sont les produits de dégradation du  $\text{SCN}^-$  et de l' $\text{OCN}^-$ .

Au niveau des génothèques pour les trois enrichissements retenus, elles ont montré une grande diversité à comparer aux isolats. Les techniques biomoléculaires sont, pour ce projet, plus efficaces pour obtenir de l'information sur les microflores. De plus, une courbe de raréfaction a été générée après la sélection des clones afin de savoir si le nombre choisi était suffisant pour représenter l'ensemble des populations. En somme, les courbes pour les enrichissements pour le  $\text{SCN}^-$  sont similaires, mais peut-être quelques clones de plus auraient permis de bien conclure que 20 profils différents représentent les populations dans leur ensemble (Fig. 29). Quant à la population de l'enrichissement  $\text{CNO}(\text{CN})$  RBC, après l'analyse d'une centaine de clones, il est toujours difficile de savoir combien de profils différents sont nécessaires pour représenter la population au complet. Il semble que la représentation va au-delà de 30 profils (Fig. 29). Cependant, pour cette dernière génothèque, la transformation bactérienne a été moins efficace, ce qui a limité le nombre de clones à sélectionner.

La majorité des clones présents dans les trois enrichissements sont des rhizobiales (*Methylobacterium* sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Afipia* sp., *Nitrobacter* sp., *Mesorhizobium* sp., *Oligotropha* sp., *Sinorhizobium* sp. et *Bosea* sp.). Ce qui est inattendu pour ce type d'environnement puisque les rhizobiales sont connus pour être des microorganismes vivants dans le sol ou ayant une symbiose avec les plantes (Van de Sande et Bisseling 1997). Parmi les clones identifiés dans les génothèques, *Thiobacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Rhodanobacter* sp., *Sphingomonas* sp., certains *Microbacterium* sp., certains *Bacillus* sp. et certains *Pseudomonas* sp. sont déjà connus

pour dégrader le  $\text{SCN}^-$  (Jeong *et al.* 2005; Paruchuri *et al.* 1990; Yamasaki *et al.* 2002; du Plessis *et al.* 2001; Felfoldi *et al.* 2010). Il est à noter qu'aucune souche appartenant à ces espèces n'a été isolée sur géloses. La présence de *Nitrobacter* sp. et *Nitrosomonas* sp., quant à eux, suggèrent d'une part la présence d'ammonium. Il est donc normal d'avoir des bactéries nitrifiantes puisque l'ammonium est produit lors de l'utilisation du thiocyanate et du cyanate. Ces deux bactéries sont bien connues dans le cycle de l'azote (Dictor *et al.* 1997).

Le clone le plus abondant de l'enrichissement SCN(CN) RBC correspond à *Oligotropha carboxidovorans*, un chimioautotrophe initialement isolé d'un enrichissement des eaux usées (Paul *et al.* 2008). Sa présence dans le consortium est intéressante puisque l'eau usée municipale est bien différente de l'eau usée métallurgique. L'eau usée municipale contient beaucoup de matières organiques contrairement à l'eau usée d'un effluent minier. Cette bactérie est capable de consommer le dioxyde de carbone pour source de carbone ce qui suggère qu'elle pourrait consommer le carbonate produit durant la voie de l'oxysulfure de carbone puisque l'oxysulfure de carbone est hydrolysé en sulfure d'hydrogène, qui sera ensuite oxydé en sulfate et en dioxyde de carbone ou carbonate, dépendamment du pH (Bezsudnova *et al.* 2007). Toutefois, il est plus qu'envisageable que cette bactérie utilise le  $\text{CO}_2$  de l'air ambiant. Rappelons que l'isolat principal isolé de cet enrichissement est *Leifsonia* sp. et il ne semble pas y avoir de lien entre ces deux bactéries.

Les clones les plus abondants de l'enrichissement SCN(CN) MBBR appartiennent aux genres *Rhodanobacter* sp. et *Thiobacillus* sp. Ces deux genres bactériens ont déjà été retrouvés dans des environnements où le  $\text{SCN}^-$  est présent, incluant les effluents de cokeries (Felfoldi *et al.* 2010). Les *Thiobacillus* spp sont connus pour dégrader le  $\text{SCN}^-$  (Happold *et al.* 1958; Katayama et Kuraishi 1978). *Thiobacillus thioparus* (aussi connu sous *Thiobacillus thiocyanoxydans*) peut dégrader le  $\text{SCN}^-$  par la voie du cyanate tandis que *T. thioparus* TH115 le dégrade par la voie de l'oxysulfure de carbone (Katayama *et al.* 1992; Youatt 1954). Dans le premier cas, le  $\text{SCN}^-$  sert pour source de carbone, d'azote et d'énergie (Vishniac et Santer 1957). Il est à préciser que le carbone fourni par le  $\text{SCN}^-$

via le  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  est mineur chez cet autotrophe. Dans le second cas, le  $\text{SCN}^-$  est utilisée pour source d'énergie et de soufre (Kim et Katayama 2000). Bref, sa présence dans la microflore est cohérent, mais il n'est pas possible de savoir quelle voie *T. thioparus* TH115 utilise pour consommer le  $\text{SCN}^-$ . Toutefois, l'isolat dominant n'est pas le même; *Achromobacter xylosoxidans* est un hétérotrophe retrouvé dans les environnements aqueux (Genbank: FJ169468.1). Une fois de plus, il n'y a aucune corrélation entre l'abondance des clones et des isolats pour cet enrichissement.

Peu de microorganismes ont été isolés pour leur capacité à dégrader l' $\text{OCN}^-$  malgré la grande variété de clones dans la génothèque (Babu *et al.* 1996; Kunz et Nagappan 1989; Wood *et al.* 1998). Dans la littérature, *E. coli* et *P. fluorescens* sont parmi les premiers microorganismes identifiés pour la biodégradation de l' $\text{OCN}^-$  lors de la détoxification de l'urée (Anderson *et al.* 1990). Les cyanobactéries, incluant *Synechocystis* sp. et *Synechococcus* sp., ont également la capacité de dégrader l' $\text{OCN}^-$  (Harano *et al.* 1997). De plus, *Methylobacterium thiocyanatum* peut utiliser l' $\text{OCN}^-$  pour sa source d'azote (Wood *et al.* 1998). Cependant, dans cette génothèque, ce sont les bactéries nitrifiantes *Nitrobacter* sp. et *Nitrosomonas* sp. qui sont les plus abondantes. Elle permet ici aussi d'affirmer qu'il y a nitrification dans cet enrichissement (Dictor *et al.* 1997). Quoique l'azote puisse provenir autant de l' $\text{OCN}^-$  que du  $\text{SCN}^-$ , il peut également provenir de l'air ambiant et il pourrait être fixé par un diazotrophe (incluant les rhizobiales). Il est cependant probable que de l'ammonium ait été produit à partir de l' $\text{OCN}^-$  dans l'enrichissement CNO(CN) RBC puisque le substrat de la réaction de la nitrification est l'ammonium (Hung et Pavlostathis 1997; Dictor *et al.* 1997). Plus précisément, *N. europea* est un chimiolithoautotrophe qui oxyde l'ammonium en nitrite et a déjà été rapporté dans les eaux usées comprenant des matières toxiques (Chain *et al.* 2003). Pour les isolats de ce même enrichissement, la diversité est relativement faible. Par exemple, *Microbacterium oxydans* (Genbank: GQ923776.1) a été isolée sur plusieurs milieux en plus d'avoir été isolé dans les trois enrichissements qui ont été étudiés.

L'identité des clones pour les trois génothèques a quelques similarités (ie *Microbacterium oxydans*, *Pseudomonas* sp. and *Mesorhizobium* sp.), mais une grande proportion est différente. La similarité est tout à fait explicable; les inoculums de départ proviennent du même biotraitement. Par contre, tout porte à croire que les enrichissements ont permis de différencier et d'enrichir certaines espèces au dépend de d'autres ce qui peut expliquer les différences dans l'identité et la proportionnalité des clones.

Globalement, les analyses phylogéniques entre les isolats et les clones ont démontré très peu de corrélation entre elles. Cette non-correspondance découle peut-être du fait que les méthodes d'identification bactérienne nécessitant une culture pure ne vont pas chercher toutes les bactéries, car moins de 5% sont cultivables en conditions standards (Ward et al. 1990). Les différences entre les enrichissements peuvent également être expliquées par l'échantillonnage initial; il était plus facile d'obtenir un échantillon uniforme dans le bassin MBBR car le support en entier était gardé. D'un autre côté, le RBC est énorme en terme de diamètre ce qui très difficile d'échantillonner le milieu, ce qui pourrait être la cause des différences observées.

L'hypothèse initiale stipulait que tous les enrichissements au  $\text{SCN}^-$  auraient des microflores similaires et idem pour ceux de l' $\text{OCN}^-$  (section 1.8). Pourtant, pour les deux enrichissements au  $\text{SCN}^-$  retenus, toutes les deux utilisent le  $\text{SCN}^-$  comme source de carbone et d'azote, mais certaines espèces retrouvées dans l'un des enrichissements n'ont pas été identifiées dans l'autre lors de l'isolement sur gélose. De plus, il est particulièrement remarquable que les populations de ces deux microflores obtenues par les génothèques du gène ARNr 16S sont très différentes. En effet, seulement les genres *Caulobacter*, *Rhodanobacter*, *Pseudomonas* et *Mesorhizobium* ont une grande présence dans ces enrichissements (Fig. 20).

Lorsque les résultats des isolats et des clones sont regroupés ensemble, il est possible de faire une analyse phylogénique de la population pour chaque enrichissement. Au niveau des génothèques, les microflores sont en grande partie composées de

rhizobiales de la famille de *Bradyrhizobiaceae*. Tel que mentionné plus haut, les rhizobiales sont généralement présents dans le sol ou associés aux racines des plantes et agissent en symbiose en fixant l'azote (Atlas et Bartha 1998). Leur abondance peut sembler inattendue à première vue dans les enrichissements, mais il est connu que les rhizobiales puissent causer des infections aux plantes afin de permettre la nodulation (Atlas et Bartha 1998). Également, il est connu que les plantes produisent des composés cyanurés comme mécanisme de défense (Atlas et Bartha 1998; Schnepf 2006) et donc le SCN<sup>-</sup> et l'OCN<sup>-</sup> pourraient être produits aux nodules et consommés par les rhizobiales.

Pour l'enrichissement SCN(CN) RBC, les espèces ont été regroupées en quatre catégories :  $\alpha$ -protéobactéries,  $\beta$ -protéobactéries, actinobactéries et firmicutes. La majorité des clones de cet enrichissement se retrouvent dans la catégorie des  $\alpha$ -protéobactéries tandis que les isolats sont plus dispersés dans les catégories. Ceci indique que l'isolement n'était peut-être pas optimisé pour l'obtention d' $\alpha$ -protéobactéries. D'un autre côté, aucun clone n'appartient à la catégorie des firmicutes. Il semble donc que l'identification par des techniques avec et sans culture des microorganismes soit complémentaire dans ce cas-ci. Pour l'enrichissement du SCN(CN) MBBR, notre hypothèse était que l'arbre phylogénique soit similaire à son homologue provenant du RBC. Cependant, les résultats sont quelque peu différents. La majorité des clones appartiennent aux  $\gamma$ -protéobactéries, suivi des  $\alpha$ -protéobactéries, tandis que les isolats sont majoritairement des actinobactéries et des  $\beta$ -protéobactéries.

