

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Étude de procédés complémentaires au traitement aérobie
thermophile du lisier de porc**

Par
Julie Potvin-Barakatt

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du Jury
Et examinateur interne

Richard Villemur, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Denis Rho, Ph.D.
Institut de recherche en biotechnologie
Conseil national de recherches Canada

Directeur de recherche

Pierre Juteau, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

La production porcine au Québec a des retombées économiques importantes en agriculture mais n'est pas sans conséquences sociales et environnementales. Le traitement du lisier de porc devient essentiel afin de réduire les odeurs nauséabondes, la dissémination de pathogènes ainsi que l'eutrophisation des lacs et des rivières. Notre laboratoire travaille à l'étude et au développement d'un traitement aérobique thermophile auto-chauffant de type réacteur biologique séquentiel (AT-RBS) dans le but d'éliminer une grande portion des polluants retrouvés dans le lisier, soit les micro-organismes pathogènes, les mauvaises odeurs ainsi qu'une charge considérable de matériel organique, d'azote et de phosphore.

Pour compléter le traitement afin de permettre une recirculation de l'eau pour de futurs lavages de la porcherie ou un rejet dans les cours d'eau sans conséquence, deux réacteurs biologiques séquentiels (RBS) d'une capacité d'un litre alimentés avec l'effluent du AT-RBS et opérés à température pièce ont été optimisés dans le but de permettre l'élimination soit des composés carbonés et azotés (RBS-1), soit des composés carbonés, azotés et phosphorés (RBS-2) résiduels suite au traitement AT. Les performances globales des deux RBS ont été déterminées par l'analyse des concentrations résiduelles en acides gras volatils (AGV), phosphore soluble (RBS-2 uniquement), azote ammoniacal, nitrate et nitrite, et par le suivi de la demande chimique en oxygène (DCO). Le RBS-1, optimisé pour effectuer la nitrification et la dénitrification, a montré une bonne élimination de l'ammoniac en nitrate, mais une transformation du nitrate en azote moléculaire incomplète. Le RBS-2, optimisé pour effectuer simultanément la nitrification, la dénitrification et la déphosphatation, a montré une bonne diminution de la DCO, des acides gras volatiles (AGV) ainsi que du phosphore et des composés azotés.

La composition de la communauté microbienne des boues activées du RBS-2 a été étudiée en portant une attention particulière aux organismes accumulateurs de phosphore (PAO : *phosphorus accumulating organisms*). La technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) a permis de révéler que près de 50% de la communauté bactérienne était constituée de la bactérie '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*', une bactérie présumée PAO appartenant à la classe des *β -proteobacteria*. Par ailleurs, l'étalement de la biomasse du RBS-2 sur géloses sélectives a permis d'obtenir plusieurs isolats, mais aucun n'appartenait à '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*'. Une tentative d'isolement de la bactérie '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*' a été accomplie en séparant les bactéries selon leur densité sur un gradient de Percoll. Après centrifugation, les 9 mL de Percoll ont été séparés en fractions de 0,5 mL. Un PCR avec des amorces ciblant spécifiquement l'ADNr 16S de '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*' fait sur chacune de ces fractions a démontré la présence de cette bactérie dans toutes les fractions. Toutefois, en se basant sur l'intensité du signal, la bactérie ciblée s'est révélée plus abondante dans les fractions les plus denses du gradient, soit celles du dessous. Une coloration spécifique des granules de polyphosphates présentes dans les cellules a aussi montré une plus grande présence de ces dernières dans les fractions basales. Ces fractions ont été étalées sur géloses et incubées dans différentes conditions physiologiques (aérobie, anaérobie, microaérobie). Les isolats obtenus ont été analysés par PCR et aucun n'a démontré une appartenance à '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*'.

Finalement, une génothèque a été élaborée à partir d'un échantillon représentatif de l'ADN provenant de la biomasse du RBS-2, en utilisant des amorces ciblant spécifiquement '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*' afin de vérifier la diversité bactérienne ciblée par ces amorces. Sept clones ont été obtenus, tous étant phylogénétiquement très rapprochés des

séquences bactériennes utilisées pour construire les amorces, soit des *β-proteobacteria* non cultivés nommés '*Candidatus Accumolibacter phosphatis*'. Ceci suggère fortement que des bactéries accumulatrices de phosphore colonisent le RBS-2.

Remerciements

Je tiens à remercier Pierre Juteau pour l'accueil dans son laboratoire ainsi que pour tout le temps qu'il a accordé à mes questions et à l'avancement de mon projet.

Je remercie aussi tous les étudiants, techniciens, agents de recherche et professeurs du Groupe de Recherche en Microbiologie de l'Environnement. L'ambiance amicale régnant constamment dans l'aile A a été très favorable pour le partage des connaissances. Merci à tous pour l'écoute et les précieux conseils. Merci aux amitiés qui demeureront.

Merci à mes amis et à ma famille qui m'ont encouragée dans l'entreprise de ma maîtrise. Merci au Musée Armand-Frappier pour m'avoir fait connaître l'Institut et pour les opportunités de communiquer ma passion des sciences aux différentes clientèles. Merci aux membres des comités étudiants dont j'ai fait partie (AGEIAF et Environnement) pour le travail d'équipe agréable et pour les projets accomplis.

Finalement, un merci tout spécial à Martine Isabelle pour tous les moments mémorables et pour l'amitié.

Table des matières

Résumé	II
Remerciements	IV
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Introduction	1
Chapitre 1. Revue bibliographique	3
1.1. La production porcine au Québec	3
1.1.1. Généralités.....	3
1.1.2. Problèmes sociaux et environnementaux	3
1.2. Survol de technologies existantes pour le traitement du lisier de porc	7
1.2.1. Séparation solide/liquide	7
1.2.2. Traitement anaérobie.....	7
1.2.3. Traitement aérobie.....	8
1.3. Traitement biologique séquentiel	9
1.3.1. Élimination des composés azotés.....	10
1.3.2. La déphosphatation	14
1.3.3. La nitrification, dénitrification et EBPR en simultané.....	19
1.4. Microbiologie de la déphosphatation	20
1.5. Les bactéries compétitrices aux PAO.....	22
1.6. Isolement des bactéries d'intérêt	24
1.7. Étude d'un complexe bactérien par des méthodes non cultivables	25
1.7.1. Identification des micro-organismes dans un complexe microbien par l'élaboration d'une génothèque 16S.....	25
1.7.2. Suivi de la complexité et du dynamisme microbien	26
1.7.3. Hybridation fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	27
Chapitre 2. Matériel et méthodes	29
2.1. Affluent	29
2.2. Inoculum.....	30
2.3. Réacteur biologique séquentiel (RBS)	30
2.4. Échantillonnage et conservation des échantillons.....	33
2.4.1. Affluent et effluent.....	33
2.4.2. Biomasse	33
2.5. Analyses physico-chimiques	34
2.5.1. Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)	34
2.5.2. Dosage de l'acétate.....	34
2.5.3. Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH ₃).....	35
2.5.4. Dosage de l'azote sous forme nitrite (N-NO ₂) et nitrate (N-NO ₃).....	36
2.5.5. Dosage du phosphore à l'acide vanadomolybdophosphorique	37
2.5.6. Dosage des solides en suspension totaux (SST) et volatiles (SSV)	38
2.6. Colorations	39
2.6.1. Neisser (Granules de Poly-P)	39
2.6.2. Granules de polyhydroxyalkanoates (PHA).....	39
2.6.3. Coloration de Gram	39
2.7. Hybridation fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	40
2.8. Élaboration et évaluation de paires d'amorces spécifiques aux PAO et GAO	43

2.9.	Caractérisation de la flore microbienne présente dans le réacteur RBS-2	44
2.9.1.	Culture du consortium microbien sur milieu R2A et RBS-2 (1) et isolement des colonies.....	44
2.9.2.	Extraction d'ADN génomique par billes de verre.....	44
2.9.3.	Amplification de l'ADNr 16S et vérification sur gel.....	45
2.9.4.	Criblage des isolats obtenus	46
2.9.5.	Séquençage des ADNr 16S des isolats d'intérêt et étude phylogénique.....	48
2.10.	Enrichissement et tentative d'isolement de bactéries déphosphatantes	49
2.10.1.	Dispersion des floccs à l'aide d'un homogénéisateur couplé à la sonification	49
2.10.2.	Séparation de bactéries sur gradient de Percoll.....	50
2.10.3.	Isolement d'isolats affiliés à « <i>Ca. Accumulibacter</i> »	50
2.10.4.	Séquençage des ADNr 16S des isolats d'intérêt et étude phylogénique.....	52
2.11.	Élaboration d'une génothèque de PAO	52
2.11.1.	Purification du produit PCR.....	52
2.11.2.	Ligation et transformation	53
2.11.3.	Extraction d'ADN plasmidique des clones et criblage par PCR-DGGE	55
2.11.4.	Séquençage des clones d'intérêt et étude phylogénique	55
Chapitre 3.	Résultats	56
3.1.	Optimisation des performances des réacteurs RBS.....	56
3.1.1.	Conduite des opérations du bioréacteur RBS-1	58
3.1.2.	Conduite des opérations du bioréacteur RBS-2	60
3.2.	Caractérisation de la flore microbienne présente dans le RBS-2	63
3.2.1.	Observation des floccs au microscope avec les colorations Neisser et PHA	63
3.2.2.	Isolement des colonies	69
3.2.3.	Criblage des colonies préalablement à l'envoi au séquençage	72
3.2.4.	Séquençage des colonies	76
3.3.	Hybridation fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	78
3.4.	Élaboration et évaluation de paires d'amorces ciblant spécifiquement « <i>Ca. Accumulibacter</i> » et « <i>Ca. Competibacter</i> ».	79
3.5.	Enrichissement et tentative d'isolement de bactéries déphosphatantes	82
3.5.1.	Détermination des fractions riches en PAO	84
3.5.2.	Isolement des colonies	87
3.5.3.	Séquençage et étude phylogénique	90
3.6.	Génothèque.....	92
Chapitre 4.	Discussion	96
4.1.	Évaluation des performances des bioréacteurs de type RBS	96
4.1.1.	RBS-1	96
4.1.2.	RBS-2.....	97
4.2.	Caractérisation et de isolement de la microflore du RBS-2	99
4.2.1.	Types morphologiques observés suite aux colorations Neisser et PHA	99
4.2.2.	Identification des types morphologiques isolés	100
4.3.	FISH	103
4.4.	Analyse de l'isolement de la microflore du RBS-2 suite à la séparation des bactéries sur gradient de Percoll.....	105

4.4.1.	Évaluation de la méthode de séparation des bactéries sur gradient de Percoll.....	105
4.4.2.	Évaluation des méthodes d'enrichissement sur gradient de Percoll	106
4.4.3.	Analyse des isolats obtenus à partir de l'enrichissement sur gradient de Percoll.....	108
4.5.	Analyse des clones obtenus.....	111
	Conclusion.....	113
	Références	115

Liste des tableaux

Tableau 1. Séquences et cibles des amorces et des sondes utilisées.....	42
Tableau 2. Caractéristiques du lisier partiellement traité et centrifugé et des affluents RBS-1 et RBS-2 dilués et supplémentés.....	58
Tableau 3. Comparaison des types morphologiques observés après colorations Neisser et PHA des cellules prélevées à la fin de la période anaérobie et à la fin de la période aérobie.	68
Tableau 4. Description des colonies isolées sur gélose R2A supplémentées en acétate et incubées à température pièce en condition aérobie.....	70
Tableau 5. Description des colonies isolées sur gélose RBS-2 incubées à température pièce en condition aérobie.....	71
Tableau 6. Génotypes isolés à partir de la biomasse du RBS-2 et affiliation la plus probable de chacun.....	76
Tableau 7. Description des colonies isolées sur géloses RBS-2 (2) à partir des dilutions des fractions de Percoll 12, 13 et 14, incubées à température pièce en conditions aérobie.	88
Tableau 8. Description des colonies isolées sur géloses RBS-2 (2) supplémentées à partir des dilutions des fractions de Percoll 14, 15 et 16, incubées à température pièce en conditions aérobie et anoxie.....	89
Tableau 9. Génotypes isolés à partir des fractions basales des gradients de Percoll et affiliation la plus probable de chacun.....	90

Liste des figures

Figure 1. Cycle de l'azote.....	5
Figure 2. Équations de la nitrification	10
Figure 3. Équation de la dénitrification.....	12
Figure 4. Influence de la taille des floes sur le ratio des zones aérobie:anoxie dans un floe de boues activées.....	13
Figure 5. Structure du polyphosphate inorganique.	16
Figure 6. Principes de la déphosphatation biologique.....	18
Figure 7. Montage schématisé des RBS	31
Figure 8. Programme du PCR RoboCycler ® Gradient 96 pour tester les températures optimales d'hybridation	43
Figure 9. Programme de l'appareil PCR GeneAmp PCR system 2700.	46
Figure 10. Carte du vecteur pGEM®-T Easy (Promega).....	54
Figure 11. Conditions d'opération des RBS-1 et RBS-2.....	57
Figure 12. Performances du RBS-1 du 27 février 2007 au 12 avril 2007.....	59
Figure 13. Performances du RBS-2 du 10 mars 2006 au 11 avril 2007.....	62
Figure 14. Coloration Neisser de la biomasse échantillonnée à la fin de la période anaérobie. ...	64
Figure 15. Coloration Neisser de la biomasse échantillonnée à la fin de la période aérobie.	65
Figure 16. Coloration PHA de la biomasse échantillonnée à la fin de la période anaérobie.	66
Figure 17. Coloration PHA de la biomasse échantillonnée à la fin de la période aérobie..	67
Figure 18. Criblage des isolats par PCR-DGGE.	73
Figure 19. Patron de restriction pour les isolats dont le patron sur DGGE est similaire.	74
Figure 20. Identification de certaines bandes du consortium bactérien du RBS-2 grâce au séquençage des colonies isolées.....	75

Figure 21. Relation phylogénique des isolats obtenus à partir de la biomasse du RBS-2 avec les espèces bactériennes les plus rapprochées.	77
Figure 22. Observations au microscope à épifluorescence de l'hybridation des sondes PAO651 et Beta42a aux bactéries de la biomasse du RBS-2.	78
Figure 23. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces PAO462F / PAO 846R.	80
Figure 24. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces PAO462F / RC988R.	80
Figure 25. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces PAO462F (pince GC) / PAO651R.	81
Figure 26. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces PAO651F (pince GC) / PAO846R.	81
Figure 27. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces GAOQ431F / GAOQ989R.	82
Figure 28. Photo illustrant la séparation en bandes du consortium bactérien après une centrifugation de 75 minutes à 10 000 rpm à 20 °C sur un gradient de Percoll.	83
Figure 29. Colorations de Neisser (gauche) et de Gram (droite) réalisées sur les bactéries récoltées dans la fraction 13 du gradient de Percoll.	85
Figure 30. PCR avec les amorces PAO462F et PAO846R accompli sur les 14 fractions issues de la séparation sur gradient de Percoll.	85
Figure 31. PCR avec les amorces pA et pH accompli sur les 14 fractions issue de la séparation sur gradient de Percoll.	86
Figure 32. Relation phylogénique des isolats obtenus à partir de l'ensemencement des fractions basales des gradients de Percoll avec les espèces bactériennes les plus rapprochées.	91
Figure 33. Comparaison des profils de bandes obtenus par DGGE avec trois paires d'amorces différentes visant « <i>Ca. Accumulibacter</i> ».	93
Figure 34. Identification des bandes de l'échantillon de référence sur DGGE.	94
Figure 35. Relation phylogénique des clones avec les espèces bactériennes les plus rapprochées.	95
Figure 36. Conditions d'opération hypothétiques du RBS-1.	97

Introduction

La production porcine au Québec est un atout important pour la vitalité économique de certaines régions rurales. Malheureusement, elle est aussi source de plusieurs problèmes environnementaux dus aux grands volumes de lisier générés. Parmi les effets indésirables reliés à l'entreposage et à l'épandage du lisier, on note les mauvaises odeurs, la dissémination des micro-organismes pathogènes et la pollution des cours d'eau par l'excès de déchets organiques, d'azote et de phosphore. La croissance de la production porcine au Québec, particulièrement rapide depuis quelques décennies, doit nécessairement évoluer de paire avec l'implantation de procédés visant à réduire les effets négatifs de celle-ci afin d'assurer sa durabilité et son appui dans l'opinion publique.

Depuis plusieurs années, notre laboratoire travaille au développement d'un traitement aérobique thermophile auto-chauffant de type réacteur biologique séquentiel (AT-RBS) qui se caractérise par sa capacité à éliminer les pathogènes, les mauvaises odeurs ainsi qu'une charge considérable de matériel organique, d'azote et de phosphore présents dans le lisier. Ce traitement n'est toutefois pas complet puisqu'il réside dans l'effluent plus de 3 g/L d'azote ammoniacal, plus de 1 g/L de phosphore et plus de 40 g/L de la demande chimique en oxygène (DCO).

Pour compléter le traitement, deux RBS de 1L alimentés avec l'effluent du AT-RBS et opérés à température pièce ont été à l'étude. L'opération de ces RBS vise à déterminer les conditions nécessaires afin d'atteindre un effluent assez pauvre en polluants pour que soient possibles un rejet directement dans les cours d'eau ou une recirculation de l'effluent comme eau de lavage dans la porcherie. Pour y arriver, nous avons retenu deux approches. Premièrement, un premier RBS est opéré pour éliminer uniquement les composés organiques et azotés, afin que les constituants phosphorés soient éliminés éventuellement par des procédés physico-chimiques. Deuxièmement, un second RBS est opéré pour éliminer simultanément les constituants organiques, azotés et phosphorés.

Le second procédé RBS a été optimisé pour effectuer la déphosphatation biologique (EBPR : *enhanced biological phosphorus removal*). Cette méthode d'élimination du phosphore, grandement à l'étude dans plusieurs pays pour le traitement d'effluents municipaux et agricoles, impliquerait l'action de bactéries capables d'accumuler l'orthophosphate soluble en granules

intracellulaires de polyphosphates (polyP) inorganiques, jusqu'à 15% de leur poids sec. Depuis plus de trente ans, des équipes de recherche tentent d'identifier et d'isoler ces bactéries. Parmi les rares qui ont été effectivement isolées, aucune ne semblerait jouer un rôle important dans les procédés de déphosphatation. Récemment, des méthodes de biologie moléculaire et de coloration bactérienne ont permis d'identifier la séquence d'ADN correspondant à la bactérie recherchée. Cette dernière a été nommée « *Candidatus Accumulibacter phosphatis* » ou « *Ca. Accumulibacter* »¹ et appartient à la classe des *β -proteobacteria*.

Puisque le second RBS a démontré sa capacité à effectuer la déphosphatation biologique, une tentative d'isolement de « *Ca. Accumulibacter* » a été menée à partir de la biomasse de ce bioréacteur. L'ensemencement de la biomasse totale sur géloses a précédé l'ensemencement de fractions bactériennes enrichies par gradient de densité. Ces deux méthodes n'ont pas permis d'isoler « *Ca. Accumulibacter* ».

Un outil important dans la détection et l'identification de « *Ca. Accumulibacter* » a été développé pour la première fois lors de ce travail. Effectivement, des amorces spécifiques à cette bactérie ont été élaborées à partir de sondes à oligonucléotides ciblant cette dernière et normalement utilisées pour effectuer l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH). Cet outil a permis de confirmer la présence de « *Ca. Accumulibacter* » dans la biomasse du second RBS.

L'analyse FISH a été menée afin de connaître l'abondance de « *Ca. Accumulibacter* » parmi la population des *β -proteobacteria*. De plus, une génothèque fabriquée à partir d'un PCR utilisant les amorces spécifiques à « *Ca. Accumulibacter* » a été élaborée afin de vérifier les organismes réellement ciblés par ces amorces et afin de connaître la diversité bactérienne amplifiée par ces dernières.

Ce mémoire présente les résultats des performances des bioréacteurs mésophiles de type RBS ainsi que les résultats des multiples expériences s'inscrivant dans la tentative d'isolement de la bactérie « *Ca. Accumulibacter* ».

¹ Le terme *Ca.* est l'abréviation suggérée par « IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group » pour *Candidatus*. On peut aussi justifier de ne pas utiliser le nom « *phosphatis* » puisqu'il y a une seule proposition d'espèce pour le groupe *Accumulibacter*. Le terme « *Ca. Accumulibacter* » sera donc utilisé tout au long du présent mémoire pour désigner « *Candidatus Accumulibacter phosphatis* ».

Chapitre 1. Revue bibliographique

1.1. La production porcine au Québec

1.1.1. Généralités

La production porcine est un fleuron du développement de l'agriculture québécoise et un atout important dans la vitalité de certaines régions rurales. Cette industrie emploie directement et indirectement 28 000 travailleurs et a des retombées économiques annuelles de 3.1 milliards de dollars. Elle se situe au deuxième rang des activités agricoles québécoises ; le premier rang étant tenu par la production laitière. En 2006, elle représentait 410 millions de dollars ou 29 % des recettes canadiennes totales en production porcine avec sa production plus de 7.1 millions de têtes par année (FPPQ, 2007). La moitié de la production porcine québécoise est exportée dans plus de 75 pays, ce qui correspondait, en 2006, à des revenus s'élevant à plus de 410 millions de dollars (FPPQ, 2007). Environ 4 000 producteurs de porcs du Québec œuvrent dans 12 des 19 régions de la province. Ils sont regroupés massivement dans les bassins versants des rivières Yamaska, l'Assomption et Chaudière. Cette forte concentration qui ne cesse de croître est à l'origine de problèmes sociaux et environnementaux en raison des quantités massives de lisier générées.

1.1.2. Problèmes sociaux et environnementaux

L'eau est utilisée dans les élevages porcins pour les opérations de lavage. Elle peut aussi servir à l'évacuation des excréments vers un bassin d'entreposage temporaire (Coffey, 1999). On évalue un besoin quotidien en eau de 40 à 75 L par porc mature de 68 kg (Pagilla *et al.*, 2000). Le lisier ainsi obtenu est donc constitué d'un mélange aqueux de fèces, d'urine et de débris alimentaires. Puisqu'il s'agit d'un déchet relativement dilué (comparativement au fumier solide), le stockage et l'application sur les terres doivent être effectués à proximité de la porcherie où le lisier est généré car son transport est dispendieux et compliqué (Coffey, 1999). Généralement, le lisier est confiné dans des bassins anaérobiques pendant plusieurs semaines, où les molécules organiques complexes retrouvées dans les déjections animales sont partiellement dégradées, après quoi le surnageant et les boues sont épandus sur les terres (Cheng et Liu, 2001; Pan et Drapcho,

2001). Ces réservoirs anaérobiques sont malheureusement à l'origine de plusieurs problèmes. Effectivement, ils constituent le lieu de formation de composés malodorants tels l'ammoniac, les acides gras volatiles et le sulfure de dihydrogène (Pan et Drapcho, 2001). De plus, le surnageant de ces réservoirs, encore très riche en composés organiques, en nutriments et en micro-organismes potentiellement pathogènes pour les humains, présente un risque de contamination de l'eau des nappes phréatiques et d'eutrophisation des eaux de surface (Beaudet *et al.*, 1990; Coffey, 1999; Zhu *et al.*, 2006). Pour atténuer le problème, le Québec s'est doté de nouvelles normes d'épandage qui visent à ce que l'apport en nutriment par l'épandage ne dépasse pas le besoin des cultures (Gouvernement du Québec, 2003). Cela se traduit, dans les régions de production intensive, par des surplus de lisier qui ne peuvent pas être épandus localement. Pour ajouter au problème, l'intensification et la concentration de la production porcine ont aussi mené à une pénurie de terres pour pratiquer l'épandage dans certaines régions (Starnaud *et al.*, 1991). Ceci contribue aux problèmes de déforestation des quelques lots de forêts restants dans les régions agricoles et au sur-épandage de lisier sur les terres disponibles.

1.1.2.1. Les composés organiques

Les déchets organiques sont riches en particules solides, lesquelles peuvent rapidement recouvrir l'habitat benthique des cours d'eau. L'excès de sédiments se déposant au fond des cours d'eau peut mener à la dégradation ou à la perte totale de cet habitat (Cooper, 1993). De plus, ces déchets ont un impact considérable sur les concentrations d'oxygène dissous (OD) dans l'eau et les sédiments. Effectivement, la dégradation de grandes quantités de matière organique d'origine animale dans les systèmes aquatiques constitue une grande demande biologique en oxygène (DBO), limitant l'oxygène disponible pour les habitants de ces écosystèmes (Cooper, 1993). Ceci peut changer la composition des espèces et une population d'organismes anaérobiques peut graduellement s'installer dans l'eau et les sédiments (Cooper, 1993).

1.1.2.2. Les composés azotés

L'azote ammoniacal et l'azote organique sont les deux formes d'azote retrouvées dans les eaux usées des porcheries (Obaja *et al.*, 2003). Lors de l'entreposage, du traitement ou de l'épandage, l'azote organique (composant les protéines, l'urée et les acides nucléiques) est transformé en azote inorganique par un processus d'ammonification (Pan et Drapcho, 2001). La

Figure 1 présente les principales transformations de l'azote par l'action des micro-organismes. La présence en très grande concentration de l'azote ammoniacal est particulièrement préoccupante (Mota *et al.*, 2005b). À un pH inférieur à 7.0, il est retrouvé sous la forme d'ion ammonium (NH_4^+) presque uniquement, alors qu'il est retrouvé sous la forme d'ammoniac (NH_3 et H^+) à un pH supérieur à 9.2 (Metcalf & Eddy, 2003). Les précipitations suivant le sur-épandage du lisier peuvent entraîner de grandes quantités d'azote dans les eaux de surface par ruissellement (Coffey, 1999). Bien que le pH des cours d'eau favorise la présence d'ion ammonium, l'apport d'azote ammoniacal peut rapidement affecter les poissons et autres formes de vie aquatique car le seuil de toxicité de l'ammoniac est aussi faible que 0.02 mg/L (Cooper, 1993; Park *et al.*, 2006).

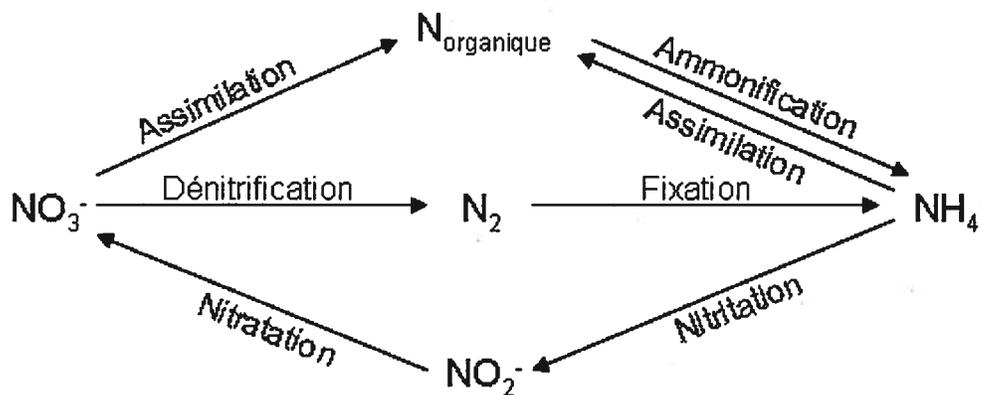


Figure 1. Cycle de l'azote. La somme des transformations de la nitrification et la nitratation constitue la nitrification (Tran, 2005).

L'azote ammoniacal peut être transformé en nitrite (NO_2^-) et en nitrate (NO_3^-) par des bactéries spécialisées (Figure 1). La présence de nitrate a de sérieuses implications dans la qualité de l'eau potable. S'il devient très concentré à des profondeurs du sol allant sous les racines des plantes, il peut contaminer la nappe phréatique (Coffey, 1999). Il peut aussi se retrouver dans les cours d'eau par ruissellement comme pour l'azote ammoniacal. Le nitrate lui-même n'est pas dangereux pour les humains, mais sa transformation en nitrite dans l'estomac présente un risque pour la santé (Obaja *et al.*, 2003). À des concentrations supérieures à 50 mg/L, soit la limite maximale recommandée pour l'eau potable (WHO, 1985), le nitrate est responsable de certains problèmes de santé, tel la méthémoglobinémie, affectant principalement les nourissons (Hooda *et al.*, 2000). Dans l'environnement, l'oxygène consommé par les bactéries afin d'oxyder l'azote

ammoniacal en nitrate n'est plus disponible pour les autres organismes des systèmes aquatiques, perturbant ces derniers (Obaja *et al.*, 2003). Lors de la réduction du nitrate en azote atmosphérique par les micro-organismes, des sous-produits tels le nitrite (NO_2^-), le monoxyde d'azote (NO) et l'hémioxyde d'azote (N_2O) peuvent être fabriqués si la dénitrification est incomplète (Filali-Meknassi *et al.*, 2005). Le NO_2 inhibe la croissance des micro-organismes environnants et le N_2O est un gaz toxique causant l'effet de serre (Henze *et al.*, 2000).

1.1.2.3.Le phosphore

Le phosphore est un macro-nutriment essentiel pour les organismes vivants. Dans le lisier, il est retrouvé en très grande concentration, majoritairement présent sous la forme inorganique d'ortho-phosphate (PO_4^{3-}) ou de poly-phosphate ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) et minoritairement sous la forme organique (Henze *et al.*, 2000; Vanotti *et al.*, 2003). La solubilité et la mobilité du phosphore dans le sol sont moins importantes que pour le nitrate. Le ruissellement et l'érosion des sols sont les moyens de transport de ce nutriment sous forme soluble ou sous forme de particules vers les eaux de surface, surtout suite à d'importantes précipitations suivant l'épandage du lisier. (Coffey, 1999). Le phosphore devient un problème lorsqu'il est retrouvé dans des environnements aquatiques en présence d'autres nutriments, tels les nutriments azotés (Henze *et al.*, 2000). Le phosphore est le principal nutriment limitant causant l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques (Hartig et Zumft, 1999; Hooda *et al.*, 2000; Mino, 2000; McGrath et Quinn, 2003; He *et al.*, 2006). L'eutrophisation est la croissance excessive d'algues et autres végétaux (bloom) menant à une pénurie d'oxygène dans le cours d'eau atteint, à une détérioration de l'odeur, de l'apparence et du goût de l'eau, à la dégradation de la qualité récréative de cette dernière et, dans certains cas, à une excrétion de toxines d'origine algale (principalement par les cyanobactéries) potentiellement dangereuses pour les animaux, incluant humains (Cooper, 1993; Henze *et al.*, 2000; Paerl *et al.*, 2001; McGrath et Quinn, 2003).

1.1.2.4.Autres polluants

Le lisier contient des quantités considérables d'estrogènes, tels l'estradiol, l'estrone et l'estriol, qui peuvent aussi contaminer les eaux de surface ainsi que les nappes phréatiques (Hanselman *et al.*, 2003). La contamination des eaux par ces hormones est préoccupante car des études ont démontré des effets perturbateurs sur le système endocrinien des animaux aquatiques à

des concentrations aussi faibles qu'à 10-100 ng/L. Les risques sur la santé humaine ne sont pas encore clairement connus (Hanselman *et al.*, 2003).

Il apparaît indispensable de déployer les efforts nécessaires afin de transformer l'industrie porcine québécoise en une activité durable (environnementalement responsable). Une diminution de la charge polluante du lisier ainsi qu'une élimination des odeurs sont des exigences auxquelles les technologies à venir devront essentiellement se plier pour que la production porcine devienne plus socialement et environnementalement acceptable.

1.2. Survol de technologies existantes pour le traitement du lisier de porc

1.2.1. Séparation solide/liquide

Plusieurs traitements du lisier de porc ont vu le jour pour pallier à ces problèmes environnementaux et sociaux. Des méthodes de traitement par séparation solide/liquide visent à extraire les particules de matière sèche du lisier brut. La séparation peut être mécanique (séparation avec tamis, à pression, avec centrifugeuse, sous vide) et/ou chimique (par l'ajout de coagulants et/ou flocculants). Les fibres contenues dans l'alimentation des porcs captent une grande partie du phosphore, puis décantent naturellement au fond du réservoir (FPPQ, 2001). Malheureusement, les performances de ces technologies sont variables dépendant de l'alimentation des porcs et des propriétés physiques et chimiques du lisier. De plus, les séparateurs n'ont aucun effet sur les nuisances olfactives et les contaminants biologiques du lisier (FPPQ, 2001). Ces technologies peuvent par contre être jumelées à d'autres procédés de traitement.

1.2.2. Traitement anaérobie

Des méthodes de traitement anaérobie permettent la digestion de la charge organique et sa transformation en énergie sous forme de biogaz (Pagilla *et al.*, 2000). Il existe des versions thermophiles (50-65 °C), mésophiles (approximativement 35 °C) et psychrophiles (15-25 °C) de ces bioprocédés (Henze *et al.*, 2000). Toutefois, ces procédés requièrent des bioréacteurs de grand volume car le temps de rétention requis pour traiter le lisier est très long (environ de 20 à 30 jours) (Pagilla *et al.*, 2000). À l'exception des versions thermophiles, ces traitements sont peu efficaces pour inactiver des pathogènes entériques (Pagilla *et al.*, 2000).

1.2.3. Traitement aérobie

La décomposition de la matière organique et la croissance bactérienne sont généralement plus rapides sous des conditions aérobies que sous des conditions anaérobies (Pan et Drapcho, 2001). Les réservoirs de traitement peuvent ainsi être moins volumineux pour les traitements aérobies. Sous des conditions aérobies, le carbone organique est oxydé en dioxyde de carbone sans que des acides gras volatiles ne soient formés. L'azote ammoniacal et le sulfure de dihydrogène sont oxydés en nitrate et sulfate, respectivement. Par contre, l'aération nécessaire pour l'oxydation du carbone organique augmente de beaucoup le coût du traitement (Pan et Drapcho, 2001).

1.2.3.1. Traitement aérobie thermophile

Les procédés aérobies thermophiles ($> 50^{\circ}\text{C}$) sont bien adaptés au traitement d'eaux usées fortement chargées en matière organique et/ou ayant déjà au départ une température élevée (Beudet *et al.*, 1990; LaPara et Alleman, 1999). Plusieurs avantages sont associés à l'implantation d'un tel procédé pour le traitement du lisier, soient la réduction des mauvaises odeurs, l'inactivation de micro-organismes potentiellement pathogènes, la réduction des émissions en méthane lors de l'entreposage et de l'application et la réduction des concentrations en DCO (demande chimique en oxygène), en DBO (demande biologique en oxygène)², en acides gras et en solides totaux et volatiles, le tout après quelques jours seulement (Beudet *et al.*, 1990; Juteau *et al.*, 2004a; Mohaibes et Heinonen-Tanski, 2004; Juteau, 2006).

La charge organique de certaines eaux usées, dont les eaux usées des porcheries, est assez élevée pour que le métabolisme aérobie des micro-organismes présents dans le traitement produise lui-même la chaleur nécessaire pour élever la température du système à plus de 50°C (LaPara et Alleman, 1999; Juteau, 2006). Une version simplifiée de cette technologie, connue sous le nom de « Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion » (ATAD), est utilisée pour la digestion des boues récoltées auprès des usines d'épuration des eaux usées municipales. En 2000, ce type de traitement était retrouvé dans 10 usines au Canada, 25 aux Etats-Unis et dans plus de 40 usines en Europe (Metcalf & Eddy, 2003).

Le traitement auto-chauffant aérobie thermophile dans un réacteur biologique séquentiel (AT-RBS), étudié au laboratoire du Prof. Pierre Juteau comme traitement du lisier de porc brut,

² La DCO et la DBO sont des mesures indirectes de la concentration en matière organique

consiste en une aération continue lors de laquelle les micro-organismes mésophiles, en oxydant la matière organique, produisent de la chaleur. Puisque cette chaleur est en bonne partie conservée, la température du système augmente et des micro-organismes thermophiles succèdent aux organismes mésophiles. Ces derniers continuent à élever la température grâce à une production de chaleur par le même mécanisme que leurs prédécesseurs. La température est maintenue grâce au rapport surface-volume du réacteur. Cette élévation de température va de pair avec celle du pH, causant la cristallisation d'une partie de l'ortho-phosphate en struvite et en hydroxyapatite (Juteau *et al.*, 2004a). De plus, l'élévation de la température et du pH provoquent la volatilisation de l'azote ammoniacal, lequel est ensuite adsorbé par une solution acide pour prendre la forme de sels d'ammonium (Juteau *et al.*, 2004a). Peu de boues, de biomasse ou de solides sont produits lors du traitement (Beudet *et al.*, 1990; LaPara et Alleman, 1999). Les sous-produits stables générés par ce traitement (solides riches en phosphore, en azote organique et en matière organique stabilisée, et solution concentrée de sels d'ammonium) peuvent être valorisés comme fertilisants de bonne qualité et facilement exportables en dehors des régions qui ont des excédants d'engrais organique. Néanmoins, tous les polluants ne sont pas entièrement éliminés par ce traitement. Les concentrations résiduelles en carbone (472 mg/L d'acétate et 6487 mg/L de DCO), en azote (1200 mg/L de N-NH₃) et en phosphore (307 mg/L de P-PO₄) dans l'effluent du traitement AT-RBS sont encore trop importantes pour permettre le rejet au cours d'eau ou la réutilisation comme eau de lavage dans les porcheries. Pour arriver à diminuer, plus encore, les concentrations résiduelles, il est nécessaire d'étudier des procédés complémentaires à ce premier traitement.

1.3. Traitement biologique séquentiel

Il est possible d'utiliser un procédé de boues activées comme traitement complémentaire au bioréacteur thermophile. Pour traiter à la fois la charge organique, l'azote et le phosphore dans un système à boues activées, il est nécessaire que l'eau soit exposée à diverses conditions (aérobie, anoxie, anaérobie). Comme les traitements conventionnels de ce type sont opérés avec une alimentation continue, cela signifie que plusieurs bassins successifs équipés de conduites de recirculation de la biomasse doivent être utilisés. Il en résulte un procédé complexe qui est mal adapté pour une implantation sur une ferme. L'alternative que nous proposons est d'utiliser un seul bassin opéré en cuvée plutôt qu'en continu et de faire varier les conditions (aérobie, anoxie,

anaérobie) dans le temps. Ce réacteur biologique séquentiel (RBS) permet la cohabitation, dans un même bassin, des communautés microbiennes spécialisées, ce qui permet d'éliminer tous les polluants d'un même affluent. L'efficacité des RBS pour traiter les eaux usées animales a bien été démontrée depuis les deux dernières décennies (Zhu *et al.*, 2006). C'est ce type de traitement qui a été choisi lors de la présente étude afin d'éliminer les polluants résiduels dans l'effluent du traitement AT-RBS.

1.3.1. Élimination des composés azotés

1.3.1.1. La nitrification

À la sortie du traitement AT-RBS, une grande partie de l'azote résiduel est retrouvé sous la forme ammoniacale ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). La nitrification est le processus de transformation de cet azote ammoniacal en nitrate (NO_3^-). Ce processus est divisé en deux réactions : la nitritation, où le NH_4^+ est oxydé en nitrite (NO_2^-), puis la nitratisation, plus rapide que la première réaction, où le NO_2^- est oxydé en NO_3^- (Metcalf & Eddy, 2003; Wett et Rauch, 2003). Les détails de cette oxydation sont présentés à la Figure 2. Les bactéries impliquées dans cette transformation étant généralement autotrophes, leur métabolisme est relativement lent (Mota *et al.*, 2005b; Third *et al.*, 2005).

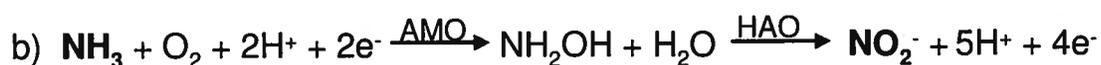


Figure 2. Équations de la nitrification. a) Étapes principales de la nitrification. b) Détails de l'étape de la nitritation. AMO = monooxygénase de l'ammoniac. HAO = oxydoréductase de l'hydroxylamine (Stein et Arp, 1998)

Les bactéries responsables de la première réaction, les bactéries oxydant l'ammonium (AOB, "Ammonia oxidizing bacteria"), sont principalement associées aux genres *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* et *Nitrosospira* alors que les bactéries effectuant la deuxième réaction, les bactéries oxydant le nitrite (NOB, "Nitrite oxidizing bacteria"), sont majoritairement membres des genres *Nitrobacter*, *Nitrococcus* et *Nitrospina* (Head *et al.*, 1993; Arp *et al.*, 2002;

Westerman et Bicudo, 2002; Metcalf & Eddy, 2003; Mota *et al.*, 2005b). Ces bactéries ont un taux de croissance très lent (Gieseke *et al.*, 2001).

Les OAB possèdent deux enzymes co-dépendants, nécessaires pour conserver leur énergie pendant le processus d'oxydation : la monooxygénase de l'ammoniac (AMO), qui catalyse l'oxygénation de l'ammonium en hydroxylamine, puis l'oxydoréductase de l'hydroxylamine (HAO), qui procure les électrons nécessaires à la première oxygénation en oxydant l'hydroxylamine en nitrite (Stein et Arp, 1998; Bothe *et al.*, 2000) (Figure 2.b). L'oxydation de l'azote ammoniacal est une réaction acidogène, c'est-à-dire que l'oxydation de cette dernière fait diminuer le pH du milieu, ce qui débalance l'équipibire $\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$ pour favoriser la présence du NH_4^+ au détriment du NH_3 . L'oxydation de l'ammonium est donc arrêtée à un pH de 6, alors que la concentration de NH_3 est très réduite (Stein et Arp, 1998).

La concentration d'oxygène dissous (OD) critique en deçà de laquelle la nitrification n'a plus lieu est 0.2 mg/L (Pochana et Keller, 1999). La croissance et l'activité des bactéries nitrifiantes diminuent dramatiquement à un pH inférieur à 7 (Cheng et Liu, 2001; Wett et Rauch, 2003).

1.3.1.2. La dénitrification

La dénitrification est un processus respiratoire lors duquel les bactéries utilisent le nitrate et d'autres oxydes azotés inorganiques comme accepteurs d'électron alternatifs lorsque l'oxygène est absent ou en concentrations très limitées. La chaîne de réaction de la dénitrification est présentée à la Figure 3. La première étape de la dénitrification est la réduction du nitrate en nitrite, catalysée par la nitrate réductase. Cette réaction n'est pas unique à la dénitrification : elle a aussi lieu lors de l'ammonification et lors de l'assimilation du nitrate en azote organique. La seconde étape de la dénitrification est la réduction du nitrite en oxyde nitreux (NO). Cette réaction, catalysée par des nitrite réductases, est seulement retrouvée chez les bactéries dénitrifiantes (Tosques *et al.*, 1997). La dénitrification est effectuée principalement par des bactéries hétérotrophes ayant une préférence pour des sources de carbone organique facilement assimilables qui leur servent aussi de source d'énergie (Pochana et Keller, 1999; Westerman et Bicudo, 2002). Ces sources en carbone sont très diversifiées : acétate, méthanol, éthanol, glucose, (Pochana et Keller, 1999), polyhydroxyalkanoates (PHA) (Hiraishi et Khan, 2003), pour ne nommer que ces dernières. Les PHA sont peut-être le substrat le plus efficace car ils sont eux-

mêmes des composés de stockage bactérien, donc on croit qu'ils peuvent être métabolisés par une vaste variété de micro-organismes (Hiraishi et Khan, 2003). Lors de la dénitrification, la réduction du NO_2^- est environ 1.8 fois plus rapide que la réduction du NO_3^- (Wett et Rauch, 2003).



Figure 3. Équation de la dénitrification

Les genres bactériens responsables de la dénitrification sont très diversifiés (Henze *et al.*, 2000; Westerman et Bicudo, 2002; Metcalf & Eddy, 2003). Quoique la dénitrification soit optimale en absence totale d'oxygène, des activités réductrices d'azotes ont été observées à des faibles concentrations d'OD (Filali-Meknassi *et al.*, 2005; Mota *et al.*, 2005a). La concentration d'OD au-dessus de laquelle la dénitrification commence à diminuer est de 0.2 mg O_2/L (Pochana et Keller, 1999). Le dioxygène inhibe partiellement la synthèse de la nitrate réductase, alors que la nitrite réductase est complètement inhibée par la moindre présence de dioxygène (Mota *et al.*, 2005a).

1.3.1.3. La nitrification et la dénitrification en simultané

Dans un RBS, la nitrification et la dénitrification peuvent avoir lieu dans un même réservoir de façon séquentielle. Ce type de traitement est constitué d'une période d'aération suivie d'une période d'anoxie. Dans un tel système, il est avantageux de réduire l'aération au temps minimal requis pour que tout l'ammonium soit oxydé. Ceci a pour effet de minimiser l'oxydation de substrats organiques de façon aérobie afin de conserver ces substrats essentiels pour l'étape subséquente de dénitrification anaérobie (Third *et al.*, 2005). Malgré les efforts de conservation de la source de carbone pour l'étape de dénitrification, le carbone retrouvé après la période aérobie est souvent insuffisant pour permettre une bonne dénitrification. Dans ce cas, il est nécessaire d'ajouter une source de carbone externe ou d'ajouter, à cette étape, de l'affluent brut riche en carbone organique (Filali-Meknassi *et al.*, 2005).

La nitrification et la dénitrification en simultané (SND : *simultaneous nitrification and denitrification*) est l'utilisation d'un seul réservoir dans lequel la nitrification et la dénitrification

ont lieu en même temps, sous des conditions d'opération pratiquement similaires (Munch *et al.*, 1996). Elle nécessite une aération minimale permettant de soutenir les réactions oxydantes des bactéries nitrifiantes sans inhiber les réactions réductrices des bactéries dénitrifiantes. Ceci implique que des réactions de dénitrification peuvent avoir lieu dans des conditions aérobies et que des réactions de nitrification sont possibles à des concentrations très faibles en dioxygène dissout (Collivignarelli et Bertanza, 1999). La taille des floccs est une caractéristique très importante pour l'efficacité du système SND. Au centre des gros floccs (50-110 μm), il y a une zone au-delà de laquelle la concentration en dioxygène dissout est nulle (Pochana et Keller, 1999). Cette région d'anoxie peut abriter des organismes qui effectuent la dénitrification alors que la nitrification a lieu dans la région périphérique du flocc. Cette zone d'anoxie est plus restreinte dans les floccs microbiens plus petits, ce qui limite l'implantation de la biomasse dénitrifiante en condition d'aérobie (Munch *et al.*, 1996; Westerman et Bicudo, 2002; Metcalf & Eddy, 2003) (Figure 4). Ce concept permet de réduire les coûts d'opération reliés à l'aération de près de 50 %, tout en effectuant aussi efficacement et rapidement les deux procédés biologiques (Collivignarelli et Bertanza, 1999; Pochana et Keller, 1999; Mota *et al.*, 2005a).

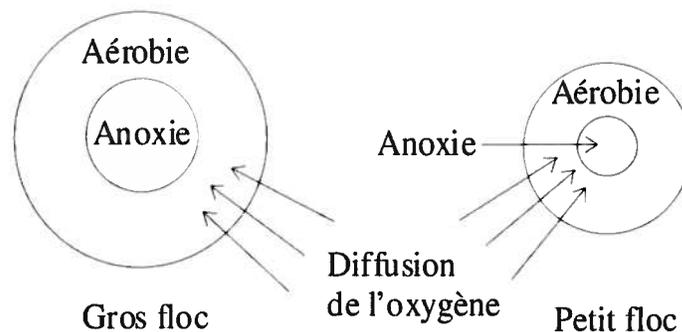


Figure 4. Influence de la taille des floccs sur le ratio des zones aérobie:anoxie dans un flocc de boues activées. Modifié à partir de Pochana et Keller (1999).

En examinant les formules de nitrification et de dénitrification (Figures 2 et 3), on observe que le nitrite est un produit intermédiaire pour les deux réactions. Des chercheurs ont démontré que l'efficacité de la SND peut s'accroître si le procédé de la nitrification arrête à la production du nitrite et que la dénitrification utilise le nitrite plutôt que le nitrate comme substrat (Gibbs *et al.*, 2004; Mota *et al.*, 2005a). Étant donné que le lisier contient un faible ratio carbone/azote, un des intérêts stimulant la recherche sur cette SND via le nitrite est que ce concept permet d'économiser 40 % des besoins en carbone par rapport à la SND via le nitrate (Zeng *et al.*,

2003a; Mota *et al.*, 2005a). Pour parvenir à une SND à partir du nitrite, la concentration en dioxygène dissout dans le milieu doit être suffisamment basse pour que le nitrite produit lors de la nitrification partielle soit ensuite réduit en N_2 plutôt qu'oxydé en NO_3 (Gibbs *et al.*, 2004). Les AOB sont plus tolérants à de faibles concentrations en OD que les NOB, ce qui avantage l'accumulation du nitrite (Mota *et al.*, 2005a). De plus, il a été démontré que la présence d'ammonium stimule la réduction du nitrite, et que la dénitrification diminue clairement dès qu'il n'y a plus d'ammonium (Gibbs *et al.*, 2004). Alors, à une concentration d'OD d'environ 0.5 mg O_2/L et en présence d'ammonium, le nitrite issu de la nitrification est réduit à 70% plutôt qu'oxydé (Munch *et al.*, 1996; Gibbs *et al.*, 2004). Pour parvenir à une dénitrification complète, il est nécessaire d'entrecouper les périodes d'aération par des périodes de non-aération pour permettre une synthèse optimale de la nitrate réductase en absence totale de dioxygène (Mota *et al.*, 2005a). L'augmentation de la quantité d'acétate garantit le stockage d'énergie réductrice pour la respiration. L'augmentation de l'énergie réductrice (PHA) permet d'améliorer la réduction du nitrite (Gibbs *et al.*, 2004). Il est important de ne pas laisser le nitrite s'accumuler en trop grandes concentrations car des études ont démontré sa toxicité sur l'activité de l'AMO chez certaines bactéries (Stein et Arp, 1998).

1.3.2. La déphosphatation

Contrairement au traitement des composés azotés, le phosphore traité n'est pas transformé en composé volatile (Henze *et al.*, 2000). L'objectif du traitement du phosphore est de convertir les phosphates dissous en phosphore particulaire, lequel est ensuite retenu par un procédé de séparation telle la décantation. Il peut s'agir de complexes inorganiques de phosphore résultant de la précipitation chimique des phosphates dissous, de phosphore organique incorporé au matériel de base des cellules (ex. : ADN), ou bien des polyphosphates entreposés par les cellules en tant que substance de réserve énergétique (Henze *et al.*, 2000).

1.3.2.1. La déphosphatation par des mécanismes physico-chimiques

L'élimination du phosphore par des procédés physico-chimiques peut avoir lieu en 4 étapes : la précipitation, la coagulation, la floculation et la séparation (Henze *et al.*, 2000). La précipitation et la coagulation se font très rapidement et ont lieu presque simultanément. La

précipitation est la conversion des orthophosphates solubles et du phosphore organique en solides à faible solubilité par l'addition de sels métalliques, tels le fer, l'aluminium, le calcium ou le magnésium (Henze *et al.*, 2000; Vanotti *et al.*, 2003; Parent *et al.*, 2007). Lors de la coagulation, ces petites particules colloïdales de moins de 1µm forment des particules primaires de 10 à 50 µm avec d'autres particules colloïdales déjà présentes dans les eaux usées (Henze *et al.*, 2000). Les particules primaires se regroupent ensuite en particules plus grosses lors de la floculation. Les floes ainsi formés, contrairement aux particules primaires, ont la capacité de sédimenter (Henze *et al.*, 2000). La séparation a finalement lieu soit par sédimentation ou par flottation (Henze *et al.*, 2000). Malheureusement, l'ajout d'ions métalliques est une stratégie qui augmente le volume de solides générés et augmente la salinité de l'effluent final (Seviour *et al.*, 2003). De plus, les produits riches en phosphore obtenus suite à cette précipitation chimique ne sont pas nécessairement directement utilisables en agriculture (Kostura *et al.*, 2005).