En dernier lieu, pour l'arbre de la population de l'enrichissement CNO(CN) RBC, les classes des bactéries demeurent les mêmes que les arbres précédents, à l'exception qu'il y a des isolats dans la catégorie des bacteroidetes. Par contre, les isolats sont bien distribués dans les catégories  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$ -protéobactéries, bacteroidetes et actinobactéries tandis que la majorité des clones sont des  $\gamma$ -protéobactéries. Il y a certes une plus grande variété de clones que d'isolats, mais la distribution pour ces deux catégories est similaire. On aurait pu s'attendre à ce qu'il y ait une plus grande distribution pour les clones sachant qu'une faible majorité des bactéries sont cultivables. Malgré tout, certaines classes bactériennes ne sont pas du tout représentées. Il serait intéressant de répéter

l'expérience avec des amorces universelles différentes de celles utilisées pour le 16S soit pA et pH afin de vérifier si ce n'est pas des restrictions provenant des amorces qui ont favorisé l'amplification de certaines classes par rapport à d'autres. Par exemple, certains gènes dont *rpoB* ont prouvé leur efficacité en taxonomie (Mollet *et al.* 1997).

Puisque les génothèques ont révélées une grande diversité, il est présentement impossible de prédire quelles espèces sont responsables de la dégradation et de l'utilisation de manière directe ou indirecte du  $\text{SCN}^-$  et de  $\text{l'OCN}^-$ . Consomment-elles directement les molécules ou se nourrissent-elles des produits de dégradation? Il aurait été intéressant d'utiliser la technologie SIP (stable isotope probing) en même temps que les enrichissements. Cette technique permet d'identifier les bactéries qui peuvent consommer des molécules ciblées (Dumont et Murrell 2005; Neufeld, Vohra *et al.* 2007; Neufeld, Wagner *et al.* 2007). Par exemple, le  $\text{SCN}^-$  et  $\text{l'OCN}^-$  pourraient être enrichis en isotope de  $^{13}\text{C}$ . Les bactéries pouvant utiliser le  $\text{SCN}^-$  et  $\text{l'OCN}^-$  incorporeraient l'isotope dans leurs composantes cellulaires et leur ADN et ces dernières pourraient être séparés des bactéries qui n'utilisent pas le  $\text{SCN}^-$  et  $\text{l'OCN}^-$  car un ADN ayant l'isotope est plus lourd. Finalement, avec un gradient de densité, l'ADN peut être récupéré et les bactéries peuvent être identifiées.

En ce qui attrait à la littérature, il est difficile de comparer les consortiums dégradant le  $\text{SCN}^-$  avec ce qui a été publié jusqu'à présent puisque la biomasse initiale est bien différente des autres études (Sorokin *et al.* 2004; Sorokin *et al.* 2001; Felfoldi *et al.* 2010; Boucabeille *et al.* 1994; du Plessis *et al.* 2001; Jeong et Chung 2006; Jeong *et al.* 2005; Karavaiko *et al.* 2000; Lee *et al.* 2008; Paruchuri *et al.* 1990; Grigor'eva *et al.* 1999). Pour  $\text{l'OCN}^-$  provenant d'environnements miniers, la plupart des études en parlent comme le sous-produit de dégradation du cyanure ou du  $\text{SCN}^-$ , mais pas en tant qu'identité complète (Eisler et Wiemeyer 2004; Bezsudnova *et al.* 2007). Le projet de ce mémoire est donc une étude différente des autres puisque  $\text{l'OCN}^-$  est tout aussi présent que le  $\text{SCN}^-$ .

### 4.3 Essais de biodégradation avec les souches pures

Au niveau des essais de biodégradation des isolats, les résultats obtenus sont concluants. Pour le SCN<sup>-</sup>, aucun isolat n'a été capable d'utiliser cette molécule dans nos conditions expérimentales, incluant celles identiques aux enrichissements eux-mêmes; ceci suggère qu'une activité de consortium était à l'œuvre dans ces enrichissements. Ces résultats peuvent être expliqués par trois possibilités : les conditions physico-chimiques n'étaient pas adéquates; les candidats choisis n'ont pas les gènes requis pour consommer le SCN<sup>-</sup> ou bien la consommation de ce dernier nécessite une relation en consortium (Ouyang et Brazeau 2008). La première hypothèse pourrait être investiguée en faisant des tests supplémentaires qui pourraient définir de meilleures conditions d'isolement afin d'aller chercher certains clones ayant un possible rôle dans la consommation du SCN<sup>-</sup>. La deuxième hypothèse est plausible puisque nous n'avons pas retrouvé les principaux clones parmi les isolats. La troisième hypothèse est impossible à confirmer présentement.

À l'opposé, pour l'OCN<sup>-</sup>, la majorité des isolats testés ont dégradé la molécule. Il semble donc que sa consommation soit plus commune par des souches facilement isolables en conditions standards. Cette observation semble être présente chez plusieurs de nos isolats tout comme dans la littérature (Guilloton et Karst 1987). Le candidat le plus intéressant est JM695, affiliable à *Sphingopyxis* sp. PVA3 (Genbank: AB244735.1) au niveau des bactéries en culture pure. Selon les essais de biodégradation, cet isolat peut dégrader 75 ppm de l'OCN<sup>-</sup> en 24h en présence de R2A ou d'une source externe de carbone. Cette espèce n'est pas reconnue dans la littérature pour sa capacité à dégrader l'OCN<sup>-</sup>, mais d'autres membres de cette même famille, les *Sphingomonadaceae*, le sont, incluant plusieurs *Sphingomonas* sp. (du Plessis *et al.* 2001; Chaudhari et Kodam 2010).

Malgré la pertinence de tester individuellement les isolats les plus abondants obtenus afin de savoir si une espèce est plus performante qu'une autre, les résultats obtenus ont montré que le SCN<sup>-</sup> n'est pas dégradé tandis que la plupart des isolats dégradent l'OCN<sup>-</sup>. Pour les isolats enrichis au SCN<sup>-</sup>, aucun n'a été capable de consommer la molécule, à 600 ppm. Pourtant, dans la littérature, certaines espèces dégradent au-delà

de cette concentration (Wood *et al.* 1998; Kwon *et al.* 2002). Trois scénarios sont possibles : premièrement plusieurs espèces sont nécessaires afin de dégrader le  $\text{SCN}^-$  suggérant une réaction en consortium; deuxièmement ce sont les microorganismes non isolés qui ont pour rôle de dégrader le  $\text{SCN}^-$  ou; finalement les conditions dans lesquelles les isolats ont été testés ne sont pas optimales (Ouyang et Brazeau 2008). A l'opposé, pour les isolats enrichis à l' $\text{OCN}^-$ , plusieurs ont été capables de l'utiliser. Toutefois, puisque plusieurs espèces sont capables d'assimiler l' $\text{OCN}^-$ , la dégradation semble être un phénomène plus commun à comparer du  $\text{SCN}^-$ . Cependant, chez la majorité des bactéries, des produits de dégradation de l' $\text{OCN}^-$ , soient l'ammonium et le dioxyde de carbone, seulement l'ammonium est consommé directement par les bactéries (pour source d'azote) et le dioxyde de carbone est libéré à l'exception des autotrophes qui peuvent le consommer (Anderson *et al.* 1990; Suzuki *et al.* 1996). Subséquemment, notre isolat JM695 est d'autant plus intéressant puisqu'il pourrait être parmi les premières bactéries pouvant utiliser l' $\text{OCN}^-$  pour source de carbone et d'azote. Dans la littérature, l'étude de la dégradation de l' $\text{OCN}^-$  est faite sur des souches pures et pour l'utilisation pour source d'azote à l'exception des cyanobactéries qui elles peuvent le dégrader autant pour source de carbone et d'azote (Anderson *et al.* 1990; Guilloton et Karst 1987; Carepo *et al.* 2004; Kunz et Nagappan 1989; Luque-Almagro *et al.* 2008; Wood *et al.* 1998; Espie *et al.* 2007). Donc, dans un proche avenir, il serait intéressant de caractériser davantage JM695.

## 5. Conclusion

L'étude des biomasses et microflores enrichies du biotraitement de l'effluent à la mine LaRonde a révélé une grande diversité microbiologique autant avant qu'après les enrichissements sur  $\text{SCN}^-$  et  $\text{OCN}^-$ . L'étude de ces populations autant avec des techniques d'isolement classiques que biomoléculaires a permis de constater que l'abondance n'est pas toujours liée à la performance. Les techniques moléculaires pourraient fournir, quant à elle, plus d'information pour la suite du projet; par PCR, les gènes cataboliques (ie. cyanase et thiocyanate hydrolyase) pourraient être diagnostiqués sur les souches isolées. Finalement, la mise en commun des enrichissements dégradant le  $\text{SCN}^-$  et l' $\text{OCN}^-$  pourrait permettre de connaître l'efficacité absolue et cela ressemblerait le plus au biotraitement puisque ce dernier contient les deux molécules. D'une vue globale, des consortiums pouvant dégrader le  $\text{SCN}^-$  et l' $\text{OCN}^-$  ont été enrichis; plusieurs isolats ont été isolés de ces enrichissements et; au moins un isolat a été identifier comme jouant un rôle dans la biodégradation de l' $\text{OCN}^-$  (JM695). Malheureusement, aucun candidat n'a été identifié pour jouer un rôle dans la biodégradation du  $\text{SCN}^-$ . Donc l'objectif de caractériser les populations bactériennes capables d'utiliser ces deux molécules a partiellement été atteint.

Malgré la présence du volet académique du projet, à savoir l'identification d'espèces bactériennes pouvant consommer le  $\text{SCN}^-$  et l' $\text{OCN}^-$ , une partie des connaissances peut être appliquée. Par exemple, si certaines espèces sont confirmées pour dégrader l'une ou l'autre des molécules, des tests pourraient être faits afin d'optimiser leur utilisation (à plus grande concentration ou en moins de temps) dans un but ultime d'optimiser le site de traitement. Ensuite, ces modifications pourraient être implantées sur le site de traitement de l'effluent minier afin d'accroître la capacité du traitement. Présentement, l'eau de l'extraction est réutilisée à 90% et le 10% de l'eau non recyclée est traitée et rejetée (communication personnelle). Si le biotraitement pouvait avoir une plus grande capacité de réduction de l' $\text{OCN}^-$  et du  $\text{SCN}^-$ , ceci donnerait une marge de manœuvre car présentement le traitement suffit à peine à la tâche. Cependant, pour le

moment, les résultats se limitent à un bassin de connaissances à être approfondi. Toutefois, au niveau académique, dans le cadre du projet ici présent, c'est la première fois que des bactéries sont enrichies en présence de  $\text{SCN}^-$  et  $\text{OCN}^-$  avant d'être isolées et identifiées. Cependant, plusieurs défis restent à être relevés; quelles sont les limites pour la biodégradation de l' $\text{OCN}^-$  et du  $\text{SCN}^-$ ? Qui est responsable de la biodégradation? Y a-t-il seulement la thiocyanate hydrolase et la cyanase qui sont impliquées dans les voies de dégradation? Peut-on adapter les conditions du traitement minier afin de promouvoir la prolifération des organismes qui utilisent le  $\text{SCN}^-$  et l' $\text{OCN}^-$ ? Bref, en microbiologie de l'environnement, l'enrichissement, l'isolement et l'identification des bactéries par le gène de l'ADNr 16S demeurent une formule valide pour caractériser les environnements. Cependant, comme dans tous les projets similaires, peu d'informations sont connues sur les bactéries dégradantes et sur leurs métabolismes pouvant utiliser l' $\text{OCN}^-$  et le  $\text{SCN}^-$  que ce soit seul ou en consortium.