Une autre méthode d'élimination du phosphore en solution aqueuse est l'addition d'une étape où la rétention de ce dernier est rendue possible grâce à un matériel hautement adsorbant incorporé au matériel de filtration (Johansson et Gustafsson, 2000). Lorsque l'agent adsorbant est saturé en phosphore, celui-ci peut être revalorisé en agriculture et remplacé par du nouveau matériel dans le filtre (Johansson et Gustafsson, 2000). Les matériaux dont l'adsorption est étudiée de la sorte sont principalement les zéolithes, l'opoka et les scories d'aciérie (Sakadevan et Bavor, 1998; Johansson et Gustafsson, 2000; Kostura *et al.*, 2005). Les zéolithes sont des silices d'aluminium retrouvés comme minéraux naturels ou synthétisés artificiellement (Sakadevan et Bavor, 1998). L'opoka est une roche sédimentaire siliceuse très poreuse (Johansson et Gustafsson, 2000). Les scories d'aciérie sont un sous-produit de l'industrie de l'acier dérivé de la séparation du fer des minerais de castine, de fer et de coke (Sakadevan et Bavor, 1998; Johansson et Gustafsson, 2000). Ces dernières, en plus d'être très peu coûteuses, ont une capacité d'adsorption particulièrement élevée, soit de 44.2 g P kg⁻¹ de scories (Sakadevan et Bavor, 1998).

1.3.2.2. La déphosphatation biologique

La déphosphatation biologique est l'aptitude de certains organismes à accumuler de grandes quantités de phosphore. Tous les organismes vivants ont besoin de phosphore (Kornberg *et al.*, 1999). Les besoins en phosphore requis pour la croissance bactérienne normale atteignent environ 1.5 à 2 % de leur poids sec (Blackall *et al.*, 2002). Certains procédés d'optimisation de la

déphosphatation biologique parviennent à enrichir le contenu en phosphore jusqu'à 15 % du poids sec de la biomasse totale (Crocetti *et al.*, 2000). La forme de phosphore retrouvée dans les eaux usées est principalement l'orthophosphate (Vanotti *et al.*, 2003). Les organismes accumulateurs de phosphates (PAO, "Phosphore accumulating organisms") sont les principaux acteurs d'intérêt du procédé EBPR. Le phosphate assimilé par ces derniers est emmagasiné à l'intérieur des cellules sous la forme de polyP inorganique. Ce polymère consiste en une chaîne linéaire de trois à plusieurs centaines de résidus phosphate reliés ensemble par des liens phosphoanhydrides à haute énergie (Kornberg *et al.*, 1999) (Figure 5).

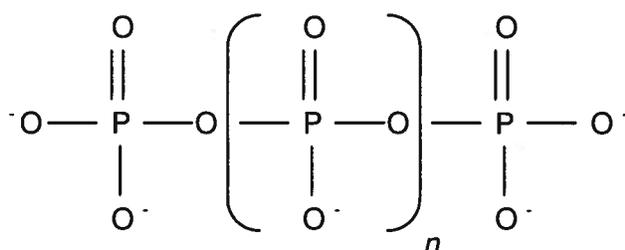


Figure 5. Structure du polyphosphate inorganique. La valeur du n dans les longues chaînes est habituellement supérieure à 100 (Kornberg *et al.*, 1999).

Tous les procédés EBPR ont en commun une même biomasse qui subit de façon cyclique les conditions d'anaérobie et d'aérobie (Hollender *et al.*, 2002). Les PAO profitent de leur capacité à assimiler des sources de carbone (donneuses d'électrons) en absence d'un accepteur d'électron lors de la phase initiale anaérobie du traitement (van Loosdrecht *et al.*, 1997; McGrath et Quinn, 2003; Yagci *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2007). Les sources de carbone les plus utilisées par les PAO sont les acides gras volatiles à courte chaîne, principalement l'acétate et le propionate. Ces acides gras volatiles ne sont pas utilisés pour la croissance cellulaire mais pour la synthèse de réserves intracellulaires de carbone et d'énergie sous forme de poly-β-hydroxyalkanoates (PHA), principalement du poly-β-hydroxybutyrate (PHB) (Smolders *et al.*, 1994; Yagci *et al.*, 2003). Les réserves en polyP des PAO sont alors utilisées comme source d'énergie pour permettre l'assimilation des acides gras volatiles et le stockage de ces derniers sous la forme de PHA en absence d'oxygène. L'hydrolyse des réserves de polyP implique le relâchement d'orthophosphate dans le milieu extracellulaire (Smolders *et al.*, 1994; Mino *et al.*, 1998; Yagci *et al.*, 2003). La glycolyse des réserves de glycogène internes constitue aussi l'énergie réductrice nécessaire pour former les PHA, en plus de l'hydrolyse des polyP (van Loosdrecht *et al.*, 1997; Mino *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2007).

Ensuite, lors d'une phase aérobie et en absence de source de carbone (famine), ces organismes peuvent croître en utilisant le substrat accumulé en période anaérobie, le PHA, fabriquer de nouveau leurs réserves de glycogène et re-assimiler les phosphates afin de les convertir en polyP intracellulaire, dans l'objectif de pouvoir profiter à nouveau de l'assimilation d'acides gras volatiles lors d'une prochaine période anaérobie (van Loosdrecht *et al.*, 1997; McGrath et Quinn, 2003). Ces organismes assimilent alors l'orthophosphate relargué précédemment ainsi que presque tout le phosphate disponible dans l'environnement (McGrath et Quinn, 2003). Près de 30 % des réserves de PHA formées en phase d'anaérobie sont consommées pendant la phase aérobie (McGrath et Quinn, 2003). Les principes de la déphosphatation biologique sont illustrés à la Figure 6.

Cette aptitude à assimiler efficacement les sources de carbone disponibles en absence d'oxygène confère aux PAO un précieux avantage compétitif comparativement aux autres organismes hétérotrophes présents dans le système. Sous des conditions favorables, les procédés EBPR peuvent retirer de 80 à 90 % du phosphate présent dans l'affluent, atteignant des concentrations de phosphate résiduel inférieures à 1 mg/L et produisant des boues contenant des polyphosphates jusqu'à 15 % de leur poids sec (Streichan *et al.*, 1990). Il est important de bien établir les conditions de famine précédant la phase aérobie car la présence d'acétate pourrait induire le relargage d'orthophosphate dans le milieu extracellulaire, même en condition aérobie (van Loosdrecht *et al.*, 1997).

En opération optimale, les procédés EBPR sont relativement peu dispendieux et sont une option durable pour l'enlèvement du phosphore. Par contre, leur stabilité et leur fiabilité peuvent parfois faire défaut. Les performances peuvent se détériorer considérablement. Il est primordial de mieux comprendre ce processus microbien afin d'optimiser les conditions permettant la domination de la microflore désirée. Afin d'améliorer les performances déphosphatantes, des chercheurs ont même incorporé, par génie génétique, les gènes codant pour le système Pst (transport spécifique du phosphate) et la PPK (polyphosphate kinase, enzyme participant à la voie de synthèse primaire du polyP chez les bactéries (Kornberg *et al.*, 1999) à certaines souches bactériennes afin de permettre une accumulation de polyP atteignant 48 % du poids cellulaire sec (Hardoyo *et al.*, 1994).

1.3.3. La nitrification, dénitrification et EBPR en simultané.

La nitrification, dénitrification et EBPR (NDEBPR) en simultané, comme la SND, possède plusieurs avantages, tels l'économie d'énergie et du coût d'opération de l'usine de traitement, une production de biomasse réduite, et une maximisation de la quantité de DCO disponible pour l'élimination des polluants azotés et du phosphore (Kuba *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 2006; Miyauchi *et al.*, 2007; Oehmen *et al.*, 2007). Certains PAO ont la capacité d'accumuler le phosphore en utilisant le nitrate ou le nitrite comme accepteur final d'électron, plutôt que le dioxygène (Kuba *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 2003a; Martin *et al.*, 2006; Oehmen *et al.*, 2007). Ces derniers sont nommés DPAO. Une étude métagénomique d'une communauté de boues activées effectuant une EBPR a révélé que les bactéries dominantes possèderaient les gènes pour effectuer la dénitrification à partir du nitrite, alors que la nitrate réductase serait absente (Martin *et al.*, 2006).

Ceci suggère que la communauté EBPR pourrait, en plus d'accomplir la déphosphatation, effectuer la dénitrification à partir du nitrite, avec tous les avantages reliés à cette stratégie décrits à la section 1.3.1.3.

1.4. Microbiologie de la déphosphatation

Jusqu'à présent, aucun organisme ayant toutes les caractéristiques des cultures mixtes déphosphatantes n'a été isolé (van Loosdrecht *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003; Yeates et Blackall, 2006). On a longtemps pensé que des souches d'*Acinetobacter* sp., des γ -*proteobacteria*, étaient responsables de la déphosphatation biologique dans les biotraitements des eaux usées car ces dernières croissaient généralement en grande quantité sur les géloses, avec une très grande capacité d'accumulation des polyphosphates lorsque mis en présence d'acides gras volatils à faible poids moléculaire comme l'acétate (van Loosdrecht *et al.*, 1997). Cette hypothèse a ensuite été rejetée car de nouvelles études de ces cultures pures ont démontré, entre autres, leur incapacité à accumuler l'acétate en absence d'un accepteur d'électron et leur inaptitude à accumuler l'orthophosphate en absence d'un substrat externe tel l'acétate (van Loosdrecht *et al.*, 1997). Kampf et al. (1996) ont démontré qu'*Acinetobacter* ne représentait que 0 à 5 % de la communauté de boues des systèmes EBPR. Ces dernières seraient avantagées par les conditions de croissance sur géloses, expliquant pourquoi elles y sont retrouvées en plus grand nombre.

D'autres bactéries ont démontré leur capacité à accumuler de grandes réserves de polyphosphates. C'est le cas de *Micrococcus phosphovorius*, une coque à Gram positif à l'apparence d'une petite lune (0.8 à 2.0 μm) isolée à partir de boues activées soumises à des conditions d'alternance entre l'anaérobie et l'aérobie (Nakamura *et al.*, 1995a). En culture pure, cette dernière se retrouve soit seule, en paires ou en petits amas (Nakamura *et al.*, 1995a). Dans un environnement exempt de carbone et supplémenté en phosphate exogène, son contenu en phosphore peut atteindre jusqu'à 10 % de son poids sec suite à l'exposition à des conditions aérobies (Nakamura *et al.*, 1995a). Dans le procédé de dénitrification, *M. phosphovorius* a la capacité de réduire le nitrate uniquement en nitrite et peut utiliser le nitrate comme accepteur final d'électron (Nakamura *et al.*, 1995a). Cette bactérie n'assimile toutefois pas l'acétate et synthétise du glycogène plutôt que des PHA comme composé interne (Nakamura *et al.*, 1995b), ce qui rejette sa candidature en tant que principale PAO des systèmes EBPR.

Des *Lampropedia* sp. ont été isolées d'un RBS effectuant la EBPR et ces dernières ont démontré leur capacité à stocker des PHB à partir de l'assimilation d'acétate et de relâcher en même temps de l'orthophosphate sous des conditions anaérobies. Bien que ces dernières possédaient les caractéristiques métaboliques des PAO, ces bactéries étaient caractérisées morphologiquement par un arrangement cellulaire ressemblant à une toile, ce qui n'est aucunement commun dans les procédés EBPR (Mino, 2000).

Une étude de la communauté bactérienne composant les boues EBPR par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) a révélé la présence de 36 % d' α -*proteobacteria*, 36% de β -*proteobacteria*, 10 % de γ -*proteobacteria* et 3 à 6 % d'*Acinetobacteria* (Wagner *et al.*, 1994). Un peu plus tard, une étude comparative a été menée en construisant des génothèques à partir de l'ADNr 16S de communautés bactériennes composant des boues déphosphatantes et non déphosphatantes (Bond *et al.*, 1995). Cette dernière étude a révélé la prédominance de la classe des β -*proteobacteria* au sein de la biomasse déphosphatante comparativement à la biomasse non-déphosphatante, dont un groupe de bactéries apparenté au genre *Rhodocyclus* qui était particulièrement important.

Plus tard, une étude de la biomasse provenant d'un réacteur enrichi pour la déphosphatation biologique (EBPR) a été menée en élaborant une génothèque à partir des fragments d'ADNr 16S de cette biomasse (Hesselmann *et al.*, 1999). Cette étude a permis de révéler l'importance de l'abondance de l'ADNr 16S provenant du sous-groupe 2 des β -*proteobacteria* qui se rapproche de *Rhodocyclus* sp. Cette bactérie a été nommée « *Candidatus Accumulibacter Phosphatis* ». À partir de ce moment, plusieurs équipes de chercheurs ont étayé cette découverte en approfondissant les connaissances au sujet de cette bactérie. L'équipe de Crocetti *et al.*, (2000) a développé trois sondes à oligonucléotides (sondes PAO) ciblant spécifiquement « *Ca. Accumulibacter* » à partir des séquences d'ADNr 16S dominantes associées au groupe *Rhodocyclus* obtenues par clonage et a observé en même temps la fluorescence des sondes dans les organismes positifs à la coloration DAPI colorant spécifiquement les polyphosphates. Ces bactéries sont caractérisées par un phénotype de coccobacilles à Gram négatif, positives à la coloration Neisser et regroupées en amas de plusieurs centaines de cellules (Crocetti *et al.*, 2000). Les bactéries obtenues en culture pure étant les plus phylogénétiquement rapprochées aux séquences de ces clones de β -2-*proteobacteria* sont *Rhodocyclus tenuis*, *R. purpureus* et *Propionibacter pelophilus* (Crocetti *et al.*, 2000). Une corrélation positive a été effectuée entre le

pourcentage de phosphore présent dans les boues et le nombre de sondes PAO liées aux cellules. Les résultats ajoutent à la confirmation que les sondes développées ont véritablement comme cible des PAO (Crocetti *et al.*, 2000). À l'échelle cellulaire, il a été démontré que les transformations de l'acétate, du phosphore et du PHA ont lieu de la même façon que dans les consortiums mixtes de boues EBPR (Hesselmann *et al.*, 1999; Crocetti *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2003b).

Une des raisons expliquant la difficulté à isoler les « *Ca. Accumulibacter* » réside peut-être dans la nature « statique » des conditions de mises en culture utilisées jusqu'à présent. Effectivement, « *Ca. Accumulibacter* » retire un avantage compétitif très fort de sa capacité à s'adapter à des conditions changeantes (van Loosdrecht *et al.*, 1997).

1.5. Les bactéries compétitrices aux PAO

Pour des raisons inconnues, il arrive que l'efficacité de la déphosphatation d'un traitement EBPR chute drastiquement. Une hypothèse expliquant ces événements suggère que des micro-organismes autres que les PAO ont la capacité d'assimiler la source de carbone pendant les périodes anaérobies comme le font les PAO, sans toutefois effectuer les transferts de phosphates (Filipe *et al.*, 2001a; Yeates et Blackall, 2006). Des photos publiées par Liu *et al.* (1996) présentent clairement des bactéries capables de séquestrer du carbone en condition anaérobie sans effectuer les transferts de phosphates. Trois types morphologiques ont alors été associés à ce phénomène : (1) de petites coques en paires, en tétrades et en agrégats, (2) de grosses coques apparaissant en groupe de huit cellules ou plus et (3) de larges coques ovales en paires (Liu *et al.*, 1996). Ces organismes non déphosphatants qui entrent en compétition avec les PAO pour assimiler la source de carbone en condition anaérobie ont comme source d'énergie du glycogène qu'ils génèrent en condition aérobie et qu'ils hydrolysent en condition anaérobie (Crocetti *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2003c). Pour cette raison, ils sont nommés organismes accumulateurs de glycogène (GAO) ou bactéries G, à cause de leur capacité à assimiler le glucose (Blackall *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 2003c; Yeates et Blackall, 2006). Les premières à avoir été identifiées comme telles sont des coques organisées en tétrades appartenant à la classe des *α -proteobacteria* (Blackall *et al.*, 1997; Oehmen *et al.*, 2006). Le phénotype GAO n'a pas encore été observé en culture pure, mais des approches moléculaires ont permis d'identifier un GAO présent en abondance dans des RBS opérés pour favoriser la domination de cet organisme

(Crocetti *et al.*, 2002; Yeates et Blackall, 2006). Ce dernier a été nommé « *Candidatus Competibacter phosphatis* » ou « *Ca. Competibacter* » et fait partie de la classe des *γ-proteobacteria* (Crocetti *et al.*, 2002).

Parmi les facteurs affectant la compétition entre les PAO et les GAO, on note le ratio DCO/P dans l'affluent. Des études démontrent qu'un ratio DCO/P élevé (> 50 mg DCO / mg P) a tendance à favoriser la croissance des GAO, au détriment des PAO (Mino *et al.*, 1998). Un ratio DCO/P plus faible (10-20 mg DCO / mg P) est plus favorable à la croissance des PAO.

La source de carbone a aussi une influence sur la compétition entre les PAO et les GAO. Des études récentes suggèrent que le propionate pourrait être un substrat plus favorable que l'acétate afin d'augmenter l'abondance de « *Ca. Accumulibacter* » par rapport à « *Ca. Competibacter* » puisque la première bactérie a la possibilité d'assimiler les deux substrats à un taux identique alors que la seconde consomme le propionate à un taux inférieur à 5 % de sa consommation d'acétate (Pijuan *et al.*, 2004; Oehmen *et al.*, 2006). Par contre, un autre groupe de GAO, un *α-proteobacteria* non-cultivé se rapprochant de *Defluviicoccus* sp., a récemment été identifié et a démontré sa capacité à assimiler le propionate plus efficacement que l'acétate (Oehmen *et al.*, 2005b; Burow *et al.*, 2007; Wong et Liu, 2007). Ceci a remis en question l'avantage de l'utilisation du propionate pour optimiser les systèmes EBPR. Récemment un groupe de recherche est parvenu à éliminer presque complètement les GAO en alternant périodiquement, dans un système EBPR de format laboratoire, entre l'acétate et le propionate comme seule source de carbone (Lu *et al.*, 2006). Cette stratégie a permis d'obtenir une biomasse très enrichie en « *Ca. Accumulibacter* », probablement dû au fait que cette dernière peut passer d'un substrat à l'autre au même taux d'assimilation, alors que les GAO aptes à bien assimiler l'un ou l'autre des substrats sont deux populations totalement différentes. Cette alternance de source de carbone est toutefois une stratégie difficile à appliquer à des effluents non-synthétiques dans des usines à pleine échelle.

Le glucose est la source de carbone qui a été la plus étudiée après les acides gras volatils. L'addition de ce dernier à l'affluent stimule la biomasse déphosphatante de façon similaire à l'acétate. Effectivement, on croit que le glucose est fermenté en acétate et en propionate par d'autres organismes dans le système, et que les PAO utilisent ensuite ces acides gras volatils (Oehmen *et al.*, 2007). Bien souvent, les systèmes EBPR supplémentés en glucose comme source de carbone se détériorent par la prolifération de GAO. On croit que ce glucose extracellulaire

peut remplacer le glycogène stocké dans les cellules et servir de source d'énergie et d'agent réducteur pour l'accumulation des PHA. Ceci réduirait la dépendance pour les polyP et donc sélectionnerait les GAO préférentiellement aux PAO (Mino *et al.*, 1998).

Le pH influence fortement la compétition entre les PAO et les GAO. L'excrétion de l'orthophosphate par les PAO en condition d'anaérobie est croissant à un pH ambiant allant de 5.5 à 8.5 (Smolders *et al.*, 1994). Ceci est dû au fait que l'énergie nécessaire pour transporter les acides gras volatils à travers la membrane est supérieure à un pH élevé, et que cette énergie est générée par une dégradation accrue des réserves de polyphosphates (Filipe *et al.*, 2001c). En conditions d'aérobie, un pH de 6.5 et moins inhibe l'assimilation de l'orthophosphate, l'utilisation du PHA et la croissance cellulaire, alors que ces activités commencent à se produire moins efficacement à un pH supérieur à 8.0. D'un autre côté, le taux d'assimilation de l'acétate chez les GAO diminue alors que le pH augmente (Filipe *et al.*, 2001a). Un pH de 7.25 est le point critique sous lequel les GAO ont la capacité d'assimiler les acides gras volatils en condition d'anaérobie plus rapidement que les PAO, et au-dessus duquel la situation s'inverse (Filipe *et al.*, 2001b). Un pH situé entre 7.5 et 8.0 autant en anaérobie qu'en aérobie serait donc optimal pour un système EBPR avec une dominance en PAO (Bond *et al.*, 1999; Oehmen *et al.*, 2005a).

Finalement, la température a aussi une influence sur la compétition entre les PAO et les GAO. Les PAO sont des organismes mésophiles à la limite psychrophiles et dominant dans les communautés des systèmes des EBPR à une température de 20 °C et moins. Les GAO sont quant à eux des organismes mésophiles profitant d'une température optimale entre 25 °C et 32.5 °C (Panswad *et al.*, 2003).

1.6. Isolement des bactéries d'intérêt

Les méthodes traditionnelles de l'étude des micro-organismes impliquent avant tout l'obtention de cultures pures. Selon Koch (1881), les organismes devaient nécessairement être isolés avant que l'on procède à des études d'identification à leur sujet et avant la description d'espèces nouvelles (van Loosdrecht *et al.*, 1997). Afin d'obtenir des cultures pures de micro-organismes provenant d'un consortium microbien, la méthode d'ensemencement par dilutions sur géloses a été introduite. Les colonies visibles (10^6 cellules) obtenues par cette technique proviennent toutes d'une unique cellule qui s'est reproduite depuis 20 générations (van Loosdrecht *et al.*, 1997). Les bactéries ainsi isolées peuvent être identifiées en caractérisant leur

métabolisme et leur morphologie par une batterie de tests. Aujourd'hui, on peut aussi procéder à une extraction d'ADN total et en amplifiant l'ADNr 16S, lequel est séquencé et comparé à une banque de séquences.

Cette méthode pose toutefois un problème lorsqu'il s'agit d'étudier la diversité et la dynamique d'un consortium microbien de boues activées puisque seulement 5 à 15 % du nombre bactérien observé en microscopie parvient à croître sur les milieux de cultures, même lorsque ceux-ci sont optimisés pour la croissance des micro-organismes de boues activées (Wagner *et al.*, 1993; Muyzer et Smalla, 1998). L'interdépendance des organismes entre eux est possiblement une raison expliquant cette grande variation entre le compte cellulaire réel et le nombre de colonies. Cette interdépendance existant dans les systèmes où évoluent les boues activées ne serait plus retrouvée dans les conditions d'ensemencement. Le manque de connaissances sur les conditions nécessaires à la croissance de chaque bactérie présentes dans leur environnement est une autre raison expliquant l'absence de croissance de certains types cellulaires (Muyzer et Smalla, 1998).

Un autre problème associé à cette méthode est que les pressions de sélection imposées en laboratoire sont relativement différentes des facteurs de sélection retrouvés en nature ou au sein d'un bioréacteur. Ainsi, après une courte période de mise en culture, plusieurs générations d'une espèce microbienne se succèdent, évoluent, et les colonies peuvent changer considérablement en comparaison à ce qu'était l'espèce à l'origine à cause de mutations ou de pertes de plasmides (van Loosdrecht *et al.*, 1997). Ainsi, la caractérisation d'une espèce peut être biaisée par les conditions de mise en culture.

1.7. Étude d'un complexe bactérien par des méthodes non cultivables

Les techniques de biologie moléculaire ont vu le jour afin d'offrir de nouvelles opportunités pour analyser la structure et la diversité des espèces composant une communauté microbienne. Elles s'avèrent indispensables afin de caractériser des souches d'intérêt qui ne peuvent être cultivées par les méthodes traditionnelles d'isolement.

1.7.1. Identification des micro-organismes dans un complexe microbien par l'élaboration d'une génothèque 16S.

Après avoir extrait l'ADN total d'un consortium microbien, il est possible d'amplifier les séquences des gènes bactériens de l'ADN ribosomal 16S de toutes les espèces bactériennes se

retrouvant dans ce dernier grâce à un PCR effectué à l'aide d'amorces universelles (Straub et Pepper, 1994). La construction d'une génothèque à partir des gènes 16S ribosomiaux permet d'affilier les organismes présents et d'estimer leur abondance relative dans cet échantillon sans que les organismes ne soient mis en culture. Il est possible de construire une génothèque à partir de l'ADN de toute la communauté bactérienne en effectuant un PCR avec des amorces universelles des gènes 16S (Bond *et al.*, 1995; Crocetti *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006), comme est possible de construire une génothèque 16S à partir d'une sous-population d'une communauté bactérienne en utilisant des amorces spécifiques à cette sous-population (Ahn *et al.*, 2007). Il est aussi possible d'élaborer une génothèque afin de connaître la diversité d'un gène fonctionnel présent dans un échantillon (Miyachi *et al.*, 2007). Dans le présent travail, une génothèque élaborée à partir de la sous-population du RBS-2 amplifiée par les amorces spécifiques aux PAO sera privilégiée. Ces amorces PAO ont pu être identifiées en comparant des génothèques effectuées à partir des gènes 16S entiers de deux consortiums bactériens : l'un effectuant la déphosphatation biologique, l'autre pas (Crocetti *et al.*, 2000). Les séquences de nucléotides utilisées pour construire les amorces PAO étaient abondantes uniquement dans le consortium bactérien effectuant la déphosphatation biologique (Crocetti *et al.*, 2000).

1.7.2. Suivi de la complexité et du dynamisme microbien

La technique du PCR-DGGE (Gel d'Électrophorèse à Gradient Dénaturant) permet d'estimer la complexité microbienne d'un système à un moment instantané, c'est-à-dire, au moment du prélèvement d'un échantillon de ce système, sans toutefois révéler l'identité des individus. La technique du PCR-DGGE offre aussi la possibilité de suivre le dynamisme microbien dans le temps lorsque plusieurs échantillons sont prélevés à différents moments et que le profil de la complexité microbienne est comparé entre ces différents temps. Cette deuxième possibilité n'a pas été exploitée dans le présent travail. Généralement, les amorces utilisées pour l'analyse de la biomasse totale d'un consortium bactérien sont des amorces universelles des eubactéries et ciblent la région hypervariable V3 du gène de l'ARN ribosomal 16S (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer et Smalla, 1998; LaPara *et al.*, 2000; Juteau *et al.*, 2004b). Le PCR-DGGE peut aussi être utilisé pour connaître la diversité de groupes bien spécifiques de bactéries parmi une population hétérogène (Shoji *et al.*, 2006). Pour ce faire, plutôt que d'utiliser des amorces universelles, on se sert d'amorces spécifiques à un groupe plus étroit, les amorces ciblant les PAO par exemple.