## 6. Liste des références bibliographiques

- Adjei, M. D. & Y. Ohta. 1999. Isolation and characterization of a cyanide-utilizing *Burkholderia cepacia* strain. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15 (6):699-704.
- Agnico-Eagle. *Site internet de la compagnie minière* 2010. <http://www.agnico-eagle.com>.
- Ahn, J. H., J. Kim, J. Lim & S. H. Hwang. 2004. Biokinetic evaluation and modeling of continuous thiocyanate biodegradation by *Klebsiella* sp. *Biotechnology Progress* 20 (4):1069-1075.
- Akcil, A. 2003. Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances* 21 (6):501-511.
- Akcil, A. & T. Mudder. 2003. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. *Biotechnology Letters* 25 (6):445-450.
- Anderson, P. M. 1980. Purification and properties of the inducible enzyme cyanase. *Biochemistry* 19 (13):2882-2888.
- Anderson, P.M., Y. C. Sung & J. A. Fuchs. 1990. The cyanase operon and cyanate metabolism. *FEMS Microbiology Reviews* 87:247-252.
- ASTM. 1994. *Standard test methods for thiocyanate in water*. Edited by A. b. o. A. standards. Vol. 11.02 Water (II). Philadelphia, PA: American Association for the Testinf of Materials.
- Atlas, R.M. & R. Bartha. 1998. *Microbial ecology, fundamentals and applications*. 4th edn ed: Benjamin/Cummings Science Publishing.
- Babu, G. R. V., O. K. Vijaya, V. L. Ross, J. H. Wolfram & K. D. Chapatwala. 1996. Cell-free extract(s) of *Pseudomonas putida* catalyzes the conversion of cyanides, cyanates, thiocyanates, formamide, and cyanide-containing mine waters into ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45 (1-2):273-277.
- Banerjee, G. 1996. Phenol- and thiocyanate-based wastewater treatment in RBC reactor. *Journal of Environmental Engineering-Asce* 122 (10):941-948.
- Beasley, D. M. & W. I. Glass. 1998. Cyanide poisoning: pathophysiology and treatment recommendations. *Occup Med (Lond)* 48 (7):427-31.
- Beijerinck, M.W. 1904. Phénomènes de réduction produits par les microbes *Arch. Neerl. Sc. Ser. 2* (9):131-157.
- Beller, H. R., P. S. Chain, T. E. Letain, A. Chakicherla, F. W. Larimer, P. M. Richardson, M. A. Coleman, A. P. Wood & D. P. Kelly. 2006. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *J Bacteriol* 188 (4):1473-1488.
- Betts, P. M., D. F. Rinder & J. R. Fleeker. 1979. Thiocyanate utilization by an *Arthrobacter*. *Can J Microbiol* 25 (11):1277-1282.
- Bezsudnova, E. Y., D. Y. Sorokin, T. V. Tikhonova & V. O. Popov. 2007. Thiocyanate hydrolase, the primary enzyme initiating thiocyanate degradation in the novel obligately chemolithoautotrophic halophilic sulfur-oxidizing bacterium *Thiohalophilus thiocyanoxidans*. *Biochim Biophys Acta* 1774 (12):1563-1570.

- Boening, D. W. & C. M. Chew. 1999. A critical review: General toxicity and environmental fate of three aqueous cyanide ions and associated ligands. *Water Air and Soil Pollution* 109 (1-4):67-79.
- Boucabeille, C., A. Bories & P. Ollivier. 1994. Degradation of thiocyanate by a bacterial coculture. *Biotechnology Letters* 16 (4):425-430.
- Bradford, Marion M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2):248-254.
- Brown, P.D. & M.J. Morra. 1991. Ion chromatographic determination of SCN<sup>-</sup> in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39:1226-1228.
- Canada, Association minière du. *Association minière du Canada* 2010. [http://www.mining.ca/www/\\_fr/index.php](http://www.mining.ca/www/_fr/index.php).
- Carepo, M.S.P., J.S. Nina de Azevedo, J.I.R. Porto, A.R. Bentes-Sousa, J. da Silva Batista, A.L.C. da Silva & M.P.C. Scheinder. 2004. Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. *Genetics and Molecular Research* 3 (1):181-194.
- Chain, P. S., J Lamerdin, F Larimer, W Regala, V Lao, M Land, L Hauser, A Hopper, M. G. Klotz, J Norton, L Savavedra-Soto, D Arciero, N Hommes, M Whittaker & D Arp. 2003. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomas europea*. *Journal of Bacteriology* 185 (9):2759-2773.
- Chandler, M. 2008. Microbiology: what now? *Research in Microbiology* 159 (1):51-58.
- Chang, E. E., H. J. Hsing, P. C. Chiang, M. Y. Chen & J. Y. Shyng. 2008. The chemical and biological characteristics of coke-oven wastewater by ozonation. *J Hazard Mater* 156 (1-3):560-567.
- Chapatwala, K. D., G. R. Babu, O. K. Vijaya, K. P. Kumar & J. H. Wolfram. 1998. Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20 (1):28-33.
- Chaudhari, A. U. & K. M. Kodam. 2010. Biodegradation of thiocyanate using co-culture of *Klebsiella pneumoniae* and *Ralstonia* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (4):1167-1174.
- Chen, C. Y., C. M. Kao & S. C. Chen. 2008. Application of *Klebsiella oxytoca* immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater. *Chemosphere* 71 (1):133-139.
- Dash, R. R., A. Gaur & C. Balomajumder. 2009. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials* 163 (1):1-11.
- Dictor, M. C., F. Battaglia-Brunet, D. Morin, A. Bories & M. Clarens. 1997. Biological treatment of gold ore cyanidation wastewater in fixed bed reactors. *Environ Pollut* 97 (3):287-94.
- Dictor, M. C., F. Battaglia-Brunet, D. Morin, A. Bories & M. Clarens. 1997. Biological treatment of gold ore cyanidation wastewater in fixed bed reactors. *Environ Pollut* 97 (3):287-294.
- Dizge, N., E. Demirbas & M. Kobya. 2009. Removal of thiocyanate from aqueous solutions by ion exchange. *J Hazard Mater* 166 (2-3):1367-1376.

- du Plessis, C. A., P. Barnard, R. M. Muhlbauer & K. Naldrett. 2001. Empirical model for the autotrophic biodegradation of thiocyanate in an activated sludge reactor. *Let Appl Microbiol* 32 (2):103-107.
- du Plessis, C. A., P. Barnard, R. M. Muhlbauer & K. Naldrett. 2001. Empirical model for the autotrophic biodegradation of thiocyanate in an activated sludge reactor. *Let Appl Microbiol* 32 (2):103-7.
- Dumont, M. G. & J. C. Murrell. 2005. Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nat Rev Microbiol* 3 (6):499-504.
- Ebbs, S. 2004. Biological degradation of cyanide compounds. *Curr Opin Biotechnol* 15 (3):231-6.
- Egan, J. 2007. Mémoire de maîtrise sur l'effet de la granulométrie sur la cyanuration de l'or, Université Laval, Québec.
- Eisler, R. & S. N. Wiemeyer. 2004. Cyanide hazards to plants and animals from gold mining and related water issues. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 183* 183:21-54.
- Espie, George S., Farid Jalali, Tommy Tong, Natalie J. Zacal & Anthony K. C. So. 2007. Involvement of the cynABDS Operon and the CO<sub>2</sub>-Concentrating Mechanism in the Light-Dependent Transport and Metabolism of Cyanate by Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 189 (3):1013-1024.
- Evangelho, M. R., M. M. M. Goncalves, G. L. Sant'Anna & R. C. V. Boas. 2001. A trickling filter application for the treatment of a gold milling effluent. *International Journal of Mineral Processing* 62 (1-4):279-292.
- Felföldi, T., A. J. Szekely, R. Goral, K. Barkacs, G. Scheirich, J. Andras, A. Racz & K. Marialigeti. 2010. Polyphasic bacterial community analysis of an aerobic activated sludge removing phenols and thiocyanate from coke plant effluent. *Bioresour Technol* 101 (10):3406-3414.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP phylogeny inference package. *Cladistics* 5:164-166.
- Garcia-Fernandez, Jose Manuel, Nicole Tandeau de Marsac & Jesus Diez. 2004. Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (4):630-638.
- Given, B., B. Dixon, G. Douglas, R. Mihoc & T. Mudder. 1998. *Combined aerobic and anaerobic biological treatment of tailings solution at the Nickel Plate Mine*. London, UK: The Cyanide Compendium.
- Gosselin, G. 2005. Report on LaRonde mineral resource and mineral reserve estimate. Agnico-Eagle Mines Ltd. LaRonde division. Preissac, Quebec.
- Gouvernement de l'Australie, Conseil minier de l'Australie. 2005. Rapport sur les procédés de destruction des cyanures (Fact sheet - Cyanide destruction processes). [www.minerals.org.au](http://www.minerals.org.au).
- Gouvernement des États-Unis, Agence de la protection de l'environnement. 1993. Cyanide detoxification: INCO sulfur dioxide/air process. Washington D.C.
- Gouvernement du Canada, Environnement Canada (Vajna, B.). 1987. Rapport sur le traitement des eaux usées provenant de l'exploitation des mines et de la préparation du minerai.
- Gouvernement du Canada, Ressources Naturelles du Canada. *Ressources Naturelles du Canada* <http://www.nrcan-rncan.gc.ca/com/index-fra.php>.

- Gouvernement du Canada, Statistiques Canada. 2010. <http://www.statcan.gc.ca/start-debut-fra.html>.
- Gouvernement du Québec, Ministère du développement durable et des parcs. 2005. Directive 019 sur l'industrie minière. *Gouvernement du Québec*.
- Gouvernement du Québec, Ministère du développement durable et des parcs. *Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs* 2009. <http://www.mddep.gouv.qc.ca/>.
- Granato, M., M. M. Goncalves, R. C. Villas Boas & G. L. Sant'Anna, Jr. 1996. Biological treatment of a synthetic gold milling effluent. *Environ Pollut* 91 (3):343-50.
- Greenberg, A.E., R.R. Trussell & L.S. Clesceri. 1995. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th edn ed. Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation
- Grigor'eva, N. V., Z. A. Avakyan, T. P. Tourova, T. F. Kondrat'eva & G. I. Karavaiko. 1999. The search for and study of microorganisms that degrade cyanides and thiocyanates. *Microbiology* 68 (4):393-399.
- Grigor'eva, N. V., V. Smirnova lu, S. V. Terekhova & G. I. Karavaiko. 2008. Isolation of an aboriginal bacterial community capable of utilizing cyanide, thiocyanate, and ammonia from metallurgical plant wastewater. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 44 (5):554-558.
- Grigor'eva, N. V., Y. V. Smirnova & L. E. Dulov. 2009. Thiocyanate decomposition under aerobic and oxygen-free conditions by the aboriginal bacterial community isolated from the waste water of a metallurgical works. *Microbiology* 78 (4):402-406.
- Guilloton, Michel & Francis Karst. 1987. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants lacking inducible cyanase. *J Gen Microbiol* 133 (3):645-653.
- Happold, F. C., K. I. Johnstone, H. J. Rogers & J. B. Youatt. 1954. The isolation and characteristics of an organism oxidizing thiocyanate. *J Gen Microbiol* 10 (2):261-266.
- Happold, F. C., G. L. Jones & D. B. Pratt. 1958. Utilization of thiocyanate by *Thiobacillus thioeparus* and *T. thiooxydans*. *Nature* 182:266-267.
- Harano, Y., I. Suzuki, S. Maeda, T. Kaneko, S. Tabata & T. Omata. 1997. Identification and nitrogen regulation of the cyanase gene from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 179 (18):5744-5750.
- Heming, T.A., R.V. Thurston, E.L. Meyn & R.K. Zajdel. 1985. Acute toxicity of thiocyanate to trout. *Trans Am Fish Soc* 114:895-905.
- Hung, C. H. & S. G. Pavlostathis. 1997. Aerobic biodegradation of thiocyanate. *Water Research* 31 (11):2761-2770.
- Hupé, Jean-Francois. 2008. Mémoire de maîtrise sur l'enrichissement et recherche de certaines activités enzymatiques produites par des bactéries aérobies thermophiles, INRS-Institut Armand-Frappier.
- Ingvorsen, K., B. Hojer-Pedersen & Godtfredsen. 1991. Novel-cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. *Appl. Environ Microbiol* 57 (6):1783-1789.

- Jeong, Y., B. G. Park & J. S. Chung. 2005. High performance biofilm process for treating wastewater discharged from coal refining plants containing nitrogen, cyanide and thiocyanate. *Water Sci Technol* 52 (10-11):325-34.
- Jeong, Y., B. G. Park & J. S. Chung. 2005. High performance biofilm process for treating wastewater discharged from coal refining plants containing nitrogen, cyanide and thiocyanate. *Water Sci Technol* 52 (10-11):325-334.
- Jeong, Y. S. & J. S. Chung. 2006. Biodegradation of thiocyanate in biofilm reactor using fluidized-carriers. *Process Biochemistry* 41 (3):701-707.
- Johnson, W. V. & P. M. Anderson. 1987. Bicarbonate is a recycling substrate for cyanase. *Journal of Biological Chemistry* 262 (19):9021-9025.
- Karavaiko, G. I., T. F. Kondrat'eva, E. E. Savari, N. V. Grigor'eva & Z. A. Avakyan. 2000. Microbial degradation of cyanide and thiocyanate. *Microbiology* 69 (2):167-173.
- Katayama, Y., A. Hiraishi & H. Kuraishi. 1995. *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology* 141 ( Pt 6):1469-1477.
- Katayama, Y. & H. Kuraishi. 1978. Characteristics of *Thiobacillus thioparus* and its thiocyanate assimilation. *Can J Microbiol* 24 (7):804-810.
- Katayama, Y., Y. Narahara, Y. Inoue, F. Amano, T. Kanagawa & H. Kuraishi. 1992. A thiocyanate hydrolase of *Thiobacillus thioparus*. A novel enzyme catalyzing the formation of carbonyl sulfide from thiocyanate. *J Biol Chem* 267 (13):9170-9175.
- Kenova, T.A., V.L. Kormienko & S.V. Drozdov. 2010. On electrochemical oxidation of thiocyanates in solutions for cyanidation of gold-containing ores and concentrates. *Russian Journal of Applied Chemistry* 83 (9):1589-1592.
- Kevan, S.D & D.G Dixon. 1991. The acute toxicity of pulse-dosed thiocyanate (as KSCN and NaSCN) to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs before and after water hardening. *Aqua Toxicol* 19:113-122.
- Kim, S. J. & Y. Katayama. 2000. Effect of growth conditions on thiocyanate degradation and emission of carbonyl sulfide by *Thiobacillus thioparus* TH115. *Water Research* 34 (11):2887-2894.
- Kitis, M., A. Akcil, E. Karakaya & N. O. Yigit. 2005. Destruction of cyanide by hydrogen peroxide, in tailings slurries from low bearing sulphidic gold ores. *Minerals Engineering* 18 (3):353-362.
- Kjeldsen, P. . 1999. Behaviour of cyanides in soil and groundwater: A review. *Water Air Soil Poll* 115:279-307.
- Kunz, D. A. & O. Nagappan. 1989. Cyanase-mediated utilization of cyanate in *Pseudomonas fluorescens* Ncib-11764. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1):256-258.
- Kwon, H. K., S. H. Woo & J. M. Park. 2002. Thiocyanate degradation by *Acremonium strictum* and inhibition by secondary toxicants. *Biotechnology Letters* 24 (16):1347-1351.
- Labbé, N., V. Laurin, P. Juteau, S. Parent & R. Villemur. 2007. Microbiological community structure of the biofilm of a methanol-fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms. *Microbial Ecology* 53 (4):621-630.

- Laguerre, G., M-R. Allard, F. Revoy & N. Amarger. 1994. Rapid Identification of Rhizobis by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Appl. Environ Microbiol* (1).
- Lanno, R. P. & D. G. Dixon. 1996. Chronic toxicity of waterborne thiocyanate to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53 (9):2137-2146.
- Lee, C., J. Kim, J. Chang & S. Hwang. 2003. Isolation and identification of thiocyanate utilizing chemolithotrophs from gold mine soils. *Biodegradation* 14 (3):183-188.
- Lee, C. S., J. Kim, H. J. Do & S. Hwang. 2008. Monitoring thiocyanate-degrading microbial community in relation to changes in process performance in mixed culture systems near washout. *Water Research* 42 (4-5):1254-1262.
- Lemarchand, K., F. Berthiaume, C. Maynard, J. Harel, P. Payment, P. Bayardelle, L. Masson & R. Brousseau. 2005. Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *Journal of Microbiological Methods* 63 (2):115-126.
- Logsdon, M., T. Mudder & K. Hagelstein. 1999. *Report on the management of cyanide in gold extraction*. Edited by ICME. Ottawa, Canada.
- Lottermoser, B. 2003. *Mine wastes: characterization, treatment and environmental impacts*. Edited by Springer.
- Ludwig, Wolfgang, Strunk, Westram, Richter, Meier, Yadhukumar, Buchner, Lai, Steppi, Jobb, Färster, Brettske, Gerber, W. Ginhart, Gross, Grumann, Hermann, Jost, KÄnig, Liss, Laymann, May, Nonhoff, Reichel, Strehlow, Stamatakis, Stuckmann, Vilbig, Lenke, Ludwig, Bode & Heinz Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32 (4):1363-1371.
- Luque-Almagro, Victor M., Maria- J. Huertas, Lara P. Saez, Manuel Martinez Luque-Romero, Conrado Moreno-Vivian, Francisco Castillo, M. Dolores Roldan & Rafael Blasco. 2008. Characterization of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cyanase, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (20):6280-6288.
- Manfield, M., R. I. Griffiths, M. B. Leigh, R. Fisher & A. S. Whiteley. 2005. Functional and compositional comparison of two activated sludge communities remediating coking effluent. *Environmental Microbiology* 7 (5):715-722.
- Marsh, T. L. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2 (3):323-327.
- Mason, F., D. Harper & M. Larkin. 1994. The microbial degradation of thiocyanate. *Biochem Soc Trans* 22 (4):423S.
- Mendez, V., S. Daniele & V. Caps. 2008. *GdR Or-Nano ; Groupe de recherche sur les nanoparticules d'or*. <http://www.insp.upmc.fr/webornano/>.
- Mollet, C., M. Drancourt & D. Raoult. 1997. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology* 26 (5):1005-1011.
- Mudder, T., F. Fox, J. Whitlock, T. Ferro, G. Smith, R. Waterland & J. Vietl. 2001. *The Homestake wastewater treatment process part 2: operation and performance*. Edited by S. E. The Cyanide Monograph. London.

- Mudder, T., I. Fox, J. Withlock, T. Fero, G. B. Smith, R. Waterland & J. Vietl. 1998. *The Homestake wastewater treatment process: Part 2. Operation and performance*. Edited by T. C. Monograph, *Mining Journal Books*.
- Mudder, T.I. & J.L. Whitlock. 1984. Strain of *Pseudomonas paucimobilis*: (United States patent).
- Muyzer, G., E. C. Dewaal & A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16s ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (3):695-700.
- Nelson, L. 2006. Acute cyanide toxicity: Mechanisms and manifestations. *Journal of Emergency Nursing* 32 (4):S8-S11.
- Neufeld, J. D., J. Vohra, M. G. Dumont, T. Lueders, M. Manefield, M. W. Friedrich & J. C. Murrell. 2007. DNA stable-isotope probing. *Nat Protoc* 2 (4):860-866.
- Neufeld, J. D., M. Wagner & J. C. Murrell. 2007. Who eats what, where and when? Isotope-labelling experiments are coming of age. *ISME Journal* 1 (2):103-110.
- Oudjehani, K., G. J. Zagury & L. Deschenes. 2002. Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58 (3):409-415.
- Ouyang, J & B Brazeau. 2008. *Thiocyanate degradation pathway*. University of Minnesota. [http://umbbd.msi.umn.edu/thc/thc\\_map.html](http://umbbd.msi.umn.edu/thc/thc_map.html).
- Park, D., D. S. Lee, Y. M. Kim & J. M. Park. 2008. Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresour Technol* 99 (6):2092-2096.
- Paruchuri, Y. L., N. Shivaraman & P. Kumaran. 1990. Microbial transformation of thiocyanate. *Environ Pollut* 68 (1-2):15-28.
- Paul, D., S. Bridges, S. C. Burgess, Y. Dandass & M. L. Lawrence. 2008. Genome sequence of the chemolithoautotrophic bacterium *Oligotropha carboxidovorans* OM5T. *J Bacteriol* 190 (15):5531-5532.
- Potvin, R. 2004. Rapport de synthèse pour le doctorat sur la réduction de la toxicité des effluents des mines de métaux de base et précieux à l'aide de méthodes de traitement biologique, Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue.
- Schnepf, R. 2006. Cyanide: sources, perceptions, and risks. *J Emerg Nurs* 32 (4 Suppl):S3-7.
- Sorokin, D. Y., O. L. Kovaleva, T. P. Tourova & G. Muyzer. 2010. *Thiohalobacter thiocyanaticus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium from hypersaline lakes, that utilizes thiocyanate. *Int J Syst Evol Microbiol* 60 (Pt 2):444-450.
- Sorokin, D. Y., T. P. Tourova, A. N. Antipov, G. Muyzer & J. G. Kuenen. 2004. Anaerobic growth of the haloalkaliphilic denitrifying sulfur-oxidizing bacterium *Thiialkalivibrio thiocyanodenitrificans* sp. nov. with thiocyanate. *Microbiology* 150 (Pt 7):2435-2442.
- Sorokin, D. Y., T. P. Tourova, E. Y. Bezsoudnova, A. Pol & G. Muyzer. 2007. Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* gen. nov. sp. nov. - a moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing Gammaproteobacterium from hypersaline lakes. *Arch Microbiol* 187 (6):441-450.