La diversité des espèces est révélée grâce à la séparation des fragments d'ADN de chacune des espèces en fonction de leur température de dissociation (T_m). L'urée et le formamide sont les agents chimiques dissociant l'hélice d'ADN, présents à des concentrations croissantes du haut vers le bas du gel et agissant sur la molécule d'ADN de façon similaire à la température (Muyzer *et al.*, 1993). La concentration en agents dénaturant requise pour dénaturer la séquence d'ADN de chaque espèce est donc dépendante de la séquence en nucléotide des espèces (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer et Smalla, 1998). Lorsqu'un fragment d'ADN atteint la concentration en dénaturants correspondant au domaine dont le T_m est le plus faible, une partie du double brin d'ADN se déforme et la migration du fragment ralenti considérablement (Muyzer et Smalla, 1998). La diversité microbienne peut être évaluée par le nombre de bandes observées (LaPara *et al.*, 2000). De plus, l'intensité des bandes est un indice qualitatif de l'abondance relative des organismes associés à ces bandes au sein de la communauté bactérienne (Muyzer et Smalla, 1998). Il est possible d'affilier à une famille voire un genre à chacune des bandes en découpant ces bandes sur le gel et en procédant à un séquençage des fragments d'ADN composant ces dernières.

1.7.3. Hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

La méthode d'hybridation fluorescente *in situ* permet d'observer au microscope à épifluorescence les différentes sous-populations microbiennes dans leur contexte (Wagner *et al.*, 1993). Cette méthode permet, de plus, de quantifier une population ou une sous-population cible. Lorsque la méthode FISH est effectuée sur le même échantillon qui a servi à générer une génothèque, il est possible de confirmer les résultats d'abondance relative de différents groupes microbiens obtenus suite lors de l'élaboration de cette génothèque.

Dans une communauté microbienne complexe, les sondes (généralement des oligonucléotides) se fixent à leurs séquences complémentaires situées sur l'ARNr 16S dans les ribosomes, et ces dernières sont observables grâce au fait qu'elles sont liées à des molécules fluorescentes. Par exemple, la sonde EUB est complémentaire à une région conservée de l'ARN 16S d'une vaste majorité d'espèces bactériennes, permettant donc de visualiser et de quantifier les bactéries parmi le consortium microbien (Wagner *et al.*, 1993). De la même manière, des sondes ciblant spécifiquement les sous-classes α (sonde ALF), β (sonde BET) et γ (sonde GAM) des *proteobacteria* ont été fabriquées, rendant possible la quantification des bactéries appartenant

à ces différentes classes. En liant deux différentes sondes avec différentes molécules fluorescentes, l'hybridation de ces dernières peut être observée simultanément (Wagner *et al.*, 1993). Les sondes peuvent être fabriquées à partir des séquences identifiées comme appartenant à une sous-population d'intérêt lors de l'élaboration d'une génothèque. Il existe aussi des banques de séquences qui ont déjà été associées à différentes sous-populations d'intérêt. Par exemple, l'abondance et l'organisation des PAO peuvent être observées en utilisant une sonde PAO dont la séquence a déjà été identifiée et soumise à une banque de sondes par Crocetti *et al.*, (2000).

Les analyses par FISH ont révélé que les communautés EBPR sont dominées par des bacilles ou coccobacilles *β -proteobacteria* rassemblés en amas de différentes tailles (Ahn *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, aucune corrélation n'a pu être effectuée entre la population en PAO identifiée par FISH provenant des boues activées de différentes usines d'eaux usées et le contenu en phosphore total de ces dernières (Wong *et al.*, 2005). Par contre, une corrélation très forte entre ces deux paramètres a pu être révélée à partir des boues activées de RBS format laboratoire nourris avec de l'acétate (Crocetti *et al.*, 2000).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Affluent

Les deux RBS ont été alimentés avec du lisier de porc de la ferme d'engraissement de monsieur Marc Aubin (Prévost, Québec), qui a préalablement été traité en septembre 2005 par voie aérobie dans des AT-RBS. Jusqu'à son utilisation, l'effluent thermophile de ces bioréacteurs a été conservé dans des chaudières de 20 L à 4 °C. Les bioréacteurs thermophiles, d'une capacité de 59 L, contenaient 36 L d'effluent brute et ont été opérés dans des conditions telque décrites par Juteau et al. (2004a) : en cuvée pendant plusieurs cycle de trois jours chacun avec recirculation, avec le remplacement de 18 L à la fin d'un cycle (donc un temps de résidence hydraulique de six jours). Le procédé était autochauffant et un système de refroidissement limitait la température à 60 °C.

En industrie, est prévu que l'effluent d'un tel procédé à pleine échelle subirait ultimement une séparation solide/liquide. La fraction liquide générée serait acheminée au traitement complémentaire. Pour reproduire ce scénario en laboratoire, l'effluent thermophile a été centrifugé à 4 000 x g pendant 30 minutes à 4 °C dans une centrifugeuse de modèle Avanti J-25 (Beckman Instrument, Fullerton, CA, É.U.) avec un rotor F10BCL, dans des bouteilles de 500 mL, afin de retirer une bonne partie des solides.

Afin d'être utilisé comme affluent des bioréacteurs mésophiles, le surnageant de l'effluent des réacteurs thermophiles a été dilué avec de l'eau du robinet. La dilution était de 1/5 pour le RBS-1 et d'abord de 1/40 pour le RBS-2, puis ensuite de 1/20. Pour le RBS-2, l'effluent dilué était de plus supplémenté avec de l'acétate de sodium monohydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, É.U.) pour atteindre d'abord une concentration totale de 300 mg/L d'acétate, puis ensuite de 460 mg/L d'acétate, et du phosphate de potassium monobasique (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.U.) (RBS-2 uniquement) pour atteindre d'abord une concentration totale de 15 mg/L, puis ensuite de 30 mg/L de P-PO₄. L'objectif était d'établir les systèmes de traitement et d'adapter la biomasse de départ à l'effluent des bioréacteurs thermophiles dans des conditions favorables.

2.2. Inoculum

La biomasse de départ du RBS-2 était constituée de micro-organismes provenant d'extrait de terre et de boues activées provenant de l'usine d'épuration des eaux usées de la ville de Vaudreuil-Dorion (Québec). Cette municipalité opère son usine d'épuration des eaux usées de type RBS depuis 1996. La biomasse de départ du RBS-1 a été la biomasse du RBS-2 après 8 mois de fonctionnement en conditions de déphosphatation/nitrification/dénitrification.

2.3. Réacteur biologique séquentiel (RBS)

Chaque bioréacteur était composé d'un cylindre en PVC transparent de 5.25 cm de diamètre et de 80 cm de hauteur. Des électrodes de pH (modèle 5995-22 BB5, Cole-Parmer Instruments Co., Chicago, IL, É.U.) et d'ORP (potentiel d'oxydoréduction, modèle 27006-21 LL3, Cole-Parmer) étaient insérées dans le cylindre. Le réservoir était relié à plusieurs pompes par divers tuyaux. Les opérations ont été contrôlées par un programme informatique conçu par le Dr Pierre Juteau. Ce programme a été écrit avec le logiciel LabView 7.0 (National Instruments, Austin, TX, É.U.) sous le système d'exploitation Windows 98 (Microsoft corporation, Redmond, WA, É.U.). Un convertisseur analogique/numérique (PersonalDaq 56, Omega Engineering, Stamford, CT, É.U.) a assuré la communication entre l'ordinateur et les divers instruments. La Figure 7 présente une représentation schématique du montage d'un des RBS.

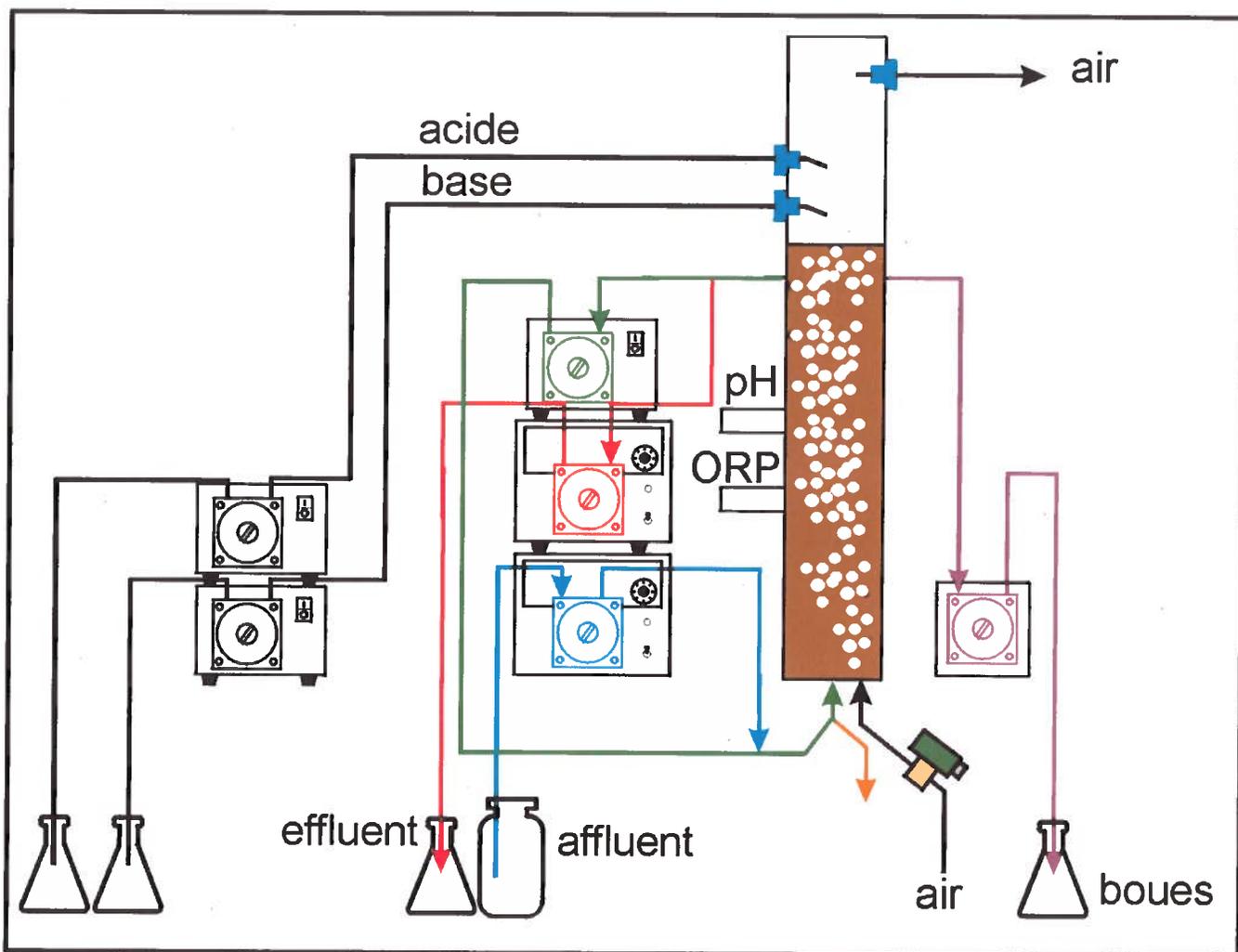


Figure 7. Montage schématisé des RBS. Les flèches en bleu démontrent l'affluent qui était acheminé au réacteur au début d'un cycle. Les flèches en rouge démontrent l'effluent qui était enlevé du bioréacteur à la fin d'un cycle. Les flèches en vert démontrent la recirculation intermittente qui était effectuée pendant les périodes d'anaérobie et d'anoxie. La pompe péristaltique était activée pendant 2 minutes à toutes les 20 minutes pour effectuer la recirculation. Les flèches violettes démontrent les boues qui étaient prélevées à la fin de la dernière période d'aération. Les fioles d'Erlenmeyer à gauche contiennent les réserves de solutions basique (NaOH 1 N) et acide (HCl 1 N). L'une ou l'autre de ces solutions était acheminée au bioréacteur par des pompes péristaltiques lorsque la sonde à pH détectait, dans le réacteur, un pH hors des limites tolérées. L'aération était effectuée à partir de la base du bioréacteur. Un ordinateur enregistrait à toutes les 5 minutes les valeurs de pH et d'ORP détectées par les sondes.

Un volume d'un litre du bioréacteur a été utilisé pour le traitement. Au début d'un cycle, la pompe d'alimentation (Masterflex Quick-load modèle 7521 pour RBS-1 et Masterflex Easyload modèle 7520-35 pour RBS-2, Cole-Parmer) était activée, acheminant l'affluent (maintenu dans une chaudière isolée et réfrigérée à 6 °C à l'aide d'un appareil de refroidissement externe Lauda de type RM 6 B) au bioréacteur. Le nouvel arrivage d'affluent se mélangeait avec les 500 mL restants du cycle précédent, lequel contenait les boues activées dans de l'effluent.

Lors des périodes anaérobies et anoxies, une pompe péristaltique (Masterflex modèle 7035-21, Cole-Parmer) assurait la recirculation de façon intermittente en prélevant du liquide en haut du bioréacteur et en l'acheminant en bas, où se trouvait la biomasse. Les périodes aérobies ont été rendues possibles grâce à l'ouverture d'une valve solénoïde (ASCO, Brantford, ON, Canada) qui permettait l'injection d'air comprimé dans le bioréacteur à partir d'un diffuseur situé à la base du réservoir. Le débit d'air était ajusté à 100 mL/min. Le temps de résidence hydraulique était de 48 h pour le RBS-1 et de 12 h pour le RBS-2. L'âge des boues était de 14 jours pour les deux bioréacteurs.

Alors que le bioréacteur était bien mélangé par l'aération, un contrôle automatique du pH était effectué. Des pompes (Masterflex C/L modèle 77120-50, Cole-Parmer) acheminant l'acide ou la base étaient activées au besoin, lorsque le pH dépassait le seuil de tolérance de 0.2 de la consigne, et ce, jusqu'à l'atteinte du pH de la consigne. La consigne pour le pH des RBS-1 et RBS-2 était respectivement de 7.8 et de 7.6. Les valeurs du pH, de l'ORP et de la température étaient affichées en temps réel à l'écran et ont été enregistrées à toutes les 5 minutes dans un fichier nommé et daté.

À la fin de la dernière période aérobie d'un cycle, la liqueur mixte était soutirée par une pompe (Masterflex easyload II modèle 77200-62, Cole-Parmer) et récoltée dans une fiole d'Erlenmeyer. À la toute fin d'un cycle, l'effluent était vidangé à l'aide d'une pompe (Masterflex modèle 7015-21 pour RBS-1 et Masterflex Easyload II 7520-35 pour RBS-2, Cole-Parmer).

Les bioréacteurs ont été opérés à la température de la pièce, variant de 20 à 30 °C.

2.4. Échantillonnage et conservation des échantillons

2.4.1. Affluent et effluent

Les échantillons de 20 à 30 mL ont été récoltés dans des contenants de plastique de 60 mL et refroidis immédiatement à 4 °C. Les échantillons d'affluents ont été prélevés à partir des récipients d'affluent réfrigérés, alors que les échantillons d'effluent ont été prélevés à la fin d'un cycle. Certains cycles ont été analysés plus en détail en récoltant des échantillons à plusieurs moments durant un même cycle. Les analyses ont été effectuées le plus rapidement possible, mais le délai entre l'échantillonnage et l'analyse a pu s'étendre jusqu'à deux semaines dans quelques cas.

2.4.2. Biomasse

Les échantillons de 20 à 30 mL la biomasse ont été récoltés dans des contenants de plastique de 60 mL. La biomasse a été soutirée sous forme de liqueur mixte, alors que les bioréacteurs étaient en période aérobie. Les analyses ont toujours été faites immédiatement après l'échantillonnage, ou avec un délai allant jusqu'à une journée. Régulièrement, un échantillon de

biomasse sous forme de liqueur mixte a été concentré par décantation, puis conservée à -79 °C dans du glycérol (ratio 1:1 de glycérol 50 %).

2.5. Analyses physico-chimiques

2.5.1. Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder la matière organique dans un échantillon sous l'activité d'un agent oxydant. Dans ce test, l'ion dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, orangé) est l'oxydant spécifique de la solution acide de dichromate de potassium. Après une digestion de l'échantillon pendant deux heures à 150 °C, l'ion dichromate est réduit en ion chromique (Cr^{3+}) ce qui rend la solution verdâtre (méthode 5220 D, APHA, AWWA et WEF, 1998), dont l'intensité est lue au spectrophotomètre. Les composants organiques et inorganiques sont tous deux sujets à l'oxydation, mais dans la plupart des cas, ce sont les composants organiques qui prédominent. La DCO est donc considérée comme une mesure indirecte de la charge organique.

Des tubes de réactifs prémélangés (Hach, Loveland, CO, É.U.) ont servi à détecter des concentrations entre 0 et 1 500 mg DCO/L et entre 0 et 15 000 mg DCO/L. Des dilutions successives d'une solution de phtalate de potassium (KHP) de 15 grammes par litre d'eau milli-Q ont permis d'effectuer la courbe étalon de chacune de ces gammes de concentrations. L'ajout de 2 mL d'échantillon ou de standard à la première gamme de concentration et de 0.2 mL dans la deuxième ont été nécessaires pour la réaction. Un blanc a été effectué à chaque fois en remplaçant l'échantillon par de l'eau milli-Q. Après deux heures de digestion dans un réacteur à DCO (modèle 4560, Hach), les tubes ont été refroidis et une lecture au spectrophotomètre (modèle Junior® II A 6/20A de Perkin Elmer, Oakbrook, IL, É.U.) de chaque tube a été prise à une longueur d'onde de 620 nm. Des échantillons très concentrés ont dû être préalablement dilués afin de correspondre à la gamme de concentration de la courbe standard utilisée.

2.5.2. Dosage de l'acétate

La quantification de l'ion acétate s'est faite à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (GC : *gas chromatography*, Modèle 5890A de Hewlett Packard, Palo Alto, CA, É.U.) couplée à un détecteur d'ionisation par flamme (FID : *flame ionisation detector*, Modèle G1223A, Agilent

technologies, Santa Clara, CA, É.U.) et munie d'un échantillonneur automatique de modèle 185968 (Hewlett Packard). Un volume de 1 mL de chaque échantillon a d'abord été mis dans des tubes en plastique de 1.5 mL et centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 minutes dans une mini-centrifugeuse. Un volume de 175 µL de surnageant a ensuite été mélangé dans des fioles en verre de 1 mL à 175 µL d'une solution contenant 6 % d'acide formique (servant à améliorer la volatilisation des acides gras volatiles) (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, É.U.) et 200 mg/L d'acide heptanoïque (utilisé comme standard interne) (Sigma-Aldrich). Une petite aliquote de l'échantillon (1 µL) a été injectée automatiquement (modèle d'injecteur 7673A, Hewlett Packard) en trois réplicats dans la colonne DB-FFAP de 30 m x 0.250 mm (J & W Scientific Inc., Folsom, CA, É.U.) du GC-FID. L'analyse de chaque échantillon a nécessité 16 minutes. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 20 mL/min. La température de la colonne a passé de 110 °C à 230 °C, la température d'injection a été maintenue à 190 °C et la température du détecteur a été de 250 °C. Les analytes ont ainsi été séparés et le ratio « aire sous la courbe du pic d'acétate/aire sous la courbe du pic d'acide heptanoïque » a été comparé au ratio de la courbe standard « aire sous la courbe du pic d'acétate/aire sous la courbe du pic d'acide heptanoïque » effectuée pour des concentrations de 0.5 à 250 mg/L d'acétate et de 100 mg/L d'acide heptanoïque.

2.5.3. Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH₃)

2.5.3.1. Méthode distillation/titration

La récupération de l'azote ammoniacal d'un échantillon a été réalisée par la méthode de distillation 4500-NH₃-B de l'APHA (1998) suivie d'un dosage colorimétrique par titrage selon la méthode 4500-NH₃-C. L'échantillon a d'abord été dilué, tamponné avec du tampon borate (0.025 N de borate de sodium), puis ajusté à un pH de 9.5. Le distillat, qui a été récupéré dans un bécher contenant 6 mL de solution indicatrice (méthyle rouge 0.2 %, bleu de méthylène 0.2 % et acide borique 2 %), a fait passer l'indicateur du violet au vert s'il contenait de l'azote ammoniacal. Ce constituant a ensuite été quantifié en ajoutant de l'acide sulfurique 0.005 N jusqu'à la réapparition de la couleur violette. Le volume de H₂SO₄ utilisé lors du titrage a été incorporé à la formule suivante :

$$\text{échantillon (mg/L N - NH}_3\text{)} = \frac{\text{volume H}_2\text{SO}_4 \text{ std (mL)} \times 70 \text{ mg N - NH}_3 / \text{mL H}_2\text{SO}_4 \text{ std}}{\text{volume échantillon (L)}}$$

Il est à noter que, conformément à l'usage dans le domaine de l'assainissement de l'eau, les résultats sont rapportés en terme d'azote et non en terme d'ammoniac (1 mg N-NH₃ = 0.82 mg NH₃).

Cette méthode étant fastidieuse, elle a été remplacée par une méthode plus rapide utilisant une sonde sélective à l'ammoniac.

2.5.3.2. Méthode avec sonde sélective à l'ammoniac

L'électrode sélective à l'ammoniac de Thermo Electron Co. (Beverly, MA, É.U.) modèle 95-12 est composée d'une membrane hydrophobe perméable aux gaz. L'ammoniac dissous (NH₃(aq)) dans la solution aqueuse, de même que l'ion ammonium (NH₄⁺) converti en NH₃(aq) suite à une élévation de pH à plus de 11, diffuse à travers la membrane et change le pH de la solution interne de l'électrode (méthode 4500-NH₃ D, APHA, AWWA et WEF, 1998). Cette variation de pH est affichée en millivolts.

Au début de chaque utilisation de l'électrode, une nouvelle courbe standard a été faite avec des solutions de chlorure d'ammonium de 1, 10, 100 et 1000 mg/L de N-NH₄Cl. Le dosage s'est effectué en immergeant l'électrode dans 10 ml d'échantillon ou de standard agité à l'aide d'un barreau magnétique, puis en ajoutant 0.1 mL de NaOH 1 N. La lecture en millivolts a été notée lorsque celle-ci s'est stabilisée sur l'électromètre Acumet pH meter 15 (Fisher Scientific). Les résultats ont été rapportés en terme d'azote et non en terme d'ammonium (1 mg N-NH₄Cl = 0.26 mg NH₄Cl).

2.5.4. Dosage de l'azote sous forme nitrite (N-NO₂) et nitrate (N-NO₃)

Le dosage du nitrite et du nitrate a été effectué à l'aide d'un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) modèle 600 de Waters (Milford, MA, É.U.) couplé à une pompe modèle 600 (Waters), un détecteur d'absorbance modèle 486 (Waters) opéré à 214 nm et un injecteur automatique modèle 717 plus (Waters). Le logiciel d'acquisition et d'intégration des données utilisé a d'abord été le Millennium 32, version 3.05.01 (Waters), puis a été remplacé par Empower Pro 2 (Waters). Le système a été contrôlé par un contrôleur modèle 600 (Waters). La colonne IC-

Pak A (Waters), 4.6 mm de diamètre x 50 mm de long, a été utilisée afin de séparer les anions. La phase mobile, un éluant constitué de sodium borate/gluconate composé à 12 % d'acétonitrile qualité HPLC (Fisher Scientific), de 2 % de n-butanol (Anachemia, Rouses Point, NY, É.U.) et 2 % d'une solution de borate/gluconate (composée de 16 g/L de gluconate de sodium (Sigma-Aldrich), de 18 g/L d'acide borique (Anachemia), de 25 g/L de tétraborate décahydrate de sodium (J.T. Baker Chemicals Co., Phillipsburg, NJ, É.U.) et de 250 ml/L de glycérine (EMD Chemicals Inc.), a été filtrée sur une membrane Durapore® de 0.22 µm GVWP (Millipore Corp., Bedford, MA, É.U.) avant son utilisation. Les 100 premiers millilitres de filtrats ont été jetés afin d'éliminer les surfactants de traitement du filtre susceptibles d'affecter l'analyse.

La courbe étalon a été faite à l'aide d'une solution de NaNO_2 et NaNO_3 (Sigma-Aldrich) de 1000 mg/L diluée afin d'obtenir des concentrations finales de 2, 4, 6, 8 et 10 mg/L de NO_2^- et NO_3^- . Tous les échantillons et les standards ont été filtrés sur des membranes Millex®-HV Durapore® GVWP de 0.45 µm (Millipore Corp.) avant d'en injecter 0.1 mL dans la colonne. Au besoin, les échantillons ont été dilués afin de s'ajuster aux concentrations de la courbe étalon. Encore ici, il est à noter que les résultats ont été rapportés en terme d'azote et non en terme de nitrite ou de nitrate ($1 \text{ mg N-NO}_2^- = 0.30 \text{ mg NO}_2^-$, et $1 \text{ mg N-NO}_3^- = 0.23 \text{ mg NO}_3^-$).

2.5.5. Dosage du phosphore à l'acide vanadomolybdophosphorique

Dans une solution acidifiée, le molybdate d'ammonium réagit avec l'orthophosphate pour former l'acide molybdophosphorique et, en présence de vanadium, l'acide vanadomolybdophosphorique (jaune) est formé. Selon la méthode 4500-P C (APHA, 1998), l'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la concentration d'orthophosphate.