- Sorokin, D. Y., T. P. Tourova, A. M. Lysenko & J. G. Kuenen. 2001. Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions. *Appl Environ Microbiol* 67 (2):528-538.
- Sorokin, D. Y., T. P. Tourova, A. M. Lysenko, L. L. Mityushina & J. G. Kuenen. 2002. *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* 52 (Pt 2):657-664.
- Souza-Fagundes, E.M., L.H. Rosa, N.C.M. Gomes, M.H. Santos & P.F. Pimentel. 2004. Thiocyanate degradation by pure and mixed cultures of microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology* 35:333-336.
- Stafford, D. A. & A. G. Cally. 1969. The utilization of thiocyanate by a heterotrophic bacterium. *J Gen Microbiol* 55 (2):285-289.
- Stott, M. B., P. D. Franzmann, L. R. Zappia, H. R. Watling, L. P. Quan, B. J. Clark, M. R. Houchin, P. C. Miller & T. L. Williams. 2001. Thiocyanate removal from saline CIP process water by a rotating biological contactor, with reuse of the water for bioleaching. *Hydrometallurgy* 62 (2):93-105.
- Stratford, J., A.E.X.O. Dias & C.J. Knowles. 1994. The utilization of thiocyanate as a nitrogen source by a heterotrophic bacterium: the degradative pathway involves formation of ammonia and tetrathionate. *Microbiology* 140:2657-2662.
- Sung, Y. C. & J. A. Fuchs. 1988. Characterization of the cyn operon in *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry* 263 (29):14769-14775.
- Suzuki, I., T. Sugiyami & T. Omata. 1996. Regulation by cyanate of the genes involved in carbon and nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 178 (9):2688-2694.
- Todar, K. 2011. Online textbook of bacteriology. [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net).
- Van de Sande, K. & T. Bisseling. 1997. Signalling in symbiotic root nodule formation. *Essays Biochemistry* 32:127-142.
- Vicente, J. & M. Diaz. 2003. Thiocyanate wet oxidation. *Environmental Science & Technology* 37 (7):1452-1456.
- Vishniac, W. & M. Santer. 1957. The thiobacilli. *Bacteriol Rev* 21 (3):195-213.
- Ward, D.M., R. Weller & M.M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in natural community. *Nature* 345:63-65.
- Whiteley, A. S. & M. J. Bailey. 2000. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl Environ Microbiol* 66 (6):2400-2407.
- Whitlock, J., L. Grondin, R. Wagner & L. Liu. 2003. Biological toxicity treatment evaluation of a gold mine effluent, edited by (Report). Sudbury: The Mining & Environment Conference III.
- Whitlock, J.L. 1990. Biological detoxification of precious metal processing wastewaters. *Geomicrobiology Journal* 8:241-249.
- Whitlock, J.L. & T. Mudder. 2001. *The Homestake wastewater treatment process part 1: Design and startup of a full scale facility*. Edited by S. E. The Cyanide Monograph, *Mining Journal Books Limited*. London.
- Wood, A. P., D. P. Kelly, I. R. McDonald, S. L. Jordan, T. D. Morgan, S. Khan, J. C. Murrell & E. Borodina. 1998. A novel pink-pigmented facultative methylotroph,

- Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. *Arch Microbiol* 169 (2):148-158.
- Yamasaki, M., Y. Matsushita, M. Namura, H. Nyunoya & Y. Katayama. 2002. Genetic and immunochemical characterization of thiocyanate-degrading bacteria in lake water. *Appl Environ Microbiol* 68 (2):942-6.
- Yamasaki, M., Y. Matsushita, M. Namura, H. Nyunoya & Y. Katayama. 2002. Genetic and immunochemical characterization of thiocyanate-degrading bacteria in lake water. *Appl Environ Microbiol* 68 (2):942-946.
- Youatt, J. B. 1954. Studies on the metabolism of *Thiobacillus thiocyanoxidans*. *J Gen Microbiol* 11 (2):139-149.

# Annexe 1

## Composantes des bouillons d'enrichissement

### A) Solution d'affluent synthétique 20X<sup>1</sup>

- 10 mL de solution minéraux en trace
- 33 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (BDH, Toronto, Ca)
- 640 mg de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O (J.T. Baker, Phillipsburg, É.-U.)
- 440 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J.T. Baker, Phillipsburg, É.-U.)
- 62,6 mg de FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- Compléter à 1 L d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par filtration 0,22 µm (Sarstedt, Allemagne)

### B) Solution minéraux en trace<sup>1</sup>

- 35 µL de HCl 12N (Fisher Scientific, Fair Lawn, É.-U.)
- 392 mg de NiCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O (Merck, Montréal, Ca)
- 360 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O (J.T. Baker, Phillipsburg, É.-U.)
- 322 mg de CuCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- 232 mg d'AlCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O (Anachemia, Montréal, Ca)
- 100 mg de MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O (J.T. Baker, Phillipsburg, É.-U.)
- 32 mg de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (A & C produits chimiques Américains, Montréal, Ca)
- 26 mg de ZnCl<sub>2</sub> (J.T. Baker, Phillipsburg, É.-U.)
- Compléter à 1 L d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 3 avec une solution de 10N HCl

---

<sup>1</sup> Les solutions sont basées sur l'analyse de l'effluent à la mine.

C) Solution stock d'OCN<sup>-</sup> 1X à 75 ppm

- 146,7 mg de KCNO (Aldrich, St-Louis, É.-U.)
- Compléter à 1 L d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 12 avec du NaOH 10N
- Stériliser par filtration

D) Solution stock d'OCN<sup>-</sup> 200X

- 29,34 g de KCNO
- Compléter à 1 L d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 12 avec du NaOH 10N
- Stériliser par filtration

E) Solution stock de SCN<sup>-</sup> 100X

- 80,5 g de NaSCN (Laboratoire Mat, Montréal, Ca)
- Compléter à 1 L d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par filtration 0,22 µm (Sarstedt, Allemagne)

F) Solution stock d'extrait de levure et d'acétate de sodium 100X

- 50 g d'extrait de levure
- 230 g de CH<sub>3</sub>COONa
- Compléter à 1 L d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par filtration

G) Solution de vitamines Wolfe (ATCC)

- 10 mg de pyridoxine HCl (vitamine B6) (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- 5 mg d'acide p-aminobenzoïque (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- 5 mg d'acide nicotinique (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- 5 mg d'acide thiooctique (acide lipoïque) (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- 5 mg de pantothenate de calcium (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- 5 mg de riboflavine (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- 5 mg de thiamine HCl (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, É.-U.)
- 2 mg d'acide folique (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- 2 mg de biotine (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- 0,1 mg de cyanocobalamine (vitamine B12) (Sigma, St-Louis, É.-U.)
- Compléter à 1 L d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par filtration

H) Bouillon d'enrichissement A1 (SCN<sup>-</sup> pour source de carbone et d'azote)

- 805 mg de NaSCN
- Compléter avec 949 mL d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par autoclave
- 49,92 mL de solution d'affluent synthétique 20X filtrée
- 1 mL de solution Wolfe pour vitamines filtrée
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N

I) Bouillon d'enrichissement A2 ( $\text{SCN}^-$  pour source de carbone seulement)

- 805 mg de NaSCN
- 1 g d' $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Compléter avec 949 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par autoclave
- 49,92 mL de solution d'affluent synthétique 20X filtrée
- 1 mL de solution Wolfe pour vitamines filtrée
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N

J) Bouillon d'enrichissement A3 ( $\text{SCN}^-$  pour source d'azote seulement)

- 805 mg de NaSCN
- 2,3 g de  $\text{CH}_3\text{COONa}$
- 500 mg d'extrait de levure
- Compléter avec 949 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par autoclave
- 49,92 mL de solution d'affluent synthétique 20X filtrée
- 1 mL de solution Wolfe pour vitamines filtrée
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N

K) Bouillon d'enrichissement A4 ( $\text{OCN}^-$  pour source de carbone et d'azote)

- 944 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par autoclave
- 49,92 mL de solution d'affluent synthétique 20X filtrée
- 5 mL de solution  $\text{OCN}^-$  200X filtrée
- 1 mL de solution Wolfe pour vitamines filtrée
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N

L) Bouillon d'enrichissement A5 (OCN<sup>-</sup> pour source de carbone seulement)

- 1 g d'(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Compléter avec 944 mL d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par autoclave
- 49,92 mL de solution d'affluent synthétique 20X filtrée
- 5 mL de solution OCN<sup>-</sup> 200X filtrée
- 1 mL de solution Wolfe pour vitamines filtrée
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N

M) Bouillon d'enrichissement A6 (OCN<sup>-</sup> pour source d'azote seulement)

- 2,3 g de CH<sub>3</sub>COONa
- 500 mg d'extrait de levure
- Compléter avec 944 mL d'H<sub>2</sub>O milliQ
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N
- Stériliser par autoclave
- 49,92 mL de solution d'affluent synthétique 20X filtrée
- 5 mL de solution OCN<sup>-</sup> 200X filtrée
- 1 mL de solution Wolfe pour vitamines filtrée
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH 1N

## Annexe 2

### Composantes des géloses

#### Géloses sélectives

Premièrement, en ce qui à trait aux géloses sélectives, plusieurs ingrédients et paramètres sont constants dans les recettes : l'agar Noble (ou purifié) à concentration de 15 g/L; l'ajout d'eau milli-Q; 49,92 mL/L de solution d'affluent synthétique 20X filtrée et ajoutée après la stérilisation; la solution de vitamines Wolfe à concentration de 1 mL/L filtrée et ajoutée après la stérilisation; la stérilisation par autoclave pour 20 min à 121°C et; l'ajustement du pH à 7,5 avec du NaOH 1N.

A) Gélose A1 ( $\text{SCN}^-$  pour source de carbone et d'azote)

- 805 mg/L de NaSCN

B) Gélose A2 ( $\text{SCN}^-$  pour source de carbone seulement)

- 805 mg/L de NaSCN
- 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Fisher Scientific, Fair Lawn, É.-U.)

C) Gélose A3 ( $\text{SCN}^-$  pour source d'azote seulement)

- 805 mg/L de NaSCN
- 2,3 g/L de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Fisher Scientific, Fair Lawn, É.-U.)
- 500 mg/L d'extrait de levure (BD, Sparks, É.-U.)

D) Gélose A4 ( $\text{OCN}^-$  pour source de carbone et d'azote)

- 5 mL/L de solution  $\text{OCN}^-$  200X filtrée

E) Gélose A5 ( $\text{OCN}^-$  pour source de carbone seulement)

- 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 5 mL/L de solution  $\text{OCN}^-$  200X filtrée

F) Gélose A6 (OCN<sup>-</sup> pour source d'azote seulement)

- 2,3 g/L de CH<sub>3</sub>COONa
- 500 mg/L d'extrait de levure
- 5 mL/L de solution OCN<sup>-</sup> 200X filtrée

**Géloses et milieux non-sélectifs**

A) Gélose R2A

- 18,1 g/L R2A agar (BBL, Cockeysville, É.-U.)

B) Gélose BHI (Brain Heart Infusion) à concentration de 10%

- 3,7 g Lde BHI (Oxoid Limited, Basingstoke, Angleterre)

C) Gélose Nutrient Agar (NB) à concentration de 10%

- 2,3 g/L de bouillon Nutrient avec agar (BBL, Cockeysville, É.-U.)
- 13,5 g/L d'agar noble (ou purifié)

D) Bouillon R2A

- 500 mg/L d'extrait de levure
- 500 mg/L de peptone (comprenant 50% de digestion pancréatique de caséine et 50% de digestion peptique de tissu animal) (BBL, Cockeysville, É.-U.)
- 500 mg/L d'acides casaminés (BD, Sparks, É.-U.)
- 500 mg/L de dextrose (Fisher Scientific, Fair Lawn, É.-U.)
- 500 mg/L d'amidon soluble (Difco, Détroit, É.-U.)
- 300 mg/L de phosphate de dipotassium (Fisher Scientific, Fair Lawn, É.-U.)
- 24 mg/L de sulfate de magnésium (Anachemia, Montréal, Ca)
- 300 mg/L de pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich, St-Louis, É.-U.)

E) Bouillon BHI à concentration de 10% (BHI10)

- 3,7 g/L de BHI

F) Bouillon NB à concentration e 10% (NB10)

- 0,8 g/L de bouillon Nutrient (EMD Chemicals, Gibbstown, É.-U.)

G) Gélose LB

- 40 g/L de LB agar (Wisent Inc, Rocklin, É.-U.)