Pour le dosage du phosphore total, une digestion au persulfate a été réalisée selon la méthode 4500-P B.5 (APHA, 1998). Cette dernière a été accomplie en autoclavant à 121 °C pendant 30 minutes l'échantillon dilué dans un volume total de 25 mL, acidifié avec 500 µL de H_2SO_4 30 % et en présence de 0.2 g de persulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (EM Science, Gibbstown, NJ, É.U.). Lorsque refroidis, les échantillons ont été ajustés à un pH entre 7 et 9 à l'aide de NaOH 1 N, puis le volume des échantillons a été complété à 50 mL, diluant ainsi l'échantillon par un facteur de 2. Préalablement au dosage colorimétrique, il a été nécessaire de décolorer certains échantillons. La décoloration de 50 mL d'échantillon a nécessité 200 mg de charbon activé préalablement lavé et une agitation de 5 minutes à environ 200 rpm. Le filtrat a été égoutté à

travers un filtre de 2.5 µm de porosité (Whatman, Clifton, NJ, É.U.) retenu dans un entonnoir. La décoloration a été répétée tant que le filtrat récupéré apparaissait encore coloré à l'oeil. Une décoloration d'eau milli-Q a été faite en parallèle pour agir comme témoin de décoloration. Le dosage colorimétrique des échantillons s'est fait en centrifugeant à 2 500 rpm pendant 5 minutes ou en filtrant sur une membrane de 0.45 µm, puis en mélangeant par vortex 3.5 mL de chaque échantillon (dilué au besoin pour correspondre aux concentrations d'une des courbes étalon) ou standard à 1 mL de réactif vanadate-molybdate. Après 10 minutes de réaction à la température de la pièce, l'absorbance a été lue à 400, 420 et/ou 470 nm au spectrophotomètre SP6-550 UV/VIS (Pye Unicam Ltée., Cambridge, Angleterre). Tous les échantillons et les standards ont été faits en duplicata. Des courbes étalon ont été effectuées avec des solutions de KH_2PO_4 pour des concentrations de P-PO_4^{2-} (Fisher Scientific) de 1 à 5 mg/L, de 2 à 10 mg/L et de 4 à 20 mg/L, dont l'absorbance est lue à 400, 420 et 470 nm respectivement. Les résultats ont été rapportés en terme de phosphore et non de phosphate ($1 \text{ mg P-PO}_4^{2-} = 0.33 \text{ mg PO}_4^{2-}$).

2.5.6. Dosage des solides en suspension totaux (SST) et volatiles (SSV)

Un échantillon de liqueur mixte bien mélangé à l'aide d'un agitateur magnétique a été filtré sur un filtre 934-AHTM de Whatman à l'aide d'une pompe à vide reliée à un appareil de filtration multiple et rincé avec 3 x 10 mL d'eau milli-Q. Puis, les résidus sur le filtre ont été séchés à 105 °C jusqu'à poids constant. La différence de masse entre le poids après séchage et le poids du filtre sans échantillon correspond à la masse des solides totaux en suspension, selon la méthode 2540 D (APHA, 1998).

$$\text{Solides en suspension totaux (g/L)} = \frac{\text{Masse filtre et échantillon (g)} - \text{Masse filtre (g)}}{\text{Volume d'échantillon filtré (L)}}$$

Lorsque l'information de la masse des solides volatiles (solides en suspension qui se volatilisent au four à 550°C) de cet échantillon était désirée, l'échantillon a ensuite été placé à 550 °C pendant 20 minutes, refroidi, puis pesé. La différence de masse entre le poids après le four à 550 °C et après le séchage à 105 °C correspond à la masse des solides volatiles selon la méthode 2540 E (APHA, 1998).

$$\text{Solides volatiles (g/L)} = \frac{\text{Masse filtre et échantillon sec (g)} - \text{Masse après passage à 550 °C (g)}}{\text{Volume d'échantillon (L)}}$$

Les filtres utilisés ont préalablement été soumis aux épreuves de lavage avec de l'eau milli-Q, séchage à 105 °C toute la nuit puis au four à 550 °C avant d'être pesés puis utilisés pour les échantillons.

2.6. Colorations

2.6.1. Neisser (Granules de Poly-P)

Un mince frotti de bactéries a été déposé sur une lame et séché à l'air. Une première coloration a été effectuée pendant 30 secondes avec une solution de bleu de méthylène (0.1 g de bleu de méthylène dans 5 mL d'éthanol 95 %, 5 mL d'acide acétique glacial ; volume complété à 100 mL) et une solution de cristal violet (10 % cristal violet m/v dans éthanol 95 % + 6.7 mL d'éthanol 95 % ; volume complété à 100 mL) mélangées juste avant la coloration selon un ratio 2:1. La lame a été rincée très brièvement avec de l'eau milli-Q, puis colorée avec une solution de Bismark Brown (0.33 g dans 100 mL d'eau milli-Q) pendant 1 minute, avant d'être bien rincée avec de l'eau milli-Q et séchée. Au microscope (Leitz, Laborlux D, Allemagne), les lames ont été examinées à 1 000X avec de l'huile à immersion et avec une illumination directe (pas de contraste de phase). Les granules ou les cellules bleu-violet sont positives tandis que les cellules jaune-brun sont négatives (Jenkins *et al.*, 1993).

2.6.2. Granules de polyhydroxyalkanoates (PHA)

Un mince frottis de bactéries a été préparé sur une lame et séché à l'air. Une première coloration de 10 minutes avec du noir du Soudan B (0.3 % m/v dans 60 % d'éthanol) a été faite, suivie d'un rinçage puis d'une seconde coloration de 10 secondes à la safranine O (0.5 % dans de l'eau milli-Q). Lors de l'observation au microscope (identique à Neisser), les granules de PHA apparaissent bleu-noir alors que le cytoplasme apparaît rose ou clair (Murray *et al.*, 1994).

2.6.3. Coloration de Gram

Un mince frotti de bactéries a été préparé sur une lame, puis fixé à la flamme. La coloration a été effectuée faite avec une trousse de coloration Gram Difco BBL (Becton Dickinson, Sparks,

MD, É.U.). Après chacune des étapes suivantes, la lame a été rincée avec de l'eau milli-Q. Les bactéries ont été colorées au cristal violet (3 g de cristal violet, 50 mL d'isopropanol, 50 mL d'éthanol, 900 mL d'eau purifiée) pendant une minute. Une solution iodée stabilisée (100 g d'iode-polyvinylpyrrolidone, 9 g d'iode de potassium, 1000 mL d'eau purifiée) a ensuite été utilisée pour faire adhérer ce premier colorant, pendant une minute. Un décolorant (250 mL/L d'acétone et 750 mL/L d'isopropanol) a été utilisé pour rincer la lame. À cette étape, les bactéries à Gram positif, conservent leur coloration violette, alors que les bactéries à Gram négatif sont complètement décolorées. L'usage de la safranine (4 g de safranine, 200 mL d'alcool dénaturé, 800 mL d'eau purifié) pendant une minute en dernière étape ajoute une teinte rosée à toutes les bactéries, mais ce sont seulement les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses puisque l'intense couleur violette est dominante pour les bactéries à Gram positif.

2.7. Hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

La biomasse du RBS-2 a été fraîchement prélevée le matin de l'expérimentation. Un volume de 1 mL de biomasse a été concentré par centrifugation à 5 000 rpm pendant 5 minutes, puis le culot a été rincé à deux reprises en le suspendant dans 1 mL de tampon phosphate salin (PBS) 1X (fait à partir de PBS 5X pH 7.2 filtré: 13 g/L de Na_2HPO_4 (Anachemia), 6.9 g/L de NaH_2PO_4 (Fisher Scientific), 38 g/L de NaCl (Fisher Scientific)), puis en le centrifugeant à nouveau. Les bactéries ont été fixées pendant 1 heure en présence de 1 mL de PFA 4 % froid (4 g de paraformaldéhyde (Fisher Scientific) dans 80 mL d'eau à 60°C avec quelques gouttes de NaOH 2 M, puis ajout de 20 mL de PBS 5X et ajustement du pH à 7.2 avec du HCl 2 M lorsqu'il a un peu refroidi) puis rincées à nouveau à deux reprises dans 1 mL de PBS 1X. Une première déshydratation a été accomplie par l'ajout d'éthanol 50 % pendant 20 minutes. La perméabilisation a ensuite eu lieu en incubant les bactéries à 4 °C pendant 36 heures en présence d'éthanol 70 %. Les bactéries ont été soumises à une seconde déshydratation, en présence d'éthanol 95 % pendant 20 minutes, avant de procéder à l'acétylation. Deux gouttes du mélange biomasse-éthanol 95 % ont été déposées sur chaque lame, puis séchées et fixées à la flamme. Le tampon d'acétylation fraîchement préparé (5 mL de triéthanolamine (Sigma-Aldrich) 100 mM pH 8 avec 12.5 µL d'acétique anhydride (Fisher Scientific)) a été déposé sur la biomasse pour une incubation de 15 minutes, puis les lames ont été rincées et séchées. Un crayon gras a été utilisé pour entourer les aires des lames où se trouvent les bactéries. Les étapes qui suivent ont été faites

à la noirceur. Le tampon d'hybridation à 35 % de formamide (44 µL de formamide désionisé, 48 µl H₂O milli-Q, 23 µL NaCl 5 M, 2.5 µL Tris-HCL 1 M pH 7.2 et 1.3 µL SDS filtré 1 %) a été préparé avec les sondes PAO (couplée au fluorochrome CY3) et Beta42a (couplée au fluorochrome FITC) (3.8 µl chaque, voir séquences au Tableau 1) (Alpha DNA, Montréal, QC, Canada). L'hybridation a eu lieu dans des chambres pour microarray à 46° C pendant 3 heures. À la fin de l'hybridation, la température a été élevée à 48° C pour 2 minutes. Par la suite, les lames ont été rincées pendant 20 minutes dans le tampon de lavage (478 mL H₂O milli-Q, 7 mL NaCl 5 M, 10 Tris-HCL 1 M pH 7.2, 5 mL EDTA 0.5 M pH 8 et 250 µL SDS filtré 20 %) à 48 °C. Après avoir été rincées dans un bassin d'eau à température pièce, les lames ont été séchées à l'air à la noirceur. Les lames ont été montées avec un agent retardant la baisse d'émission lumineuse (« antifading agent ») (Solution Prolong : 1 mg du composé A mélangé à 10 gouttes du composé B) (Molecular Probe Inc., Eugene, OR, É.U.). Une goutte (environ 20 µL) a été déposée sur chaque lame, puis une lamelle a été ajoutée avec précaution pour éviter la formation de bulles. Après un temps de séchage à température pièce, les lames ont été observées au microscope à épifluorescence Eclipse E800 (Nikon, Kawasaki, Japon) avec une lumière incidente (excitation) à 550 nm pour observer les bactéries révélées par les sondes PAOs et à 494 nm pour observer les bactéries révélées par les sondes *β-proteobacteria*.

Tableau 1. Séquences et cibles des amorces et des sondes utilisées.

Amorces	Séquences	Tempé- ratures de fusion * (°C)	Cibles	Positions dans l'ADNr 16S chez <i>E. Coli</i>	Références
PAO462F	5' - GTT AAT ACC CTG WGT AGA TGA CGG -3'	56	« <i>Ca. Accumulibacter</i> »	462 - 485	(Crocetti <i>et al.</i> , 2000)
PAO651R	5' - CCC TCT GCC AAA CTC CAG -3'	53	La plupart des membres du groupe « <i>Ca. Accumulibacter</i> ».	668 - 651	(Crocetti <i>et al.</i> , 2000)
PAO651F	5' - CTG GAG TTT GGC AGA GGG -3'	53	La plupart des membres du groupe « <i>Ca. Accumulibacter</i> ».	651 - 668	(Crocetti <i>et al.</i> , 2000)
PAO846R	5' - GTT AGC TAC GGC ACT AAA AGG -3'	52	« <i>Ca. Accumulibacter</i> »	866 - 846	(Crocetti <i>et al.</i> , 2000)
Rc988R	5' - AGG ATT CCT GAC ATG TCA AGG G -3'	55	<i>Rhodocyclops</i> sp., « <i>Ca.</i> <i>Accumulibacter</i> », et autres bactéries associées	1009 - 988	(Crocetti <i>et al.</i> , 2000)
GAOQ431F	5' - AAG CCC TTT AGG CCG GGA -3'	53	« <i>Ca. Competibacter</i> »	431 - 448	(Crocetti <i>et al.</i> , 2002)
GAOQ989R	5' - TTC CCC GGA TGT CAA GGC -3'	53	« <i>Ca. Competibacter</i> »	1006 - 989	(Crocetti <i>et al.</i> , 2002)
PRBA341F	5' - CCI ACG GGA GGC AGC AG -3'	55	<i>Eubacteria</i>	341 - 357	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
PRUN518R	5' - ATT ACC GCG GCT GGT GG -3'	55	<i>Eubacteria</i>	534 - 518	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
pA	5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'	55	<i>Eubacteria</i>	8 - 27	(Edwards <i>et al.</i> , 1989)
pH	5' - AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3'	55	<i>Eubacteria</i>	1541 - 1522	(Edwards <i>et al.</i> , 1989)
sp6	5' - TAT TTA GGT GAC ACT ATA G -3'	55	vecteur pGEM®-T Easy et insert	NA	Promega
t7	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'	55	vecteur pGEM®-T Easy et insert	NA	Promega
Pince GC	5' - CGCCCGCCGCGCGGGGGG GGGGCGGGGCACGGGGGG -3'	var	aucun	NA	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
Sondes					
Beta42a	5' - AAA CGA AGT GGG AAG GC -3'	var	<i>β-proteobacteria</i>	1027-1043	(Manz <i>et al.</i> , 1994)
PAO651	5' - CCC TCT GCC AAA CTC CAG -3'	var	« <i>Ca. Accumulibacter</i> »	651-668	(Crocetti <i>et al.</i> , 2000)

NA = non applicable; var = variable selon la quantité d'agent dénaturant.

* La température de fusion est la température à laquelle 50 % des liaisons entre nucléotides sont désappariées dans un segment d'ADN. Plus la teneur en nucléotides G et C est élevée, plus élevée sera la température de fusion.

2.8. Élaboration et évaluation de paires d'amorces spécifiques aux PAO et GAO

Afin de se munir d'une méthode de détection rapide par PCR de la présence de certains organismes clés dans la biomasse les isolats, des amorces spécifiques aux PAO et GAO ont été élaborées. Les séquences nucléiques (ARNr) de ces organismes ont été obtenues à partir de la banque de sondes à oligonucléotides « probeBase »(Loy *et al.*, 2003) disponible en ligne à l'adresse <http://www.microbial-ecology.net/probebase>. La séquence de l'amorce de gauche représentait le complément inverse de la séquence de la sonde. La température de fusion de chaque amorce a été prise en considération afin de choisir des paires d'amorces ayant des températures de fusion rapprochées. À certaines de ces amorces, une pince riche en G+C a été ajoutée pour permettre l'analyse PCR-DGGE. Le Tableau 1 expose les paires d'amorces utilisées. Les températures optimales pour l'hybridation des paires d'amorces ont été déterminées en effectuant un PCR à gradient de température. Les amorces ont été testées sur l'ADN de la biomasse du RBS-2, laquelle contiendrait possiblement les organismes de type PAO et GAO. La spécificité des amorces a été confirmée en soumettant l'ADN d'un consortium bactérien non reconnu pour contenir les organismes cibles (biomasse du bioréacteur aérobie thermophile) à un PCR contenant les amorces ciblant ces deux types d'organismes. Le programme utilisé au RoboCycler® Gradient 96 (Stratagene, La Jolla, CA, É.U.) est illustré à la figure 8.

1 cycle →			⋮	35 cycles →			⋮	1 cycle
94°C	49-60°C	72°C	⋮	94°C	49-60°C	72°C	⋮	72°C
5 min	5 min	30 sec	⋮	45 sec	45 sec	45 sec	⋮	10 min

Figure 8. Programme du PCR RoboCycler® Gradient 96 pour tester les températures optimales d'hybridation

2.9. Caractérisation de la flore microbienne présente dans le réacteur RBS-2

2.9.1. Culture du consortium microbien sur milieu R2A et RBS-2 (1) et isolement des colonies

Les boues activées ont été prélevées trois jours avant l'expérimentation et conservées à 4 °C. Les floccs ont été défaits en agitant 5 mL de la liqueur mixte avec des billes de verre de 0.5 cm de diamètre (Fisher Scientific). À partir de cette suspension, une série de dilutions a été faite dans du milieu R2A (Becton Dickson) auquel on a ajouté de l'acétate de sodium anhydre (0.520 g/L). Un volume de 100 µL des dilutions 10^0 à 10^{-8} a été étalé à la fois sur des géloses de milieu R2A-acétate et sur des géloses RBS-2 (1) constituées d'affluent du RBS-2 et de 15 g/L d'agar granulé (Becton Dickson). Après 4 jours d'incubation à température pièce, 18 colonies du milieu R2A-acétate et 14 colonies du milieu RBS-2 (1) ont été repiquées sur des géloses des mêmes milieux. Trois repiquages de la sorte ont eu lieu sur géloses, puis les isolats ont finalement été inoculés dans 5 mL de milieu liquide identique au milieu de sélection d'origine, avec incubation à température pièce et agitation à 150 rpm. Suite à la croissance en milieu liquide, deux aliquots de 1 mL de chaque isolat ont été transférés dans des cryovials stériles de 2 mL (Fisher Scientific), auxquels 0.45 mL de glycérol 50 % stérile a été ajouté, puis les tubes ont été congelés à -80 °C.

2.9.2. Extraction d'ADN génomique par billes de verre

Toutes les étapes suivantes ont été effectuées sur glace. Une aliquote de 1 mL de chaque isolat ou consortium bactérien a été centrifugée à 13 000 rpm pendant 3 minutes. Le culot a été dispersé dans 500 µL de TEN (Tris HCl 50 mM, EDTA 100 mM et NaCl 150 mM), puis transféré dans un tube vissé de 1.5 mL contenant 250 mg de billes de verre (0.25-0.5 µm) (Fisher Scientific) et 500 µL de phénol/chloroforme/isoamyl (25:24:1). Les cellules ont été broyées avec des billes de verre dans un homogénéisateur FastPrep modèle FP120-115 (Thermo Savant, GMI, Ramsey, MN., É.U.) pendant 25 secondes à vitesse relative de 5, puis laissées au repos pendant 5 minutes sur glace, avant de recommencer un même broyage. Les tubes ont été centrifugés pendant 15 minutes à 13 000 rpm, puis le surnageant, contenant l'ADN, a été transféré dans des tubes contenant 500 µL de chloroforme/isoamyl (49:1). Ces derniers ont été agités doucement par inversion avant d'être centrifugés pendant 5 minutes à 13 000 rpm. Un volume de 334 µL du

surnageant a été transféré dans des tubes contenant 167 µL d'acétate d'ammonium 10 M. Mis au repos pendant 20 minutes, les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 13 000 rpm. Un volume de 500 µL du surnageant, contenant l'ADN partiellement purifié, a été mis dans des tubes contenant 1 mL d'éthanol 95 % et placés à -20 °C pour un minimum de deux heures. À cette étape, l'ADN a précipité. Une centrifugation de 15 minutes à 13 000 rpm a rassemblé l'ADN en culot. Le surnageant a alors été jeté. Un dernier ajout d'éthanol 70 % a été fait avant de centrifuger 2 minutes à 13 000 rpm, puis de jeter le surnageant. Le culot a bien été séché à l'air avant d'être dissous dans 50 µl d'eau contenant 10 µg/mL d'ARNase.

La vérification de la présence d'ADN s'est faite par électrophorèse sur gel d'agarose UltraPure™ 1 % (Invitrogen, Carlsbad, CA, É.U.) dans du TAE 1X (2.42 g de Tris hydroxyméthyl aminoéthane, 0.571 g d'acide acétique glacial, 50 mL d'EDTA 0.5 M pH 8 dans un volume complété à 500 mL avec de l'eau milli-Q). À 5 µL d'échantillon, on a ajouté 2 µL de tampon de chargement. Un marqueur de poids moléculaire constitué de l'ADN total du phage lambda (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, Angleterre) a été utilisé (10 µL + 2 µL de tampon de chargement). L'ADN a migré dans le gel à 80-90 volts pendant 1 heure environ. Le gel a ensuite été déposé dans une solution de bromure d'éthidium (6 mg/L) dans du TAE 1X en laissant agiter pendant environ 10 minutes, puis transféré dans de l'eau en laissant barboter pendant 10 minutes environ. Le bromure d'éthidium s'est fixé à l'ADN, le rendant visible sous illumination aux rayons U.V. Une photo du gel a été obtenue à l'aide d'un système AlphaImager™ 3400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA., É.U.) comprenant une caméra au-dessus d'un plateau transilluminateur de rayons U.V. de type « GelDoc » modèle 1000 de Bio-Rad (Hercules, CA., É.U.).

2.9.3. Amplification de l'ADNr 16S et vérification sur gel

Peu importe les amorces utilisées, les mélanges réactionnels PCR ont été faits de la même façon. Ceux-ci contenaient 4 µL d'échantillon, 36.5 µL d'H₂O milli-Q filtrée sur membrane 0,22 µm et autoclavée, 5 µL de tampon 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3) et 15 mM MgCl₂) (GE Healthcare), 1 µL de dNTPs 10X (GE Healthcare), 1 µL d'amorce de gauche (100 picomoles/µL), 1 µL d'amorce de droite (100 picomoles/µL), 1 µL d'albumine de sérum de bovin (BSA, 25 µg/µL) et 0.5 µl de Taq polymérase 5000 µ/µL (GE Healthcare). L'appareil GeneAmp PCR system 2700 de Applied Biosystems (Foster, CA, É.U.) a été utilisé pour

procéder à l'amplification d'ADN selon le programme illustré à la figure 9. Ce programme s'applique à la lettre pour l'obtention d'amplifications à l'aide de toutes les paires d'amorces utilisées lors de cette étude, à l'exception de la température d'appariement (55 °C) qui diffère légèrement pour les amorces PAO651F-GC / PAO846R (53 °C) et pour les amorces GAOQ431F / GAOQ989R (57 °C). Le succès de l'amplification a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1 à 2 %, dépendamment de la longueur du fragment. Le marqueur de poids moléculaire lambda a été utilisé pour les longs fragments alors que les marqueurs 50 paires de bases (Amersham Biosciences, GE) ou 100 pb DNA Step Ladder (Promega, Madison, WI, É.U.) ont plutôt été utilisés pour les petits fragments. La coloration de l'ADN au bromure d'éthidium s'est effectuée tel que décrit à la section 2.9.2.

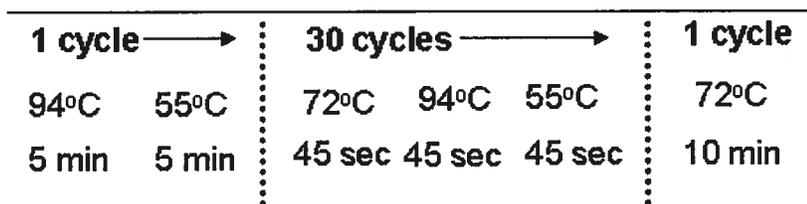


Figure 9. Programme de l'appareil PCR GeneAmp PCR system 2700.

2.9.4. Criblage des isolats obtenus

2.9.4.1. Criblage par DGGE

Le gel d'électrophorèse à gradient dénaturant (DGGE) est un gel d'acrylamide 8 % dont le pourcentage en dénaturant est croissant du sommet jusqu'à la base. L'ADN des espèces à séparer a d'abord été amplifié avec les amorces PRBA341f et PRUN518r dont l'une contenait une pince riche en nucléotides G et C. La forte liaison existant entre ces deux nucléotide, due aux trois ponts hydrogène, nécessitait une concentration en dénaturant beaucoup plus grande pour séparer ces derniers. Ainsi, lorsque les amplicons ont migré dans le gel, ils se sont plus ou moins ouverts en fonction de leur contenu en GC et de la concentration en agent dénaturant à l'endroit du gel où ils étaient rendus, mais la pince GC assurait que les brins restent attachés au moins au niveau de cette pince. Cette ouverture partielle des amplicons ralentit leur vitesse de migration ce qui provoque une séparation des amplicons en fonction de leur séquence en nucléotides. Le gradient du gel a été formé par un mélange progressif de deux solutions : une faible (0 %), l'autre élevée

(80 %) en dénaturant. La solution faible en dénaturant a été composée de 10 mL d'une solution d'acrylamide:bis (37.5:1) 40 %, de 1 mL de TAE 50X, et de 39 mL d'H₂O milli-Q, pour un total de 50 mL. La solution élevée en dénaturant a été composée de 10 mL d'une solution d'acrylamide:bis (37.5:1) 40 %, de 1 mL de TAE 50X, de 16 mL de formamide déionisé, de 16.8 g d'urée et le volume a été complété à 50 mL avec de l'eau milli-Q. Les deux solutions ont été filtrées sur membrane de 0.45 µm. Pour chaque gel, un volume de 20 mL de chaque solution a d'abord été dégazé en agitant sous vide dans une jarre anaérobie pendant 15 minutes, puis placé sur la glace. Les solutions de persulfate d'ammonium (Bio-Rad) à 10 % et de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine) (Bio-Rad) ont aussi été mis sur glace. Lorsque les solutions étaient suffisamment froides, ce qui diminue la vitesse de polymérisation, la solution faible en dénaturant a été versée dans la chambre B d'un dispositif de formation de gradient (Bio-Rad), puis la solution élevée en dénaturant a été versée dans la chambre A. Un barreau magnétique agitait la solution dans la chambre A alors que 100 µL de persulfate d'ammonium et 10 µL de TEMED étaient ajoutés dans chacune des chambres en agitant à l'aide de l'embout de la pipette. Immédiatement, le levier entre les deux chambres a été positionné pour permettre le transfert de la solution de la chambre B vers la chambre A. Au même instant, le tuyau à la sortie du dispositif a été amené au centre des deux vitres où se forme le gel. Avant la polymérisation du gel, après que celui-ci ait été coulé, un peigne a été inséré au sommet afin de former des puits de chargement. Les échantillons ont été déposés dans les puits avec un volume total de 18 mL. Lorsqu'il s'agit d'ADN de souches pures, 3 µL d'échantillon ont été nécessaires, mélangés à 8 µL de tampon de chargement et à 7 µL d'H₂O. Lorsqu'il s'agit d'ADN d'un consortium, au moins 12 µL d'échantillon ont été nécessaires pour permettre de bien observer les différentes bandes. Les échantillons ont migré pendant 16 heures dans du TAE 1X à 60 °C à 100 V et à 0.05 ampère (0.1 ampère lorsqu'il y a deux gels en même temps). À la fin de la migration, le gel a été coloré selon la méthode décrite à la section 2.9.2.