H) Gélose Dextrose Tryptone Levure (YPD)

- 20 g/L de tryptone (Difco, Sparks, É.-U.)
- 10 g/L d'extrait de levure
- 17 g/L d'agar noble (ou purifié)
- 50 mL de dextrose 40% (v/v) filtrée ajouté après la stérilisation

## Annexe 3

### Affiliation des isolats

**Tableau 7. Isolats provenant de la biomasse initiale du RBC.**

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accession (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM153 (BHI10)	Bactérie non cultivée, clone ncd857g02c1	N/A	81%	HM305879.1	JM158(R2A) JM129(A1) JM121(A2) JM059(R2A) JM073(R2A) JM076(R2A) JM077(R2A) JM088(BHI10) JM091(BHI10) JM038(NB10) JM041(R2A) JM045(BHI10)	-	pA

Tableau 7. Isolats provenant de la biomasse initiale du RBC (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:			Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>		
JM113 (A3)	<i>Comamonas testosteroni</i>	β-protéo	99%	GU296675.1	JM148(A3) JM175(A1)	JM114(A3) JM139(A1) JM157(BHI10)	pA, pH	
JM022 <sup>5</sup> (R2A)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	γ-protéo	94%	GU003826.1	JM084(BHI10) JM120(A3)	-	pA	
JM017 (NB10)	<i>Serratia marcescens</i>	γ-protéo	99%	GU332613.1	-	JM096 (NB 10)	pA, pH	
JM066 (BHI10)	<i>Comamonas testosteroni</i> C03	β-protéo	92%	GU003831.1	JM067 (BHI10)	-	pA	
JM108 (A3)	<i>Achromobacter</i> sp. P3	β-protéo	99%	FJ556879.1	JM115(A3)	-	pA, pH	
JM019 (BHI10)	<i>Aeromonas punctata</i>	γ-protéo	96%	AM992188.2	-	-	pA	
JM020 (BHI10)	<i>Brevibacillus brevis</i>	Firmicutes	97%	EU931557.1	-	-	pH	
JM023 (R2A)	<i>Aeromonas</i> sp. R31(2010)	γ-protéo	99%	GU566354.1	-	-	pA, pH	
JM033 (NB10)	<i>Comamonas</i> sp. N19-3	β-protéo	96%	EU107172.1	-	-	pA	

Tableau 7. Isolats provenant de la biomasse initiale du RBC (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classé <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM034 (NB10)	<i>Comamonas</i> sp. N19-3	β- protéo	95%	EU107172.1	-	-	pA
JM035 (NB10)	<i>Serratia marcescens</i> N4-5	γ- protéo	95%	EF035134.1	-	-	pA
JM043 (NB10)	<i>Chryseobacterium</i> sp. NX12	Bacteroid	98%	EF601827.1	-	-	pH
JM044 (NB10)	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i> B1	γ- protéo	94%	FJ202054.1	-	-	pA
JM046 (R2A)	Bactérie non cultivée, clone TCCA-AT7-6	N/A	95%	GU233576.1	-	-	pH
JM047 (BHI10)	Bactérie non cultivée, clone nbt25f07	N/A	88%	EU535459.1	-	-	pA
JM048 (BHI10)	Bactérie non cultivée, clone E7	N/A	94%	FJ347719.1	-	-	pA
JM050 (BHI10)	<i>Bacillus</i> sp. EPI-R1	Firmicutes	92%	DQ985363.1	-	-	pA
JM052 (BHI10)	<i>Comamonas</i> sp. N19-3	β- protéo	96%	DQ985363.1	-	-	pA
JM058 (BHI10)	Bactérie non cultivée, clone H2SRC215	N/A	97%	FM212994.1	-	-	pA

Tableau 7. Isolats provenant de la biomasse initiale du RBC (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM065 (BHI10)	<i>Bacillus</i> sp. DU159(2010)	Firmicutes	97%	HM567040.1	-	-	pA
JM068 (BHI10)	<i>Comamonas</i> <i>testosteroni</i> C03	β-protéo	94%	GU003831.1	-	-	pA
JM074 (R2A)	<i>Comamonas</i> <i>testosteroni</i> N19-3	β-protéo	94%	EU107172.1	-	-	pA
JM078 (BHI10)	<i>Pseudomonas</i> <i>puitida</i> F15	γ-protéo	88%	EF204238.1	-	-	pA
JM081 (BHI10)	<i>Comamonas</i> <i>testosteroni</i>	β-protéo	94%	FJ967838.1	-	-	pA
JM082 (BHI10)	<i>Aeromonas</i> <i>veronii</i>	γ-protéo	84%	FJ494906.1	-	-	pA
JM083 (BHI10)	<i>Aeromonas</i> <i>veronii</i>	γ-protéo	99%	GU735964.1	-	-	pA, pH
JM085 (BHI10)	<i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> INRS13	Firmicutes	96%	FJ601909.1	-	-	pH
JM086 (R2A)	<i>Bacillus</i> sp. C2(2008)	Firmicutes	99%	EU863839.1	-	-	pA, pH
JM087 (R2A)	<i>Serratia</i> sp. NII-76	γ-protéo	88%	FJ897468.1	-	-	pA

Tableau 7. Isolats provenant de la biomasse initiale du RBC (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM092 (BH110)	<i>Comamonas testosteroni</i> C03	β-protéo	96%	GU003831.1	-	-	pA
JM105 (R2A)	Flavobacteriaceae sp. JJC	Bacteroid	96%	EU523664.2	-	-	pH
JM106 (R2A)	<i>Bacillus</i> sp. C2(2008)	Firmicutes	94%	EU863839.1	-	-	pA, pH
JM112 (A3)	<i>Comamonas testosteroni</i> F4	β-protéo	98%	FJ967838.1	-	-	pA
JM119 (A3)	<i>Pseudaminobacter</i> sp. G210	α-protéo	96%	GU199003.1	-	-	pH
JM135 (A2)	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	Actino	91%	DQ232614.2	-	-	pH
JM136 (R2A)	Bacillaceae sp. CL4.144	Firmicutes	98%	FM173820.1	-	-	pA, pH
JM140 (A2)	<i>Sphingomonas</i> sp. EZ41	α-protéo	99%	EU591707.1	-	-	pA, pH
JM145 (A2)	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	α-protéo	99%	AB558142.1	-	-	pA, pH
JM154 <sup>6</sup> (BH110)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β-protéo	97%	HQ113218.1	-	-	pA, pH

Tableau 7. Isolats provenant de la biomasse initiale du RBC (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM174 (A1)	<i>Microbacterium</i> sp. WP2MJ	Actino	98%	GU272396.1	-	-	pA, pH
JM183 (BH110)	<i>Bacillus</i> sp. EK-167	Firmicutes	99%	GU935303.1	-	-	pA, pH
JM195 (A2)	<i>Chryseobacterium</i> sp. NX12	Bacteroid	93%	EF601827.1	-	-	pH

Isolat<sup>1</sup>: un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup>:  $\alpha$ -protéobactérie ( $\alpha$ -protéo),  $\beta$ -protéobactérie ( $\beta$ -protéo),  $\gamma$ -protéobactérie ( $\gamma$ -protéo), bacteroidetes (bacteroid), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup>: basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup>: Isolat phénotypiquement différent mais lorsque séquencé, l'affiliation est la même. JM022<sup>5</sup>: isolat idem à JM018 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM154<sup>6</sup>: isolat idem à JM134 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE.

Tableau 8. Isolats provenant de la biomasse initiale du MBBR.

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM071 (R2A)	<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2	β-protéo	99%	CP001220.1	JM141(A6)	JM124(A4)	pA, pH
					JM143(A4)	JM132(A5)	
					JM146(A2)	JM142(A4)	
					JM166(A4)	JM155(R2A)	
JM134 (A6)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β-protéo	97%	HQ113218.1	JM063(R2A)	-	pA, pH
					JM126(A5)		
					JM128(A6)		
					JM133(A5)		
					JM138(A6)		
					JM159(A6)		
JM160(A3)							
JM018 (BHI10)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	γ-protéo	94%	GU003826.1	JM103(A6)	-	pA
					JM109(A3)		
					JM116(A3)		
					JM117(A6)		
					JM150(A6)		

**Tableau 8. Isolats provenant de la biomasse initiale du MBBR (suite).**

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM123 (A4)	<i>Xenophilus azovorans</i>	β-protéo	97%	NR_025114.1	JM144(A5) JM168(A4) JM169(A4) JM177(A4) JM178(A4)	-	pA, pH
JM045 <sup>5</sup> (BHI10)	Bactérie non cultivée, clone ncd857g02c1	N/A	81%	HM305879.1	JM152(A4) JM164(A4) JM192(NB10) JM193(NB10)	-	pA
JM127 <sup>6</sup> (A6)	<i>Chryseobacterium</i> sp. NX12	Bacteroid	98%	EF601827.1	JM130(A2)	-	pH
JM162 <sup>7</sup> (A5)	<i>Bacillus</i> sp. C2(2008)	Firmicutes	99%	EU863839.1	JM167(A3)	-	pA, pH
JM025 (R2A)	<i>Comamonas</i> <i>testosteroni</i> F4	β-protéo	97%	FJ967838.1	-	-	pH
JM036 (NB10)	<i>Comamonas</i> sp. N19- 3	β-protéo	93%	EU107172.1	-	-	pA
JM037 (NB10)	<i>Comamonas</i> sp. GI7- 3-C11	β-protéo	86%	FJ193937.1	-	-	pA

Tableau 8. Isolats provenant de la biomasse initiale du MBBR (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM039 (BH110)	<i>Comamonas testosteroni</i> SI	β-protéo	72%	HQ200412.1	-	-	pH
JM040 (R2A)	Bactérie non cultivée, clone nbt26d06	N/A	91%	EU535511.1	-	-	pA
JM042 (R2A)	<i>Comamonas testosteroni</i> F4	β-protéo	94%	FJ967838.1	-	-	pA
JM056 (R2A)	<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2	β-protéo	94%	CP001220.1	-	-	pA
JM057 (NB10)	<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2	β-protéo	90%	CP001220.1	-	-	pA
JM062 (R2A)	<i>Comamonas</i> sp. N19-3	β-protéo	94%	EU107172.1	-	-	pA
JM064 (BH110)	<i>Comamonas</i> sp. N19-3	β-protéo	91%	EU107172.1	-	-	pA
JM075 (R2A)	<i>Comamonas testosteroni</i> F4	β-protéo	90%	FJ967838.1	-	-	pA
JM079 (BH110)	<i>Bacillus vietnamensis</i>	Firmicutes	99%	FJ188309.1	-	-	pH

Tableau 8. Isolats provenant de la biomasse initiale du MBBR (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGG <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM080 (BH110)	<i>Pseudomonas putida</i>	γ-protéo	61%	HM008955.1	-	-	pH
JM089 (R2A)	<i>Comamonas</i> sp. N19-3	β-protéo	94%	DQ984189.1	-	-	pA
JM090 (NB10)	<i>Comamonas</i> sp. N19-3	β-protéo	93%	EU107172.1	-	-	pA
JM093 (R2A)	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	93%	GQ199591.1	-	-	pA
JM104 (A6)	α-proteobactérie LJY3	α-protéo	83%	EU379018.1	-	-	pA, pH
JM110 (A6)	<i>Chryseobacterium</i> sp NX12	Bacteroïd	98%	EF601827.1	-	-	pH
JM111 (A6)	<i>Microbacterium</i> <i>hydrocarboxydans</i>	Actino	97%	EU373354.1	-	-	pA, pH
JM118 <sup>8</sup> (A3)	<i>Comamonas</i> sp. N19-3	β-protéo	96%	EU107172.1	-	-	pA
JM125 (A5)	<i>Hydrogenophaga</i> sp. LIY1	β-protéo	99%	EU379017.1	-	-	pA, pH