2.9.4.2. Criblage par RFLP

Ce deuxième criblage a permis de confirmer la similitude des isolats ayant le même profil au DGGE. Un PCR avec les amorces universelles du gène 16S total (pA et pH, Tableau 1) a été fait sur les isolats d'intérêt selon le protocole de la section 2.9.3. Les produits PCR (5 µL par échantillon) ont ensuite été digérés en présence de 10 unités (1 µL) de l'enzyme *AfaI* (GE

Healthcare), de 2 μ L de tampon 10X (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mg/mL BSA et 50% (v/v) glycérol) (GE Healthcare) et d'eau milli-Q stérile (13 μ L) toute la nuit à 37 °C. L'enzyme *AfaI* a coupé les brins d'ADN à la séquence de clivage 5'...GT/AC...3' et 5'...CA/TG...3'. Le résultat de la digestion enzymatique a été observé par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % et les profils des différents isolats ont été comparés.

2.9.5. Séquençage des ADNr 16S des isolats d'intérêt et étude phylogénique

Les ADNr 16S des isolats ont été séquencés à partir des amplicons résultants d'un PCR fait avec les amorces pA et pH selon la méthode décrite à la section 2.9.3. Réalisé par le Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, le séquençage a été fait à partir de l'extrémité pA ainsi qu'à partir de l'extrémité pH. Les séquences reçues ont été corrigées et coupées aux extrémités avec le logiciel Chromas 2.30 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Dans le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor 5.0.9.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), les séquences des extrémités pA et pH de chaque isolat ont été assemblées en un même contig avec un logiciel tiers nommé Contig Assembly Program (CAP). Ces séquences résultantes ont été comparées à la base de données GenBank à l'aide de l'outil de recherche d'alignement local de bases (BLASTN) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Cette application Web a généré une liste des 100 séquences répertoriées les plus rapprochées de la séquence soumise, en indiquant le pourcentage d'appariement à cette dernière. Les séquences de certaines espèces bactériennes d'intérêt et fiables (souches déposées dans une banque comme celle de l'American Type Culture Collection) ont été copiées et rassemblées dans un fichier BioEdit comprenant aussi les séquences des isolats. Ce fichier, regroupant toutes les séquences à aligner, a été utilisé pour faire un arbre phylogénique. À ce fichier, la séquence de la bactérie *Cryptanaerobacter phenolicus* a été ajoutée afin d'être utilisée comme groupe externe. Toutes ces séquences ont été alignées grâce au programme CLUSTALW 1.4 (Thompson *et al.*, 1994) et égalisées aux extrémités. La suite de l'analyse phylogénétique a été réalisée avec des logiciels de l'ensemble Phylip 3.66. L'analyse était basée sur la formation d'une matrice de distance avec DNAdist (méthode de Kimura à deux paramètres, (Jin et Nei, 1990)) qui était ensuite utilisée par la méthode Fitch-Margoliash (Fitch et Margoliash, 1967) par le logiciel Fitch pour établir un arbre phylogénique. Pour vérifier la

robustesse de l'arbre, une méthode de ré-échantillonnage de type « bootstrap » a été utilisée pour créer 1000 ensembles de données avec Seqboot, données qui ont été analysées de la même façon que précédemment avec DNAdist et Fitch. Un arbre consensus a ensuite été établi avec Consense. Les séquences ont été déposées dans GenBank et correspondent aux numéros de références suivants : JPB-1.01 = EU652469 ; JPB-1.03 = EU652490; JPB-1.07 = EU652468 ; JPB-1.09 = EU652470 ; JPB-1.12 = EU652471 ; JPB-1.15 = EU652472 ; JPB-1.16 = EU652473 ; JPB-1.17a = EU652474 ; JPB-1.17b = EU652475 ; JPB-1.18 = EU652476 ; JPB-2.03 = EU652477 ; JPB-2.07 = EU652478 ; JPB-2.10 = EU652479.

2.10. Enrichissement et tentative d'isolement de bactéries déphosphatantes

2.10.1. Dispersion des floccs à l'aide d'un homogénéisateur couplé à la sonification

La biomasse utilisée pour cet enrichissement a été fraîchement prélevée quelques minutes avant la fin de la dernière étape d'aération du RBS-2. Elle a été immédiatement maintenue sur glace et toutes les manipulations qui suivent ont été faites sur glace. Avant de disperser les floccs, les bactéries qui composaient les boues activées étaient immobiles, emprisonnées dans une matrice qui semblait être très rigide. La méthode de dispersion des floccs qui s'est avérée la plus efficace débutait par 20 passages dans un homogénéisateur (utilisé pour briser des tissus ; aussi connu sous le nom de broyeur ou « Potter ») de 5 mL. À cette technique s'additionnait la dispersion aux ultrasons. Dans l'eau, les ultrasons produisent des ondes de pression se propageant très rapidement et causent la brisure des floccs, puis, si la sonification est prolongée, il se produira une inactivation de la biomasse par le phénomène de cavitation acoustique (Zhang *et al.*, 2007). Une sonification de deux périodes de 45 secondes à 100 Watts avec un processeur modèle XL2020, couplé à un convertisseur modèle CL4 (Heat Systems Inc., of Plainview, N.Y., É.U.) donne le meilleur ratio de dispersion des floccs versus la mortalité bactérienne selon Falcioni *et al.*, (2006). Ce sont donc ces conditions d'exposition aux ultrasons qui ont été sélectionnés pour poursuivre le bris des floccs. La sonification a été effectuée sur glace dans un bécher de verre de 30 mL.

2.10.2. Séparation de bactéries sur gradient de Percoll

Le Percoll (Percoll/RediGrad, GE Healthcare) est composé de particules de silice enrobées de polyvinylpyrrolidone (PVP) de tailles hétérogènes. La centrifugation de ce dernier permet de créer un gradient de densité. La solution de Percoll a été utilisée en additionnant une partie (v/v) de NaCl 1.5 M à 9 parties de Percoll. Un volume de 8 mL de cette solution a été déposé dans un tube 10 mL de polycarbonate (Nalgene® Labware, modèle 3138). Au sommet de cette solution de Percoll, un volume de 1 mL de biomasse dispersée, filtrée sur une membrane de 20 - 25 µm (Whatman, Ashless 41) et concentrée a été déposé. La centrifugation a eu lieu à 10 000 rpm pendant 75 minutes à 20 °C en utilisant une ultracentrifugeuse Beckman (modèle L5-65) et un rotor Beckman de type 75 Ti. Pendant la centrifugation, le gradient de densité s'est formé et les bactéries ont migré jusqu'à l'atteinte d'une densité du milieu égale à la leur. Les différentes bactéries se sont séparées, formant des bandes dans le gradient de Percoll. Ces bandes ont été récoltées en fractions de 0.5 mL. Chacune de ces fractions a été séparée également dans deux tubes de plastique de 1.5 mL, puis le Percoll a été éliminé en procédant à 2 lavages par centrifugation dans du milieu RBS-2 (2) (mélange d'effluent:affluent du RBS-2 dans les proportions 19:1) liquide stérilisé par filtration sur 0.2 µm. Finalement, les culots ont été dispersés dans 0.2 mL de milieu RBS-2 (2).

2.10.3. Isolement d'isolats affiliés à « *Ca. Accumulibacter* »

Les fractions démontrant un enrichissement en PAO par coloration spécifique des granules de poly-P et par PCR avec les amorces PAO ont été diluées de 10^0 à 10^{-6} puis ensemencées selon différentes stratégies dans l'objectif d'y faire croître la bactérie « *Ca. Accumulibacter* ».

2.10.3.1. Culture sur géloses en condition aérobie

Un volume de 100 µL de chacune des suspensions bactériennes diluées dans du milieu RBS-2 (2) a été étalé sur des géloses du milieu RBS-2 (2) (avec 15 g/L d'agar, stérilisé à l'autoclave). Les 12 isolats ayant poussé après une incubation à la température de la pièce et en condition aérobie ont été repiqués à trois reprises sur des géloses RBS-2 (2) sur lesquelles un volume de 100 à 150 µl de milieu RBS-2 (2) liquide stérilisé par filtration a préalablement été étalé. Cet étalement de milieu RBS-2 (2) liquide vise à rendre disponibles certains éléments présents dans

ce milieu qui auraient pu être détruits lors de l'autoclavage du milieu composant les géloses. Ces 12 isolats ont ensuite été mis en culture liquide dans 3 mL de milieu RBS-2 (2) liquide stérile frais, puis incubés à la température de la pièce avec une agitation de 300 rpm pendant 7 jours. Deux aliquots de 100 µL de chacun de ces derniers ont été conservés dans du glycérol, puis conservés à -80 °C. L'appartenance des isolats à « *Ca. Accumulibacter* » a été vérifiée par PCR. Pour chacun, de la biomasse prélevée sur gélose a été dispersée dans 100 µL d'eau déminéralisée dans un tube à capuchon vissé de 1.5 mL. Les tubes ont ensuite été placés dans un bain d'eau bouillante pendant 10 minutes, afin de faire éclater les cellules bactériennes et ainsi libérer leur ADN génomique. Ces préparations ont été soumises à un PCR avec les amorces PAO462F et PAO846R ainsi qu'avec les amorces pA et pH comme vérification que l'ADN extrait était bien amplifiable. Les mélanges réactionnels étaient composés de 25 µL d'échantillon et de 25 µL de solution PCR (réaction identique à la section 2.9.3, à l'exception du volume d'eau qui était ici de 15.5 µL plutôt que 36.5 µL).

2.10.3.2. Culture sur géloses en condition microaérobie

Cette expérience est identique à celle de la section 2.10.3.1, cependant, l'incubation a été effectuée dans des jarres hermétiques GasPak system (Becton Dickinson) dans lesquelles une enveloppe CampyPak™ BBL™ (Becton Dickinson) a été insérée et activée pour créer des conditions microaérobies. L'enveloppe a été remplacée après 2 jours d'incubation, l'incubation totale ayant duré 5 jours.

2.10.3.3. Culture sur géloses en condition anoxie

Cette expérience est semblable à celle de la section 2.10.3.1, à la différence que le milieu de culture RBS-2 (2) a été supplémenté de 0.377 g/L d'acétate de sodium anhydre, de 0.2 g/L de NaNO₂ et de 0.3 mL/L de la solution concentrée de CoCl₂•6H₂O à 0.015 g/100 mL, et que la croissance a été faite dans des jarres hermétiques dans lesquelles une enveloppe GasPak™ BBL™ (Becton Dickinson) a été insérée et activée pour créer des conditions anaérobies. Une bande indicatrice d'anaérobiose BBL™ (Becton Dickinson) a été insérée dans la jarre afin de confirmer l'absence d'oxygène dans la jarre. Parallèlement, des géloses avec le même milieu ont été incubées en conditions aérobies.

2.10.3.4. Culture sur milieu liquide en condition aérobie

Le milieu de culture utilisé a été le milieu RBS-2 (2) liquide supplémenté (voir section 2.10.3.3.) stérilisé par filtration sur 0.22 µm. Un volume de 100 µL de chacune des dilutions des fractions riches en PAO, obtenues par séparation par Percoll, a servi à ensemercer 5 mL de milieu RBS-2 (2) supplémenté. L'incubation a été effectuée pendant 5 jours à la température de la pièce avec une agitation de 200 rpm. Une extraction d'ADN par ébullition sur 0.2 µL de chaque dilution a été effectuée, suivie d'un PCR avec les amorces PAO ainsi qu'avec les amorces pA et pH, tel que décrit à la section 2.10.3.1.

2.10.4. Séquençage des ADNr 16S des isolats d'intérêt et étude phylogénique

L'ADN des isolats qui sont parvenus avec succès à la croissance en milieu liquide après les trois repiquages sur géloses a été extrait par billes de verre (section 2.9.2.). Ensuite, on a effectué un PCR avec les amorces pA et pH visant l'ADNr 16S. Les amplicons ont été séquencés et analysés tel que décrit à la section 3.9.5. Les séquences ont été déposées dans GenBank et correspondent aux numéros de références suivants : JPB-3.01 = EU652480 ; JPB-3.02 = EU652481 ; JPB-3.06b = EU652482 ; JPB-3.10 = EU652485 ; JPB-3.11 = EU652484 ; JPB-3.12 = EU652483 ; JPB-5.02 = EU652486 ; JPB-5.03 = EU652487 ; JPB-5.10 = EU652488 ; JPB5.11a = EU652489.

2.11. Élaboration d'une génothèque de PAO

2.11.1. Purification du produit PCR

Une génothèque de la biomasse du RBS-2 a été construite avec les amplicons obtenus suite au PCR effectué avec les amorces PAO462F et PAO651R. Deux produits PCR faits avec l'ADN prélevé en septembre 2006 ont été rassemblés à deux produits PCR faits avec l'ADN prélevé janvier 2007. L'ADN a été purifié à l'aide d'une trousse de purification QIAquick (QIAGEN, Montgomery County, MD, É.U.).

2.11.2. Ligation et transformation

Le produit PCR concentré (2 μ L et 4 μ L) a été mélangé à 5 μ L de tampon de ligation 2X rapide (60 mM Tris-HCl (pH 7.8), 20 mM $MgCl_2$, 20 mM DTT, 2 mM ATP et 10% de polyéthylène glycol), à 1 μ L (50 ng) du vecteur pGEM[®]-T Easy (Promega), à 1 μ L de T4 DNA Ligase (trousse pour la ligation de Promega) et à 1 μ L d'H₂O milli-Q stérile (seulement pour la réaction avec 2 μ L de produit PCR). Cette solution a été incubée pendant 1 heure à température pièce, puis pendant 3 jours à 4 °C. Ceci a permis aux fragments d'ADN de 200 paires de bases de s'insérer dans le vecteur pGEM[®]-T Easy de 3000 paires de bases (Figure 10). La transformation des cellules compétentes a ensuite eu lieu. Des géloses LB/ampicilline/IPTG/X-GAL (milieu LB : 10 g/L de Bacto[®] tryptone, 5 g/L de Bacto[®] extrait de levure, 5 g/L de NaCl pH 7.0, puis stérilisé à l'autoclave pendant 30 minutes ; lorsque la température atteint environ 50 °C, 0.1 mg/mL d'ampicilline, 0.1 mM d'IPTG [isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside] et 0.5 mM de XGAL [5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside] ont été ajoutés) ont été coulés et conservés à 4 °C. Les réactions de ligation ont été centrifugées brièvement et un volume de 3 μ L de chaque réaction de ligation a été transféré dans un tube de 1.5 mL stérile sur glace. En parallèle, un tube contrôle contenant 0.1 ng de plasmide non ligué a été préparé. Les cellules compétentes à haute efficacité JM109 (Promega) ont été placées pendant 5 minutes dans un bain de glace. Ces dernières ont ensuite été mélangées doucement en inversant le tube, puis un volume de 50 μ L a été transféré et mélangé à chaque tube de réaction de ligation et 100 μ L au contrôle. Les tubes ont été incubés sur la glace pendant 20 minutes. Les cellules ont ensuite été soumises à un choc thermique de 45-50 secondes dans un bain à 42 °C, sans agitation, après quoi elles ont été retournées sur la glace pour 2 minutes. Enfin, les cellules et le contrôle ont été incubés pendant 1.5 heure à 37 °C avec une agitation de 150 rpm en présence de 950 μ L de milieu SOC tempéré (20 g/L de Bacto[®] tryptone, 5 g/L de Bacto[®] extrait de levure, 0.1 mL/L de NaCl 1M, 0.025 mL/L de KCl 1M, 0.1 mL/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1M, 0.1 mL/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1M et 10 mL/L de glucose 2 M [pour le contrôle]). Un volume de 200 μ L de chaque réaction de ligation a servi à ensemercer 2 géloses LB/ampicilline/IPTG/X-GAL, puis une gélose a étéensemencée avec 200 μ L de la réaction contrôle diluée avec du milieu LB 1:10. Une incubation de toute la nuit à 37 °C a permis la croissance des colonies. Les colonies blanches ont été repiquées dans 3 mL de milieu LB + 10 μ g/mL ampicilline et incubées à 37 °C toute la nuit, sous agitation.

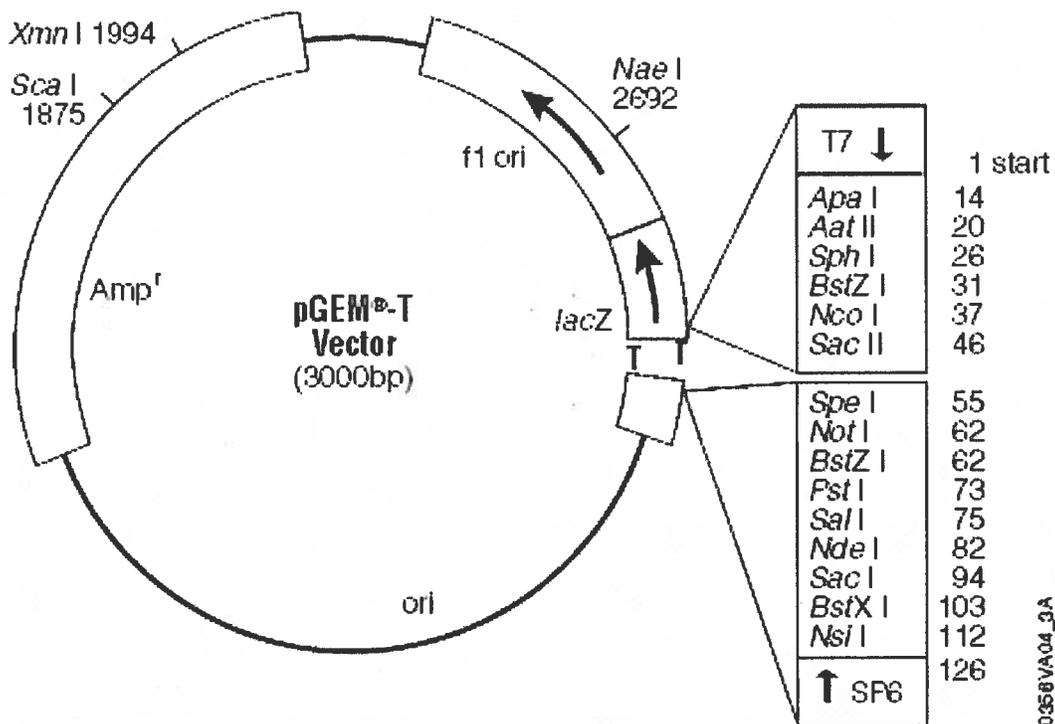


Figure 10. Carte du vecteur pGEM[®]-T Easy (Promega). La partie agrandie correspond aux sites de clonage multiple et la localisation des sites d'hybridation des amorces Sp6 et T7.

2.11.3. Extraction d'ADN plasmidique des clones et criblage par PCR-DGGE

Un volume de 1 mL de culture bactérienne de chaque clone a été transféré dans un tube de 1.5 mL et centrifugé à 13 000 rpm pendant 30 secondes. Le culot a été lavé avec 500 µL de TEN (Tris HCl 50 mM, EDTA 1 mM et NaCl 150 mM), centrifugé puis dispersé à nouveau dans 250 µL de TEN. Ces suspensions ont été agitées fortement au vortex pendant 15-30 secondes après l'ajout d'un volume de 300 µL de phénol/chloroforme/isoamyl (voir section 2.9.2). Une centrifugation de 5 minutes à 13 000 rpm a permis d'éliminer les débris et de conserver l'ADN dissous dans la phase aqueuse. Un volume de 200 µL de la phase aqueuse du haut a été ajouté et mélangé à des tubes contenant 50 µL d'acétate d'ammonium 10 N, puis les tubes ont été incubés à -20 °C pendant 75 minutes en présence d'un volume de 500 µL d'éthanol 95 %. L'ADN ayant précipité, les tubes ont été centrifugés et le surnageant éliminé. Un dernier ajout d'éthanol 70 % a été fait avant de centrifuger 2 minutes à 13 000 rpm, et le culot d'ADN dissout dans 50 µL d'eau. La vérification de la présence d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose a été effectuée de façon identique à la section 2.9.2. Le criblage par PCR-DGGE a été fait comme à la section 2.9.4.1, avec les amorces PAO462F-GC et PAO651R.

2.11.4. Séquençage des clones d'intérêt et étude phylogénique

Un représentant de chaque groupe de clones établi par le criblage par DGGE (section précédente) a été séquençé. Pour ce faire, les fragments clonés ont été amplifiés avec les amorces Sp6 et T7 (Tableau 1) visant les régions adjacentes au site d'insertion du plasmide pGEM[®]-T Easy. Les amplicons ont ensuite été séquençés tel que décrit à la section 2.9.5, ceci à partir de l'extrémité Sp6 uniquement. Les séquences reçues ont été corrigées et coupées aux extrémités au lieu de reconnaissance des amorces PAO462F et PAO651R. Une étude phylogénétique a ensuite été réalisée tel que décrit à la section 2.9.5. Le groupe externe utilisé pour cet arbre a été la séquence de la bactérie *Escherichia coli* (numéro d'accès J01859). Les séquences des clones ont été déposées dans GenBank et correspondent aux numéros de références suivants : JPBCL01 = EU652491; JPBCL02 = EU652492; JPBCL06 = EU652493; JPBCL07 = EU652494; JPBCL22 = EU652495; JPBCL29 = EU652496; JPBCL34 = EU652497.

Chapitre 3. Résultats

3.1. Optimisation des performances des réacteurs RBS

Deux traitements complémentaires au traitement aérobie thermophile du lisier de porc ont été étudiés dans des réacteurs de type RBS de 1 L. Le RBS-1 a permis de traiter l'effluent thermophile à des conditions favorisant la nitrification et la dénitrification, alors que le RBS-2 a permis de traiter l'effluent thermophile à des conditions favorisant la déphosphatation, la nitrification et la dénitrification. . Les conditions d'opération des RBS-1 et RBS-2 sont décrites à la figure 11.

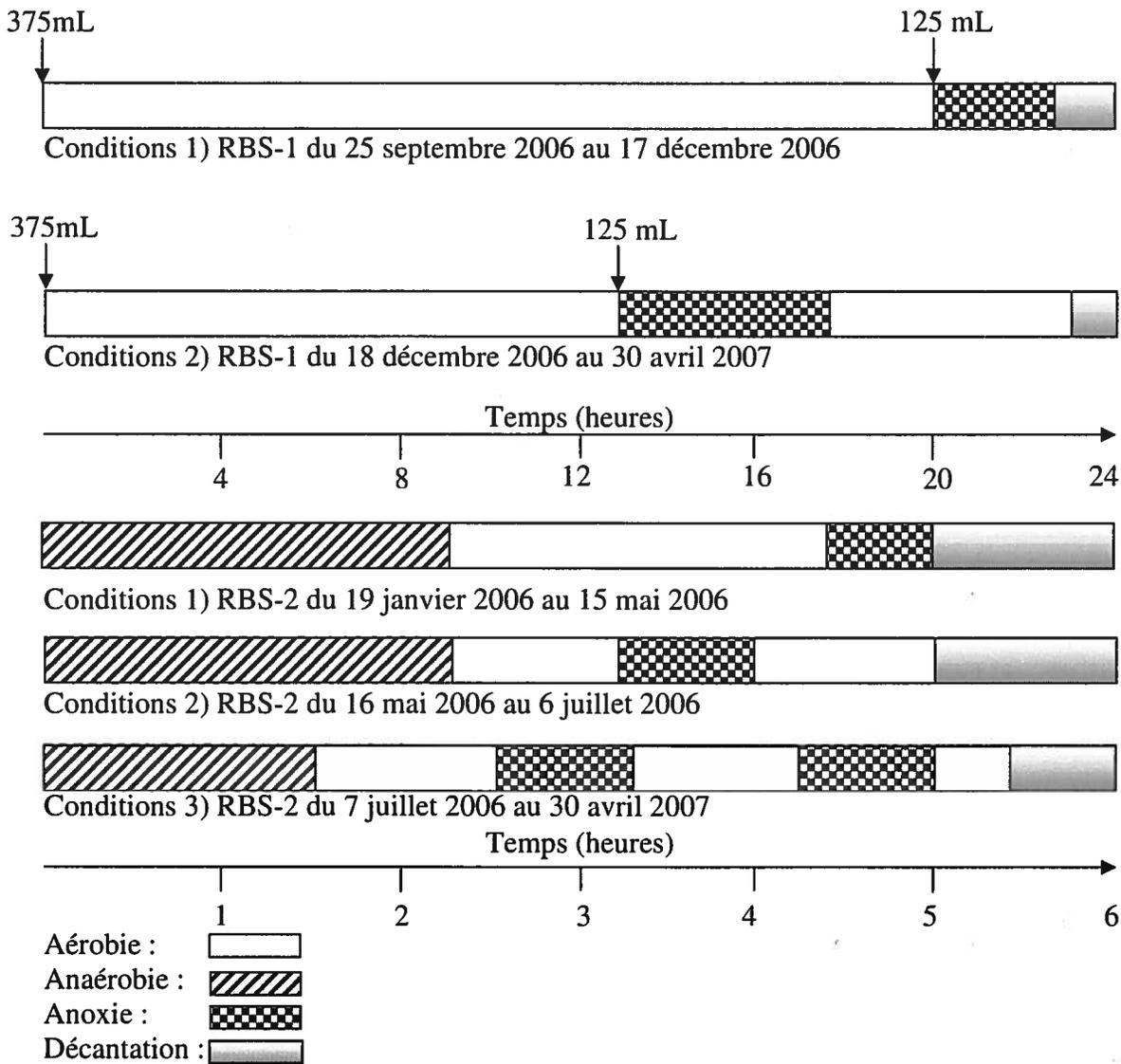


Figure 11. Conditions d'opération des RBS-1 et RBS-2. L'alimentation a été incluse dans la première étape et était de 500 mL, sauf là où les spécifications indiquaient autrement. L'étape de décantation incluait la vidange d'environ 470 mL d'effluent et se faisait en condition d'anoxie. De la liqueur mixte a été soutirée à la fin de la dernière période aérobie de chaque cycle de manière maintenir un âge de boue de 14 jours. Le volume de liqueur mixte soutiré variait selon les derniers calculs de la concentration en solides de cette dernière. Le volume de la liqueur mixte additionné au volume de vidange était toujours égal à 500 mL.