Tableau 8. Isolats provenant de la biomasse initiale du MBBR (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM131 (A5)	<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2	β-protéo	96%	CP001220.1	-	-	pA, pH
JM137 (A6)	<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2	β-protéo	99%	CP001220.1	-	-	pA, pH
JM147 (A5)	<i>Sphingomonas</i> EZ41	α-protéo	99%	EU591707.1	-	-	pA, pH
JM149 (A6)	<i>Pseudaminobacter defluvii</i>	α-protéo	98%	D32248.1	-	-	pA, pH
JM161 (A5)	<i>Acinetobacter</i> sp. MN33	γ-protéo	98%	FM213385.2	-	-	pH
JM165 (A4)	<i>Gordonia malaquae</i>	Actino	99%	AM406674.1	-	-	pA, pH
JM176 (A1)	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	Actino	89%	DQ365561.1	-	-	pA, pH
JM179 <sup>9</sup> (A6)	<i>Brevibacillus brevis</i>	Firmicutes	97%	EU931557.1	-	-	pH
JM180 (A6)	<i>Sphingopyxis</i> sp. J24	α-protéo	99%	EU143356.1	-	-	pA, pH

**Tableau 8. Isolats provenant de la biomasse initiale du MBBR (suite).**

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM181 (A6)	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	Actino	99%	DQ365561.1	-	-	pH
JM194 (NB10)	<i>Pseudomonas putida</i>	$\gamma$ -protéo	88%	CP000926.1	-	-	pA
JM229 (A1)	<i>Methylobacterium sp. SEMIA6407</i>	$\alpha$ -protéo	99%	FJ025133.1	-	-	pA, pH

Isolat<sup>1</sup> : un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup> :  $\alpha$ -protéobactérie ( $\alpha$ -protéo),  $\beta$ -protéobactérie ( $\beta$ -protéo),  $\gamma$ -protéobactérie ( $\gamma$ -protéo), bacteroidetes (bacteroid), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup> : basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup> : Isolat phénotypiquement différent mais lorsque séquencé, l'affiliation est la même. JM045<sup>5</sup> : isolat idem à JM153 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM127<sup>6</sup> : isolat idem à JM043 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM162<sup>7</sup> : isolat idem à JM086 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM118<sup>8</sup> : isolat idem à JM033 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM179<sup>9</sup> : isolat idem à JM020 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE.

**Tableau 9. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du RBC.**

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM429 (A2)	<i>Leifsonia</i> sp. L89	Actino	99%	FJ784125.1	JM477 (A2)	JM479 (A2)	pA, pH
					JM538 (A2)	JM547 (A2)	
					JM634 (A3)	JM549 (A2)	
					JM635 (A3)	JM618 (A2)	
						JM636 (A3)	
JM465 (BH110)	<i>Microbacterium oxydans</i>	Actino	99%	GQ923776.1	JM557 (A3)	JM296 (A1)	pA, pH
					JM558 (A3)	JM429 (A2)	
					JM584 (A3)	JM532 (YPD)	
					JM623 (A3)	JM552 (R2A)	
					JM624 (A3)	JM555 (R2A)	
					JM625 (A3)	JM566(NB10)	
						JM567 (A3)	
	JM587 (A3)						

Tableau 9. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du RBC (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM535 (LB)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	β-protéo	90%	EU373389.1	-	JM438(BHI10) JM441(BHI10) JM551 (A2) JM554 (R2A) JM570(NB10) JM571(NB10) JM572(NB10) JM586(NB10) JM612 (LB) JM636 (A3)	pA, pH
JM427 (R2A)	<i>Achromobacter</i> sp. ss3	β-protéo	99%	EU340142.1	JM568 (A1) JM601 (LB) JM614 (A1)	JM561(NB10) JM564(NB10) JM613 (A1)	pA, pH
JM534 (LB)	<i>Ochrobactrum</i> sp. c51	α-protéo	92%	FJ950600.1	JM397(BHI10) JM448(BHI10) JM533 (YPD) JM550 (YPD) JM583(NB10)	-	pA, pH
JM418 (BHI10)	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	99%	GQ280810.1	-	JM434 (R2A) JM513(BHI10)	pA, pH

Tableau 9. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du RBC (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM560 (BH110)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Firmicutes	96%	EU430993.1	-	JM609 (R2A)	pA, pH
JM480 (A2)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	β-protéo	93%	EU214610.1	-	JM542 (A2)	pA, pH
JM591 (R2A)	<i>Brevundimonas diminuta</i>	α-protéo	99%	GU397389.1	JM588 (R2A)	JM582 (A3)	pA, pH
JM341 (LB)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β-protéo	92%	GU296681.1	-	-	pA, pH
JM460 (A2)	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	91%	HM989919.1	-	-	pA, pH
JM464 (A2)	<i>Tsukamurella pseudospumae</i>	Actino	94%	FN424378.1	-	-	pA, pH
JM474 (YPD)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	β-protéo	92%	EU275351.1	-	-	pA, pH
JM497 (BH110)	<i>Brevundimonas</i> sp. dcm7A	α-protéo	94%	AF430126.1	-	-	pA, pH
JM520 (LB)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β-protéo	98%	GU296681.1	-	-	pA, pH
JM531 (LB)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	β-protéo	83%	FJ169468.1	-	-	pA, pH

Tableau 9. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du RBC (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM541 (A2)	<i>Pseudochrobactrum</i> sp. kss	α-protéo	87%	FM209496.1	-	-	pA, pH
JM559 (BHI10)	<i>Pseudochrobactrum aschero-lyticum</i>	α-protéo	99%	FJ493054.1	-	-	pA, pH
JM573 (A3)	<i>Bacillus decisifron-dis</i>	Firmicutes	88%	DQ465405.1	-	-	pA, pH
JM576 (A3)	<i>Bacillus pumilus</i>	Firmicutes	90%	EU373414.1	-	-	pA, pH
JM579 (A3)	<i>Bacillus</i> sp. LH2-3	Firmicutes	90%	GQ423394.1	-	-	pA, pH
JM582 (A3)	<i>Brevundimonas</i> sp. tibet-Iba1	α-protéo	94%	DQ108394.1	-	-	pA, pH
JM643 (A1)	<i>Tsukamurella pseudospumae</i>	Actino	99%	FN424378.1	-	-	pA, pH

Isolat<sup>1</sup> : un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup> : α-protéobactérie (α-protéo), β-protéobactérie (β-protéo), γ-protéobactérie (γ-protéo), bactéroïdées (bactéroïd), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup> : basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup> : Isolats phénotypiquement différents mais lorsqu'ils ont été séquencés, l'affiliation est la même.

Tableau 10. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du MBBR.

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM430 <sup>5</sup> (R2A)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	$\beta$ -protéo	83%	FJ169468.1	JM446 (LB) JM540 (LB) JM545 (R2A) JM553 (R2A) JM575(NB10) JM577(NB10) JM592(NB10) JM600 (LB) JM603(NB10) JM605(NB10) JM627 (A3) JM628 (A3) JM629 (A3) JM630 (A3) JM631 (A3) JM637(A3)	-	pA, pH

**Tableau 10. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du MBBR (suite).**

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:			Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>		
JM404 (A1)	<i>Achromobacter</i> sp. ss3	β-protéo	98%	EU340142.1	JM422 (A1)			pA, pH
					JM428 (A1)	JM537(BHI10)		
					JM589 (R2A)	JM590 (A3)		
					JM615 (A1)	JM598 (A1)		
					JM616 (A1)			
					JM632(BHI10)			
JM617 (A2)	<i>Leifsonia xyli</i>	Actino	98%	GU332619.1	JM619 (A2)			pA, pH
					JM620 (A2)	JM638 (A3)		
					JM621 (A2)	JM645 (A1)		
					JM622 (A2)			
					JM633 (A2)			
					JM641 (A3)			
JM327 (BHI10)	<i>Microbacterium oxydans</i>	Actino	98%	GQ923776.1	JM454(BHI10)			pA, pH
					JM496(BHI10)	JM372 (YPD)		
					JM585(NB10)	JM574(NB10)		
					JM610 (A3)	JM602 (A3)		
					JM611 (A3)			

Tableau 10. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du MBBR (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM354 (LB)	<i>Brevundimonas diminuta</i>	α-protéo	99%	GU397389.1	-	JM489 (YPD) JM562(NB10) JM565(NB10) JM578 (R2A)	pA, pH
JM639 (A3)	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	99%	HM989919.1	JM640 (A3)	JM420 (YPD)	pA, pH
JM403 (YPD)	<i>Leucobacter</i> sp. RBB-08	Actino	98%	GQ344412	-	JM491 (A3)	pA, pH
JM556 (A2)	<i>Rhodanobacter</i> sp. MBNA3	γ-protéo	97%	FN430654.1	-	JM642 (A1)	pA, pH
JM414 <sup>6</sup> (LB)	<i>Ochrobactrum</i> sp. c51	α-protéo	92%	FJ950600.1	JM546 (R2A)	-	pA, pH
JM402 (YPD)	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>	α-protéo	99%	FJ493054.1	-	-	pA, pH
JM432 (BHI10)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Firmicutes	97%	EU430993.1	-	-	pA, pH

Tableau 10. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du MBBR (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM473 (YPD)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β-protéo	99%	GU296681.1	-	-	pA, pH
JM476 (YPD)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β-protéo	90%	HQ113218.1	-	-	pA, pH
JM478 (YPD)	<i>Leucobacter iarius</i>	Actino	90%	AM040493.1	-	-	pA, pH
JM489 (YPD)	<i>Leucobacter</i> sp. RBB-08	Actino	88%	GQ344412.1	-	-	pA, pH
JM495 (YPD)	<i>Sinorhizobium fredii</i>	α-protéo	89%	AB433350.1	-	-	pA, pH
JM536 (BHI10)	<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes	93%	HM560955.1	-	-	pA, pH
JM544 (R2A)	<i>Brevundimonas</i> sp. Tibet-IBa1	α-protéo	93%	DQ108394.1	-	-	pA, pH
JM569 (LB)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	β-protéo	90%	EU373389.1	-	-	pA, pH
JM581 (NB10)	<i>Ochrobactrum</i> sp. JDC-41	α-protéo	99%	GU248309.1	-	-	pA, pH
JM604 (A3)	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	α-protéo	99%	AM490633.1	-	-	pA, pH

**Tableau 10. Isolats provenant de l'enrichissement SCN(CN) du MBBR (suite).**

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM644 (A1)	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	α-protéo	99%	AB558142.1	-	-	pA, pH

Isolat<sup>1</sup>: un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup>: α-protéobactérie (α-protéo), β-protéobactérie (β-protéo), γ-protéobactérie (γ-protéo), bactérioidetes (bacteroïd), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup>: basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup>: Isolats phénotypiquement différents mais lorsque séquencés, l'affiliation est la même. JM430<sup>5</sup>: idem à JM531, basé sur le profil PCR-DGGE de ce dernier. JM414<sup>6</sup>: idem à JM534, basé sur le profil PCR-DGGE de ce dernier.

Tableau 11. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(CN) du RBC.