Les caractéristiques de l’affluent, soit le lisier partiellement traité et centrifugé, sont présentées dans le Tableau 2. Ce tableau expose également la dilution de l’effluent thermophile utilisée pour constituer les affluents des RBS 1 et 2 ainsi que les caractéristiques de ces derniers. L’affluent du RBS-2 a été supplémenté en acétate et en phosphore afin d’obtenir un ratio carbone/phosphore/azote pour lequel l’efficacité d’enlèvement du phosphore et de l’azote a déjà été démontrée dans la littérature (Smolders *et al.*, 1994). Deux affluents ont été utilisés pour opérer le RBS-2. Le premier affluent, composé de l’effluent thermophile dilué 1/40, a été utilisé pour démarrer le bioréacteur. Le second affluent RBS-2, composé de l’effluent thermophile dilué 1/20, a ensuite remplacé ce premier affluent lorsque le système était performant dans son élimination de la charge azotée, carbonée et phosphorée. Les bioréacteurs devront éventuellement être opérés avec l’effluent thermophile non dilué et non supplémenté en acétate, mais cet objectif ne faisait pas partie du présent travail.

Tableau 2. Caractéristiques du lisier partiellement traité et centrifugé et des affluents RBS-1 et RBS-2 dilués et supplémentés.

	Effluent thermophile centrifugé	Affluent RBS-1 (Effluent thermo. 1/5)	Affluent RBS-2 (Effluent thermo. 1/40)	Affluent RBS-2 (Effluent thermo. 1/20)
[Acétate] (mg/L)	472	94	300	460
[N-NH ₃] (mg/L)	1200	240	30	60
[P-PO ₄] (mg/L)	307	61	15	30
DCO (mg/L)	6587	1560	600	1145

3.1.1. Conduite des opérations du bioréacteur RBS-1

Ce traitement a été mis de l’avant de façon très sommaire comparativement au traitement effectué avec le RBS-2. Ce bioréacteur a été maintenu en opération pendant près de 6 mois, soit du 25 septembre 2006 au 30 avril 2007. Deux conditions opératoires ont été privilégiées (1 et 2). Ainsi, dans les conditions 1 (Figure 11), l’azote ammoniacal était complètement oxydé à la fin de la période aérobie. Par contre, à la fin de la période d’anoxie, du nitrite et du nitrate étaient présents en grandes concentrations dans l’effluent et s’accumulaient avec les cycles (résultats non présentés). De plus, de l’azote ammoniacal était rejeté avec l’effluent, celui-ci ayant été incorporé au bioréacteur lors de la deuxième période d’alimentation précédant la période d’anoxie. Dans la

condition 2, le cycle a été modifié en avançant et en prolongeant la période d'anoxie, puis en terminant le cycle par une période d'aérobie (Figure 11). C'est probablement ainsi que l'effluent ne contenait plus d'azote ammoniacal, par contre, le nitrate s'accumulait toujours (Figure 12.C). L'étude détaillée de ce traitement n'a pas été poursuivie davantage lors de la présente étude.

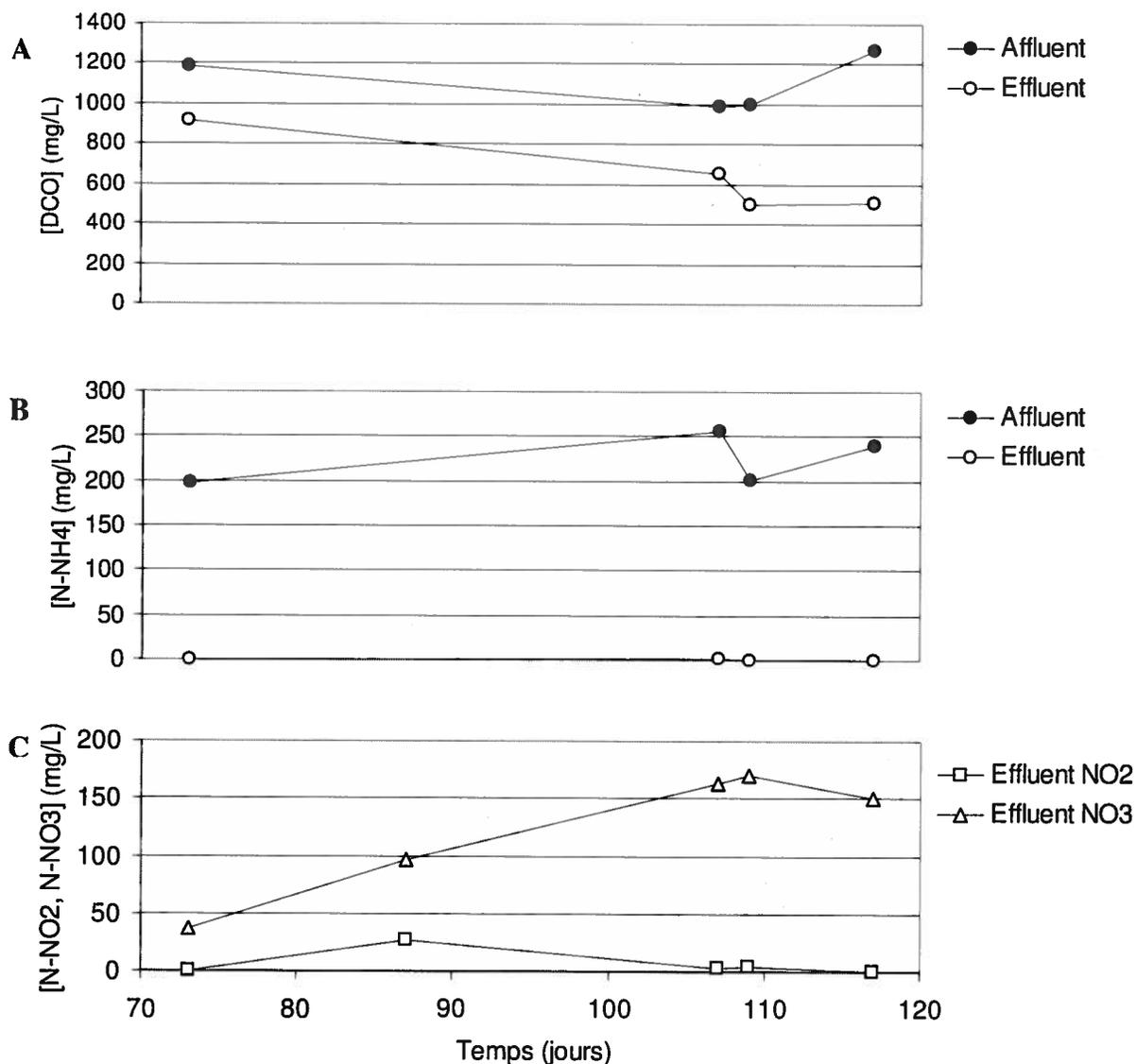


Figure 12. Performances du RBS-1 du 27 février 2007 au 12 avril 2007. A) Suivi de la DCO. B) Suivi de l'azote ammoniacal. C) Suivi du nitrite et du nitrate. Le compte des jours débute au premier jour de la mise en place de la condition 2, soit au jour 72. Les valeurs des concentrations de N-NO₂ et N-NO₃ dans l'affluent n'ont pas été insérées dans le graphique C, celles-ci étant nulles.

3.1.2. Conduite des opérations du bioréacteur RBS-2

Le bioréacteur RBS-2 a été maintenu actif pendant près de 15 mois, soit du 19 janvier 2006 au 30 avril 2007. Après deux mois d'acclimatation (19 janvier au 9 mars 2006), des analyses physico-chimiques ont été effectuées sur des échantillons d'affluent et d'effluent du 10 mars 2006 au 11 avril 2007 (Figure 13). Le premier ensemble de conditions d'opération (Condition 1, Figure 11) permettaient déjà d'observer une légère déphosphatation, une nitrification complète et une dénitrification partielle puisque beaucoup de nitrate se retrouvait dans l'effluent. L'hypothèse émise alors afin d'expliquer cette dénitrification insatisfaisante était qu'il restait probablement des concentrations en carbone insuffisantes à la fin de la période aérobie pour permettre ensuite la dénitrification en condition d'anoxie. Pour cette raison, le cycle initial a été modifié en avançant la période d'anoxie (Conditions 2, Figure 11). La dénitrification s'est bien améliorée suite à la modification de cette condition d'opération. Par contre, la déphosphatation est demeurée en deçà des performances visées. Afin d'améliorer la déphosphatation, les cycles d'opération ont été modifiés, cette fois-ci en diminuant la période d'anaérobie, puis en permettant une meilleure captation du phosphore soluble par des périodes prolongées et intercalées d'aérobie et d'anoxie (Conditions 3, figure 8). Cette modification a permis une légère diminution des concentrations de phosphore soluble dans l'effluent. Lorsque les performances ont semblé stables, l'affluent 1/40 a été remplacé par l'affluent 1/20. Ce changement a semblé être bien toléré par la biomasse car l'enlèvement des fertilisants est demeuré efficace.

Les performances du bioréacteur ont été perturbées à quelques reprises entre le 7 novembre et le 22 décembre 2006. Le 7 novembre 2006, un problème d'injection d'acide a provoqué l'arrêt du RBS-2 pendant près de 24 heures. Ensuite, lors d'une routine de nettoyage des parois du RBS, une bonne partie de la biomasse (près du tiers) a été perdue. Finalement, l'aération s'est faite de moins en moins efficacement à partir du mois de décembre à cause du colmatage graduel du diffuseur d'air. Le problème a été résolu lorsque le diffuseur a été remplacé le 22 décembre 2006. Tous ces événements expliquent la diminution des performances du RBS-2 entre ces dates (Figure 13).

Les grandes fluctuations de la composition de l'affluent observées à la Figure 13 sont dues, d'une part, à l'altération de ce dernier lors de l'entreposage à 6 °C. Cette altération a été réduite en augmentant la fréquence de fabrication d'affluent frais, diminuant le temps d'entreposage de

ce dernier. D'autre part, la supplémentation en phosphore et en acétate est demeurée la même, quelle que soit la chaudière de provenance de l'effluent thermophile utilisé pour fabriquer l'affluent. Toutefois, il a été remarqué plus tard que les concentrations en polluants variaient d'une chaudière à l'autre. Le travail d'optimisation des conditions d'opération de ce bioréacteur n'a pas été élaboré davantage au profit d'un investissement aux études de la flore microbienne composant ce dernier.

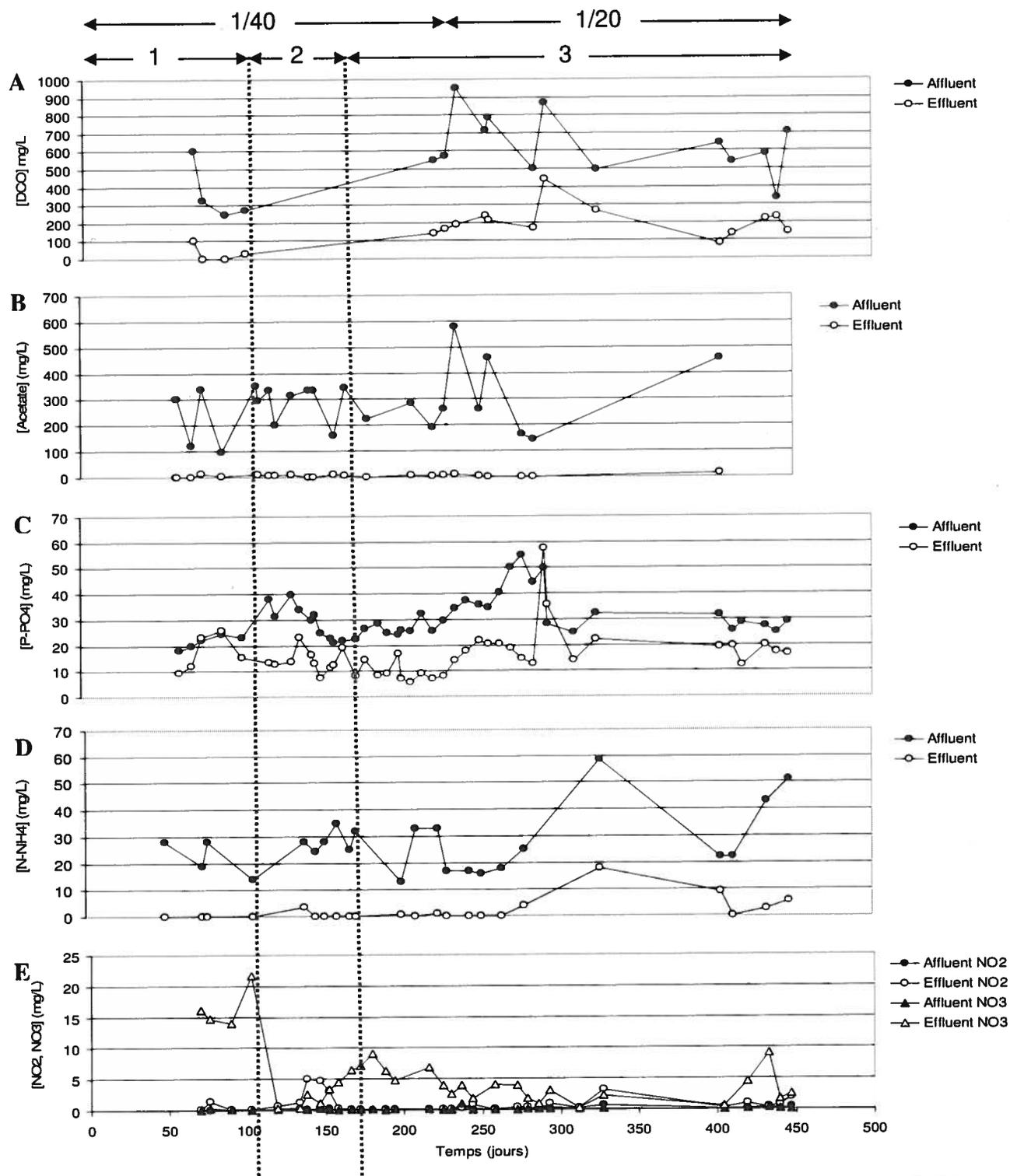


Figure 13. Performances du RBS-2 du 10 mars 2006 au 11 avril 2007. A) Suivi de la DCO. B) Suivi de l'acétate. C) Suivi du phosphore soluble. D) Suivi de l'azote ammoniacal. E) Suivi du nitrate et du nitrite. Le jour 1 correspond au jour du démarrage du réacteur selon les conditions 1. Les chiffres 1, 2 et 3 désignent les conditions d'opération telles que décrites à la section Matériel et Méthodes (Figure 8). L'affluent 1/20 a remplacé l'affluent 1/40 après 223 jours d'opération.

3.2. Caractérisation de la flore microbienne présente dans le RBS-2

3.2.1. Observation des floccs au microscope avec les colorations Neisser et PHA

La caractérisation de la flore microbienne présente dans le RBS-2 a commencé par la coloration des bactéries composant la biomasse de ce bioréacteur. Les colorations Neisser et PHA colorent respectivement de façon spécifique les granules de poly-P et les granules de PHA. Ces deux techniques de coloration devraient permettre de démontrer qu'une boue activée contenant des PAO foisonnerait de cellules avec des PHA à la fin de la période anaérobie, mais en contiendrait très peu à la fin de la période aérobie. Inversement, il y aurait un faible nombre de cellules riches en granules poly-P (positives à la coloration Neisser) à la fin de la période anaérobie, mais plusieurs cellules en contiendraient beaucoup à la fin de la période aérobie. Il devrait aussi être possible d'associer un ou plusieurs types cellulaires précis à ces phénomènes.

Les colorations Neisser et PHA ont été réalisées sur des échantillons de biomasse récoltés dans le RBS-2 récoltés à la fin de la période anaérobie ainsi qu'à la fin de la période aérobie (Figures 14, 15, 16 et 17). Il a ainsi été possible de comparer l'évolution de la taille et du nombre de granules de poly-P et de PHA dans les cellules soumises à ces variations de conditions. Le Tableau 3 fait la comparaison des types morphologiques colorés positivement et négativement à ces deux colorants. Aucun type morphologique n'a clairement démontré une coloration correspondant à ce qui était attendu des PAO. De plus, il n'y avait pas de différence significative entre les échantillons prélevés durant un cycle (fin de période aérobie versus fin de période anaérobie) quant aux nombres de cellules montrant des granules de poly-P ou de PHA.

La biomasse a été colorée en conservant sa structure organisationnelle, soit la forme de floccs. Bien souvent, il a été difficile de distinguer clairement la forme des bactéries au centre des floccs, celles-ci étant trop densément regroupées. Pour cette raison, le champ de la plupart des photos n'expose qu'une extrémité d'un flocc. Quatre champs différents sont présentés pour chaque coloration afin de visualiser une plus grande diversité de types morphologiques. Des photos de biomasse colorée à différentes dates sont présentées ici uniquement lorsque de nouveaux types morphologiques ont été observés à des dates ultérieures.

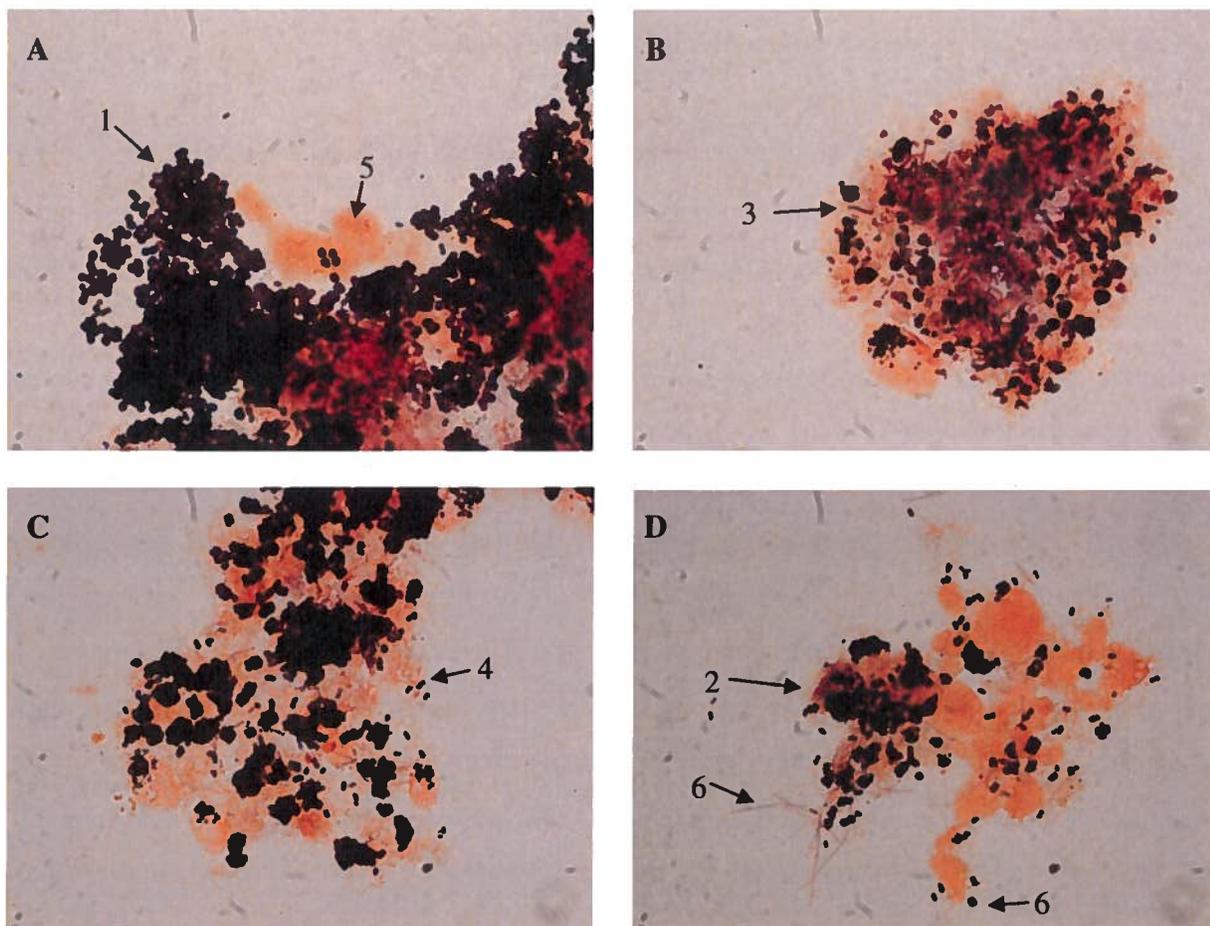


Figure 14. Coloration Neisser de la biomasse échantillonnée à la fin de la période anaérobie. Photos A, B, C et D : colorations du 19 avril 2006. Magnitude 1000X sur microscope confocal Eclipse E800 (Nikon). Les chiffres font référence aux types morphologiques décrits au Tableau 3.

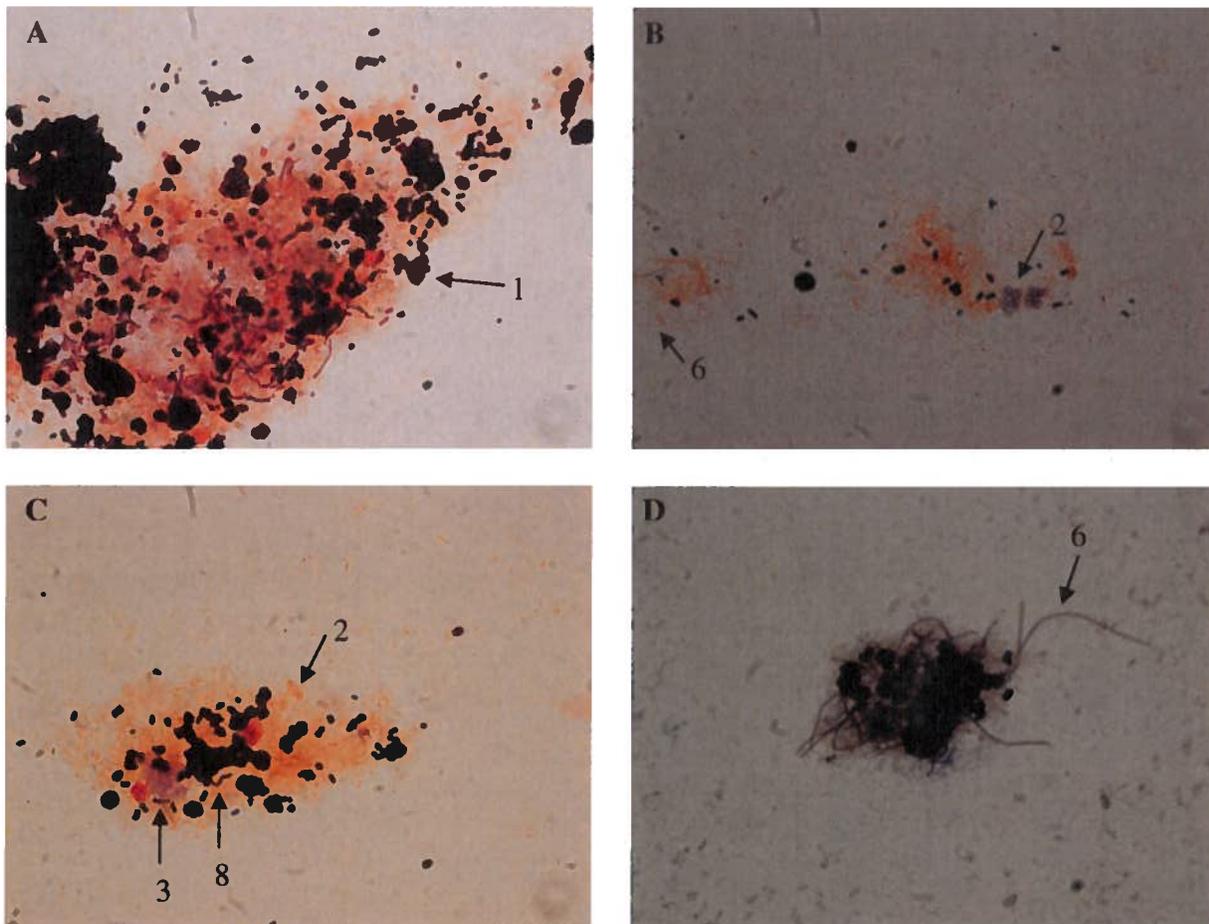


Figure 15. Coloration Neisser de la biomasse échantillonnée à la fin de la période aérobie. Photos A, B et C : colorations du 19 avril ; D : coloration du 9 mai. Magnitude 1000X sur microscope confocal Eclipse E800 (Nikon). Les chiffres font référence aux types morphologiques décrits au Tableau 3.