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM650 (BHI10)	<i>Microbacterium oxydans</i>	Actino	99%	GQ923776.1	JM662 (A6) JM663 (A6) JM666 (YPD) JM673(NB10) JM679 (YPD) JM681 (LB) JM685 (LB) JM689 (R2A) JM697 (A5) JM698 (A5) JM699 (A5) JM700 (A5) JM702 (A5) JM703 (A5) JM704 (A5) JM711 (A4) JM712 (A4) JM718 (A4)	JM652 (A6) JM656(BHI10) JM659 (A6) JM678 (YPD) JM680 (LB) JM684 (LB) JM688 (R2A) JM691(R2A) JM709 (A4) JM719 (A4)	pA, pH

Tableau 11. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(CN) du RBC (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accession (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM654 (A6)	<i>Pedobacter</i> sp. H37	Bacteroid	97%	EF204468.1	JM672(NB10)		pA, pH
					JM674(NB10)		
					JM675(NB10)	JM660(BHI10)	
					JM676(NB10)	JM671(NB10)	
					JM677(NB10)	JM690 (R2A)	
					JM686(NB10)		
JM649 (BHI10)	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	γ-protéo	96%	GU294302.1	JM658 (A6)	JM657 (A6)	pA, pH
					JM661 (A6)	JM667 (YPD)	
					JM668 (YPD)	JM687 (R2A)	
					JM669 (YPD)		
JM701 (R2A)	<i>Pelomonas saccharophila</i>	β-protéo	99%	FJ513082.1	JM706(NB10)	JM705 (A5)	pA, pH
					JM707 (A5)	JM721 (A4)	
					JM714 (A4)		
					JM722 (A5)		

Tableau 11. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(CN) du RBC.

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM653 (BHI10)	<i>Pelomonas saccharophila</i>	β-protéo	96%	FJ513082.1	JM655(BHI10) JM664(BHI10) JM665(BHI10) JM670(NB10)	-	
JM682 (LB)	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	γ-protéo	99%	GU294302.1	JM683 (LB)	-	pA, pH
JM713 (A4)	<i>Mesorhizobium</i> sp. 2000-3	α-protéo	99%	FJ959375.1	-	JM715 (A4) JM720 (A4)	pA, pH
JM695 (LB)	<i>Sphingopyxis</i> sp. PVA3	α-protéo	99%	AB244735.1	JM696 (LB)	-	pA, pH
JM708 (A5)	<i>Caulobacter leidyi</i>	α-protéo	99%	NR_025324.1	-	JM716 (A4)	pA, pH
JM648 (BHI10)	<i>Pedobacter</i> sp. H37	Bacteroïd	91%	EF204468.1	-	-	pA, pH
JM651 (BHI10)	<i>Pedobacter</i> sp. H37	Bacteroïd	92%	EF204468.1	-	-	pA, pH

**Tableau 11. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(CN) du RBC.**

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM694 (LB)	<i>Sphingomonas</i> sp. sphing1	$\alpha$ -protéo	99%	GU479372.1	-	-	pA, pH
JM710 (A4)	<i>Agromyces</i> sp. C42	Actino	98%	GU394958.1	-	-	pA, pH

Isolat<sup>1</sup>: un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup>:  $\alpha$ -protéobactérie ( $\alpha$ -protéo),  $\beta$ -protéobactérie ( $\beta$ -protéo),  $\gamma$ -protéobactérie ( $\gamma$ -protéo), bactérioides (bactéroïd), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup>: basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup>: Isolat phénotypiquement différent mais lorsque séquencé, l'affiliation est la même.

Tableau 12. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(C) du RBC.

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM297 (BHI10)	<i>Microbacterium oxydans</i>	Actino	98%	GQ478426.1	JM297(NB10)	-	pH
JM455 (BHI10)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β-protéo	98%	FJ528593.1	-	-	pH
JM468 (YPD)	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Firmicutes	98%	FJ528593.1	-	-	pH
JM490 <sup>5</sup> (R2A)	<i>Brevundimonas diminuta</i>	α-protéo	75%	EU434473.1	-	-	pH

Isolat<sup>1</sup>: un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup>: α-protéobactérie (α-protéo), β-protéobactérie (β-protéo), γ-protéobactérie (γ-protéo), bacteroidetes (bacteroid), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup>: basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup>: Isolat phénotypiquement différent mais lorsque séquencé, l'affiliation est la même. JM490<sup>5</sup>: isolat idem à JM489 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE.

Tableau 13. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(N) du RBC.

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM262 <sup>5</sup> (YPD)	Bactérie non cultivée, N/A clone 28RHF48	N/A	93%	AJ863367.1	-	-	pH
JM268 <sup>6</sup> (BHI10)	<i>Sphingopyxis</i> sp. PVA3	α-protéo	93%	AB244735.1	-	-	pH
JM272 (BHI10)	<i>Caulobacter</i> <i>leidyi</i>	α-protéo	95%	AJ007806.1	-	-	pH
JM312 (LB)	<i>Pseudochro-bactrum</i> <i>saccharolyticum</i>	α-protéo	98%	FJ493054.1	-	-	pH
JM 319 <sup>7</sup> (LB)	<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i>	Actino	97%	EU259892.1	-	-	pH
JM325 <sup>8</sup> (BHI10)	<i>Lsinibacillus</i> <i>fusiformis</i>	Firmicutes	91%	HM992833.1	-	-	pH
JM331 (BHI10)	<i>Agromyces</i> <i>mediolanus</i>	Actino	98%	FJ950561.1	-	-	pH
JM339 (R2A)	<i>Rhodococcus erythreus</i>	Actino	75%	AY785747.1	-	-	pH
JM350 <sup>9</sup> (YPD)	<i>Microbacterium</i> <i>oxydans</i>	Actino	96%	FJ169470.1	-	-	pH
JM452 (LB)	<i>Brevibacillus</i> <i>brevis</i>	Firmicutes	99%	EU931557.1	-	-	pH

**Tableau 13. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(N) du RBC (suite).**

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accession (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM458 <sup>10</sup> (NB10)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β- protéo	93%	EU440982.1	-	-	pH
JM459 (BH110)	<i>Brevibacillus brevis</i>	Firmicutes	98%	EU931557.1	-	-	pH
JM482 (R2A)	<i>Leucobacter luti</i>	Actino	96%	AM072819.1	-	-	pH
JM521 (LB)	<i>Brevibacillus brevis</i>	Firmicutes	99%	EU931557.1	-	-	pH
JM522 (LB)	<i>Brevibacillus brevis</i>	Firmicutes	97%	HM449127.1	-	-	pH

Isolat<sup>1</sup>: un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup>: α-protéobactérie (α-protéo), β-protéobactérie (β-protéo), γ-protéobactérie (γ-protéo), bactéroïdètes (bactéroïd), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup>: basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup>: Isolats phénotypiquement différents mais lorsque séquencés, l'affiliation est la même. JM262<sup>5</sup>: isolat idem à JM251 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM268<sup>6</sup>: isolat idem à JM254 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM319<sup>7</sup>: isolat idem à JM313 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM325<sup>8</sup>: isolat idem à JM323 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM350<sup>9</sup>: isolat idem à JM349 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE. JM458<sup>10</sup>: isolat idem à JM455 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE.

Tableau 14. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(CN) du MBBR.

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM254 (A6)	<i>Spingopyxis</i> sp. PVA3	α-protéo	93%	AB244735.1	-	-	pH
JM255 (A6)	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>	α-protéo	79%	EU327307.1	-	-	pH
JM265 (A6)	<i>Ochrobactrum</i> sp. T63	α-protéo	94%	GQ849009.1	-	-	pH
JM307 <sup>5</sup> (BHI10)	<i>Microbacterium oxydans</i>	Actino	98%	GQ478426.1	-	-	pH
JM327 (BHI10)	<i>Microbacterium oxydans</i>	Actino	96%	HQ202813.1	-	-	pA
JM330 (R2A)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	γ-protéo	97%	EU741084.1	-	-	pH
JM336 (R2A)	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>	α-protéo	98%	AM180484.1	-	-	pH
JM466 (R2A)	<i>Microbacterium xylanilyticum</i>	Actino	95%	EU741115.1	-	-	pH
JM472 (YPD)	<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes	98%	HQ162493.1	-	-	pH
JM511 (A6)	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actino	99%	GU726138.1	-	-	pH

Tableau 14. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(CN) du MBBR (suite).

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM517 (YPD)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	γ-protéo	98%	EU741084.1	-	-	pH
JM526 (LB)	<i>Pseudochro-bactrum</i> sp. KSS	α-protéo	98%	FM209496.1	JM525(LB)	-	pH

Isolat<sup>1</sup>: un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup>: α-protéobactérie (α-protéo), β-protéobactérie (β-protéo), γ-protéobactérie (γ-protéo), bacteroidetes (bacteroid), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup>: basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup>: Isolat phénotypiquement différent mais lorsque séquencé, l'affiliation est la même. JM307<sup>5</sup>: isolat idem à JM297 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE.

Tableau 15. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(C) du MBBR.

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM 276 (BH110)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	γ-protéo	97%	EU741084.1	-	-	pH
JM 285 (BH110)	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>	α-protéo	97%	AM180484.1	-	-	pH
JM 344 (R2A)	<i>Ochrobactrum</i> sp. T63	α-protéo	93%	GQ849009.1	-	-	pH
JM 461 <sup>5</sup> (BH110)	<i>Brevibacillus brevis</i>	Firmicutes	98%	EU931557.1	-	-	pH

Isolat<sup>1</sup>: un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup>: α-protéobactérie (α-protéo), β-protéobactérie (β-protéo), γ-protéobactérie (γ-protéo), bacteroidetes (bacteroid), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup>: basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup>: Isolat phénotypiquement différent mais lorsque séquencé, l'affiliation est la même. JM461<sup>5</sup>: isolat idem à JM459 appartenant à une autre microflore basé sur le profil DGGE.

**Tableau 16. Isolats provenant de l'enrichissement CNO(N) du MBBR.**

Isolat <sup>1</sup>	Affiliation (BLASTN)	Phylum ou classe <sup>2</sup>	% Homologie	Numéro d'accension (Genebank)	Nombre d'isolat additionnel avec le même:		Amorce(s) utilisée(s) pour déterminer l'affiliation
					Profil DGGE <sup>3</sup>	Séquence <sup>4</sup>	
JM313 (BH110)	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actino	97%	EU259892.1	JM315(R2A)	-	pH
JM451 (YPD)	<i>Bacillus</i> sp. c333	Firmicutes	98%	DQ279740.1	-	-	pH
JM463 (BH110)	<i>Microbacterium oxydans</i>	Actino	94%	FJ169470.1	-	-	pH
JM475 (YPD)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β-protéo	97%	EU440982.1	-	-	pH
JM484 (BH110)	<i>Leucobacter luti</i>	Actino	97%	AM072819.1	-	-	pH
JM530 (R2A)	<i>Pseudochrobactrum</i> sp. kSS	α-protéo	89%	FM209496.1	-	-	pH

Isolat<sup>1</sup>: un numéro séquentiel précédé des lettres JM a été attribué à chaque isolat et entre parenthèses, c'est le milieu sur lequel l'isolat a été obtenu. Phylum ou classe<sup>2</sup>: α-protéobactérie (α-protéo), β-protéobactérie (β-protéo), γ-protéobactérie (γ-protéo), bactéroïdètes (bactéroïd), actinobactérie (actino), bactérie non classée (n/a). Nombre d'isolat additionnel avec le même profil DGGE<sup>3</sup>: basé sur le criblage PCR\_DGGE avec le gène de l'ARNr 16S lorsque que deux patrons étaient identiques. Nombre d'isolat additionnel avec la même séquence<sup>4</sup>: Isolats phénotypiquement différent mais lorsque séquencé, l'affiliation est la même.