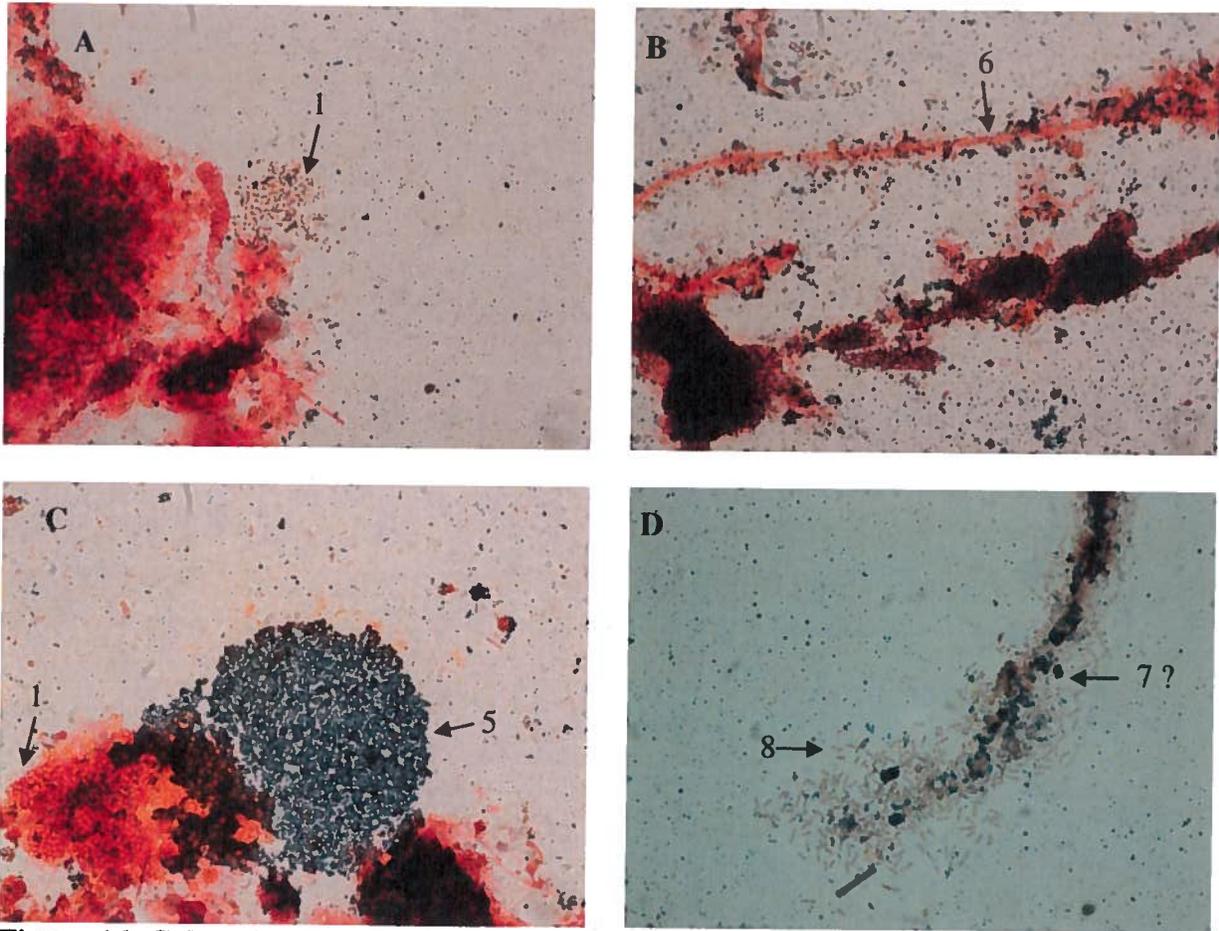


Figure 16. Coloration PHA de la biomasse échantillonnée à la fin de la période anaérobie. Photos A, B et C : colorations du 19 avril ; D : coloration du 6 juin. Magnitude 1000X sur microscope confocal Eclipse E800 (Nikon). Les chiffres font référence aux types morphologiques décrits au Tableau 3.

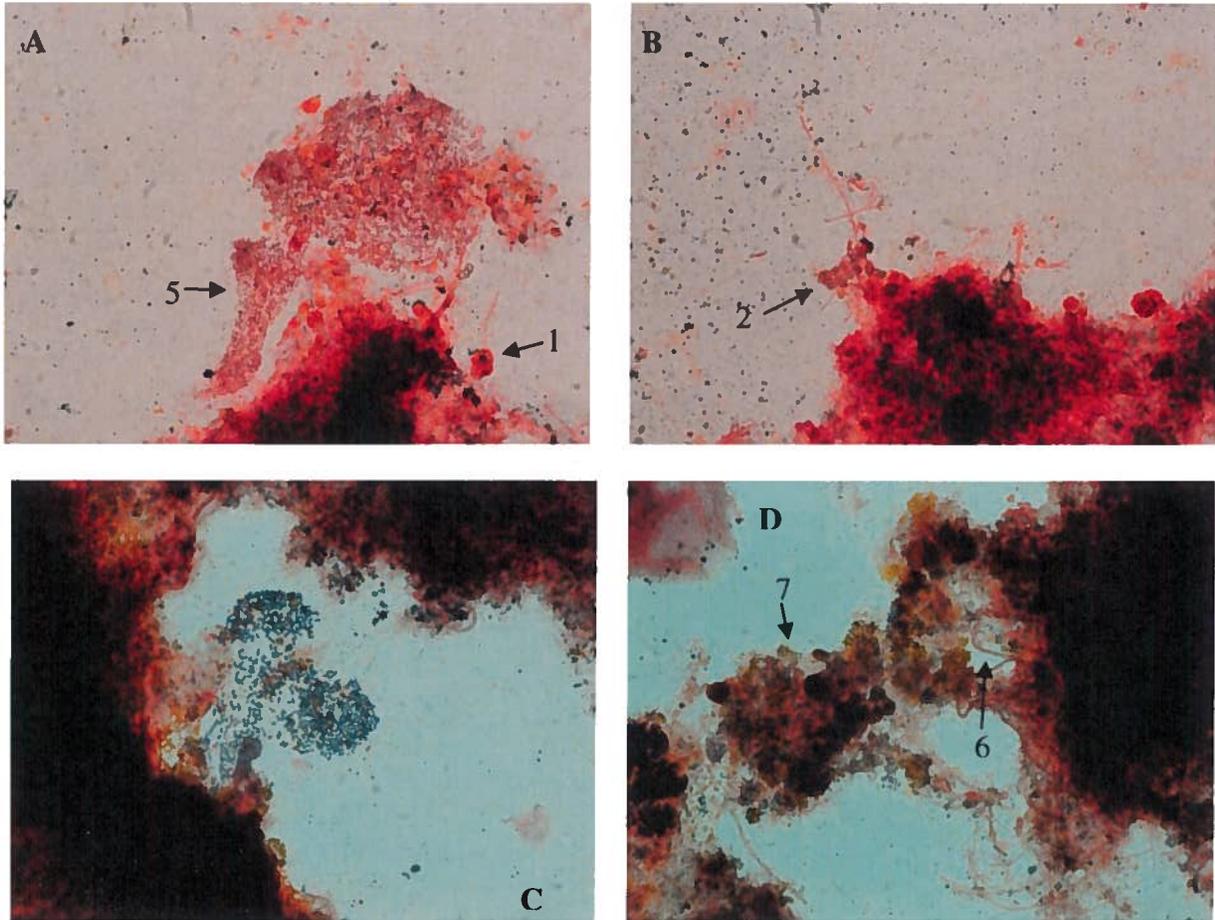


Figure 17. Coloration PHA de la biomasse échantillonnée à la fin de la période aérobie. Photos A et B : colorations du 19 avril ; C et D : colorations du 5 avril. Magnitude 1000X sur microscope confocal Eclipse E800 (Nikon). Les chiffres font référence aux types morphologiques décrits au Tableau 3.

Tableau 3. Comparaison des types morphologiques observés après colorations Neisser et PHA des cellules prélevées à la fin de la période anaérobie et à la fin de la période aérobie.

Types morphologiques	Coloration Neisser		Coloration des granules de PHA	
	Après anaérobie (Fig. 14)	Après aérobie (Fig. 15)	Après anaérobie (Fig. 16)	Après aérobie (Fig. 17)
1 : Grosses coques en agrégats	Oui – positives (A, B, C et D)	Oui – positives (A, B, C et D)	Oui – négatives (C) et avec régions positives à deux extrémités (A)	Oui – négative (A et B)
2 : Tétrades contour plus foncé	Oui – positives (D) et négatives (C)	Oui – positives (B) et négatives (C)	Non	Oui – positives (B)
3 : Petites coques en chapelets	Oui – positives (B et C)	Oui – positives (A et C)	Non	Non
4 : Coques doublets	Oui – positives (C et D)	Oui – positives (A, B et C)	Oui – positives (B)	Non
5 : Petites coques en agrégats	Oui – Négatives (A, B, C et D)	Oui – Négatives (A, B et C)	Oui – positives (B, C et D)	Oui – positives et négatives (A)
6 : Filamenteuses	Oui – positives et négatives (D)	Oui – positives (D) et négatives (B)	Oui – négatives (A, B et C)	Oui – négatives (A, B, C et D) et avec petits points positifs (D)
7 : Tétrades centre foncé	Non	Non	Oui ? (D)	Oui (D)
8 : Bacilles parfois en chapelet	Non	Oui – positive (C)	Oui – petits points positifs au centre (D)	Oui – positives (C)

Les lettres entre parenthèses réfèrent à la photo où le type morphologique a été observé.
 Oui = Présences ; Non = Absences ; Positives = coloration positive ; Négatives = coloration négative.

3.2.2. Isolement des colonies

Un premier isolement de bactéries présentes dans le réacteur RBS-2 a été effectué en ensemençant le consortium microbien sur géloses R2A supplémenté en acétate (20 isolats) et RBS-2 (1) (14 isolats). Ce travail a permis d'identifier certaines bactéries d'intérêt et certaines bactéries évoluant en présence des bactéries d'intérêt pour le traitement biologique. Les Tableaux 4 et 5 décrivent l'apparence de ces colonies isolées à partir de la biomasse du RBS-2.

Dès qu'un doute était porté sur la non-similarité entre deux colonies, les deux étaient conservées pour les repiquages suivants. Ainsi, certaines colonies ont été sélectionnées même si elles présentaient une apparence semblable à d'autres colonies déjà sélectionnées ayant poussé sur d'autres géloses. Toutes les colonies ont subi trois repiquages sur géloses de leur milieu respectif, puis un repiquage en milieu liquide afin d'extraire l'ADN. Les isolats JPB-1.10, JPB-2.12 et JPB-2.13 ont été retirés de notre échantillonnage car ils ne sont pas parvenus à croître jusqu'au troisième repiquage sur milieu solide ou jusqu'en milieu liquide.

Tableau 4. Description des colonies isolées sur gélose R2A supplémentées en acétate et incubées à température pièce en condition aérobie.

Colonie	Isolée à partir de la dilution	Description
JPB-1.01	10 ⁻⁷	Beige, Ø 8 mm, un peu granuleuse.
JPB-1.02	10 ⁻⁵	Beige allant au transparent aux extrémités, Ø 18 mm, motifs ressemblant à une mosaïque.
JPB-1.03	10 ⁻⁵	Orange, Ø 2mm, lisse.
JPB-1.04	10 ⁻⁵	Beige-jaune, Ø 3mm, lisse.
JPB-1.05	10 ⁻⁵	Beige, Ø 7 mm, bombée au centre et étalée en périphérie.
JPB-1.06	10 ⁻⁵	Beige pâle presque transparente, Ø 2 mm, lisse et bombée au centre.
JPB-1.07	10 ⁻⁵	Beige, Ø 2.5 mm, motifs de lignes partant du centre.
JPB-1.08	10 ⁻⁵	Beige au centre, contour transparent, Ø 5 mm total (3.5 mm centre beige).
JPB-1.09	10 ⁻⁵	Beige, Ø 2mm, lisse.
JPB-1.10	10 ⁻⁵	Blanche-transparente, Ø 1.5 mm, lisse.
JPB-1.11	10 ⁻⁵	Beige-jaune, Ø 1.5 mm, lisse, bombée au centre.
JPB-1.12	10 ⁻⁴	Beige opaque, Ø 2 mm, texture caoutchouteuse et en forme de volcan.
JPB-1.13	10 ⁻⁴	Beige au centre, contour transparent, Ø 5 mm total (3.5 mm centre beige).
JPB-1.14	10 ⁻⁴	Beige-rose pâle, Ø 3mm, lisse.
JPB-1.15	10 ⁻⁴	Beige, Ø 2.5 mm, motifs de lignes partant du centre.
JPB-1.16	10 ⁻³	Jaune, Ø 1.5 mm, lisse.
JPB-1.17a*	10 ⁻²	Rose foncé, Ø 2 mm, lisse.
JPB-1.17b*	10 ⁻²	Beige, Ø 3.5 mm, forme irrégulière, lisse.
JPB-1.17c*	10 ⁻²	Beige, Ø 5 mm, motifs ressemblant à une mosaïque.
JPB-1.18	10 ⁻⁶	Beige, Ø 18 mm, motifs ressemblant a une mosaïque lissée.

Ø = diamètre

* Ces trois colonies étaient ensemble lors du premier repiquage et elles ont été séparées au deuxième repiquage.

Tableau 5. Description des colonies isolées sur gélose RBS-2 incubées à température pièce en condition aérobie.

Colonie	Isolée à partir de la dilution	Description
JPB-2.01	10 ⁻⁸	Beige-transparente, Ø 21 mm, style « mosaïque ».
JPB-2.02	10 ⁻⁷	Beige, Ø 11 mm, motifs de lignes partant du centre.
JPB-2.03	10 ⁻⁷	Beige-jaune, Ø 1.5 mm diamètre, lisse.
JPB-2.04	10 ⁻⁶	Beige-rose, Ø 1.5 mm, lisse.
JPB-2.05	10 ⁻⁶	Beige foncé, Ø 2.5 mm, lisse.
JPB-2.06	10 ⁻⁶	Beige, Ø 2.5 mm, motifs de lignes partant du centre.
JPB-2.07	10 ⁻⁵	Beige, Ø 1 mm, lisse.
JPB-2.08	10 ⁻⁵	Transparent, Ø 1 mm, lisse.
JPB-2.09	10 ⁻⁵	Beige-transparent, 14 mm, style « mosaïque ».
JPB-2.10	10 ⁻⁵	Beige, Ø 1mm, texture assez solide.
JPB-2.11	10 ⁻⁵	Beige, Ø 2 mm, lisse
JPB-2.12	10 ⁻⁵	Beige, Ø 1 mm, croissance sur un type semblable à JPB-2.01.
JPB-2.13	10 ⁻⁴	Transparente, Ø 1 mm, lisse
JPB-2.14	10 ⁻⁴	Beige, Ø 2.5 mm, motifs de lignes partant du centre

Ø = diamètre

3.2.3. Criblage des colonies préalablement à l'envoi au séquençage

L'ADN total des isolats JPB-1.01 à JPB-1.18 et JPB-2.01 à JPB-2.14 a été extrait et une partie du gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR avec les amorces PRBA341F-GC / PRUN518R. Les amplicons ont été migrés par génothèque de type DGGE. La Figure 18 présente les résultats de ce criblage. Les gels A et B ont été accomplis simultanément. Le gel C a été réalisé plus tard; c'est pourquoi les isolats JPB-1.17b et JPB-2.01 ont été réintroduits dans des puits de ce gel afin de servir de points de repère pour les autres isolats chargés dans le gel C. Sur chaque gel, un produit PCR issu de l'amplification avec les amorces PRBA341F-GC / PRUN518R sur le consortium complet du RBS-2 a été inséré pour permettre de mieux comparer les gels entre eux et pour faire correspondre les principales bandes du consortium aux bandes des isolats.

Sur la base de cette analyse, 13 génotypes ont été identifiés, chacun ayant un profil DGGE distinct. Les isolats JPB-1.16, JPB-2.11 et JPB-2.14 n'ont pas produit de bandes sur le gel C, même si l'amplification PCR avec les amorces PRBA341F-GC / PRUN518R avait bien fonctionné; aux fins de criblage, ces trois isolats ont donc été considérés comme trois génotypes distincts. Chaque génotype correspondait à un seul isolat, à l'exception d'un profil qui était partagé par JPB-1.01, JPB-1.02, JPB-1.05, JPB-1.06, JPB-1.08, JPB-1.13, JPB-1.14, JPB-1.17c, JPB-2.01, JPB-2.02, JPB-2.03, JPB-2.04, JPB-2.05 et JPB-2.06. Dans ce dernier cas, un criblage supplémentaire par RFLP a été réalisé afin de vérifier l'homogénéité génotypique du groupe (Figure 19.). Seul l'isolat JPB-2.03 a montré un profile RFLP différent des autres. À la lumière des résultats de ces deux méthodes de criblage, la presque totalité des gènes de l'ARNr 16S des isolats JPB-1.01, JPB-1.03, JPB-1.07, JPB-1.09, JPB-1.11, JPB-1.12, JPB-1.15, JPB-1.16, JPB-1.17a, JPB-1.17b, JPB-1.18, JPB-2.01, JPB-2.03 JPB-2.07, JPB-2.08, JPB-2.09, JPB-2.10, JPB-2.11 et JPB-2.14 a été amplifiée et les amplicons résultants ont été envoyés au séquençage. Quatre tentatives d'amplification de l'isolat JPB-1.04 ont été menées, sans succès. Cet isolat n'a donc pas pu être envoyé au séquençage.

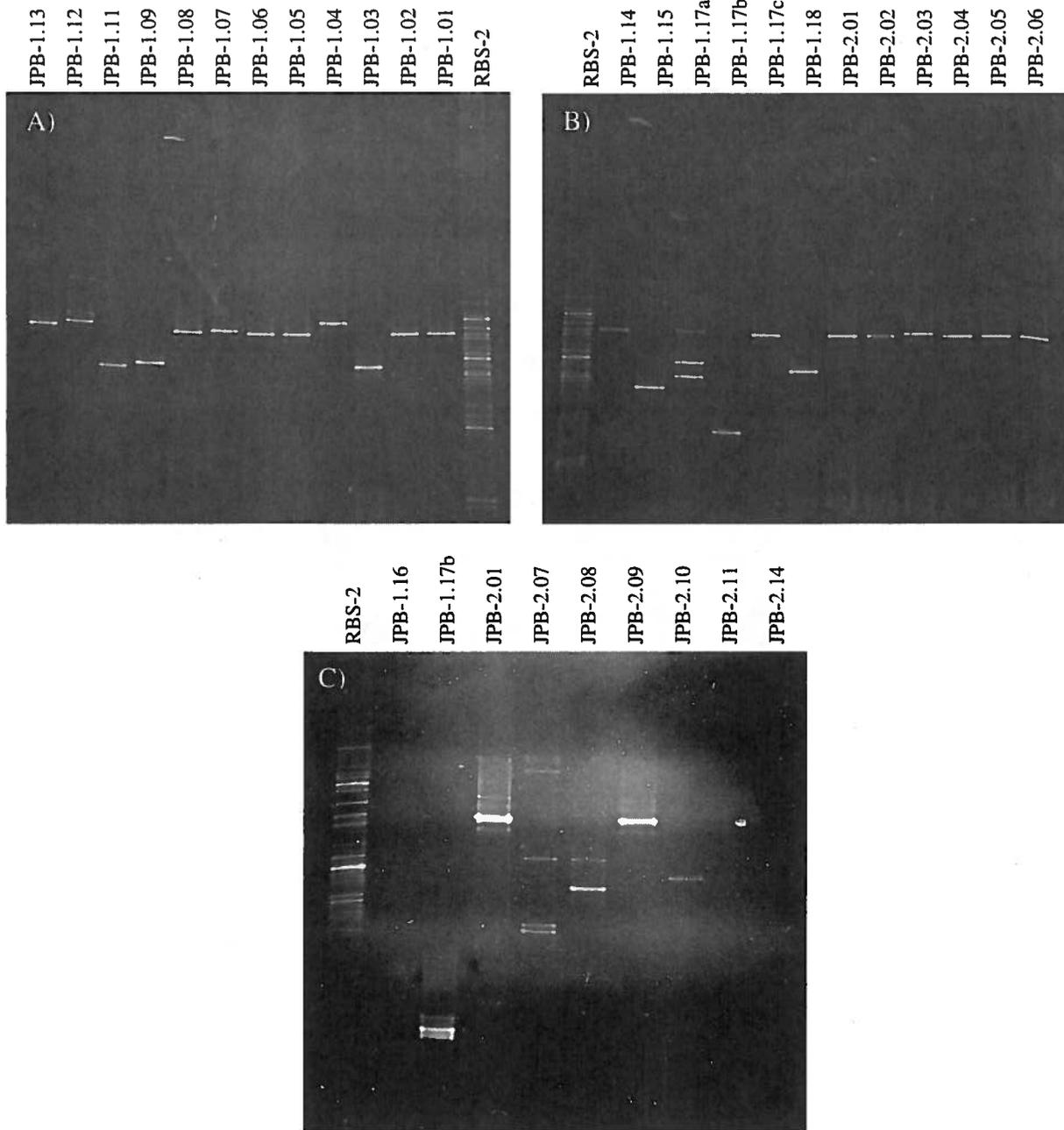


Figure 18. Criblage des isolats par PCR-DGGE. Un gradient dénaturant 0-80 % a été utilisé pour les gels A et B, et 20-75 % pour le gel C.

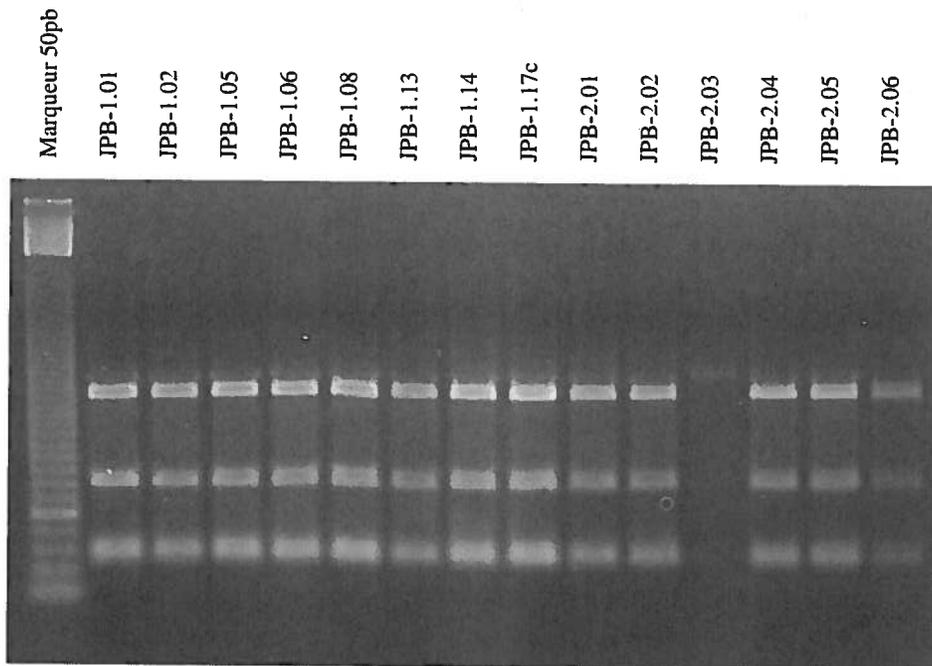


Figure 19. Patron de restriction pour les isolats dont le patron sur DGGE est similaire. Les digestions ont été effectuées sur les isolats JPB-1.01, JPB-1.02, JPB-1.05, JPB-1.06, JPB-1.08, JPB-1.13, JPB-1.14, JPB-1.17c, JPB-2.01, JPB-2.02, JPB-2.03, JPB-2.04, JPB-2.05 et JPB-2.06 avec l'enzyme de restriction AfaI.

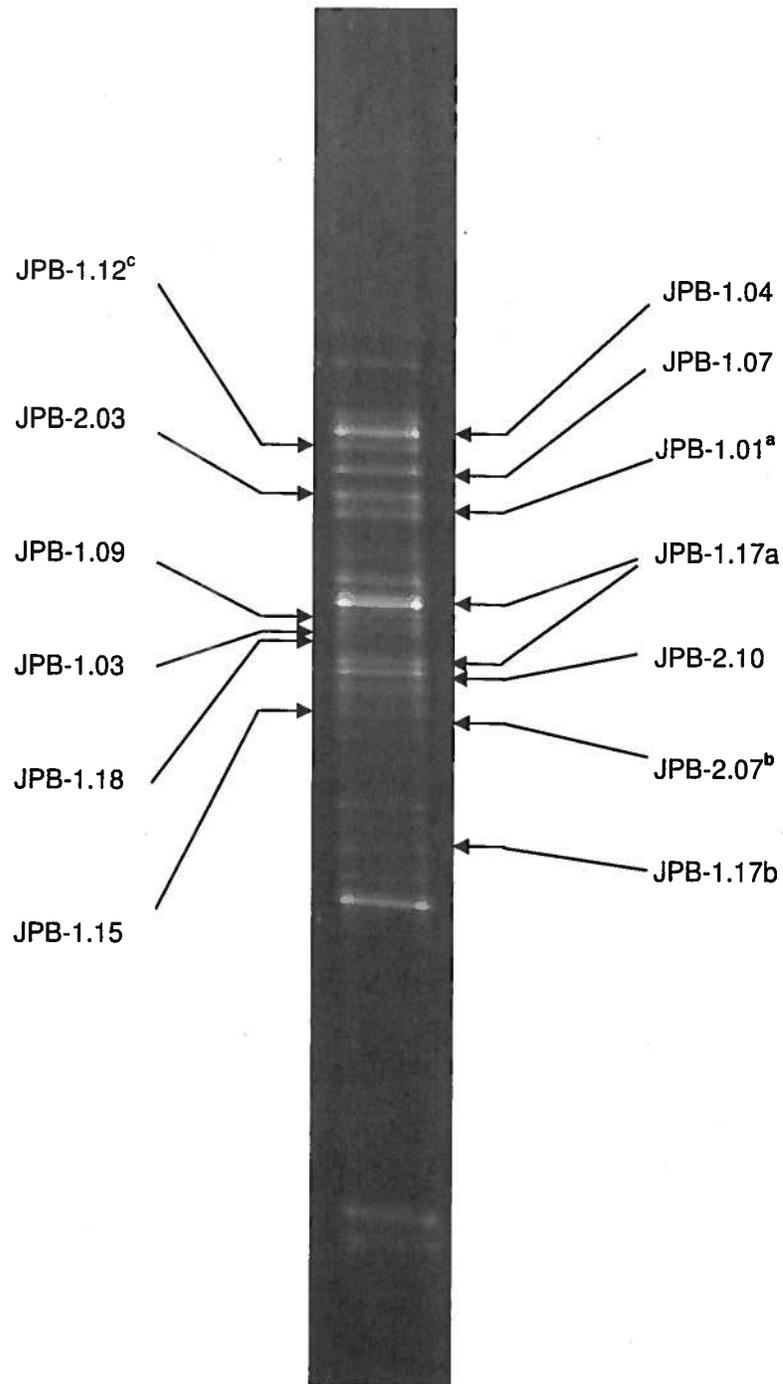


Figure 20. Identification de certaines bandes du consortium bactérien du RBS-2 grâce au séquençage des colonies isolées. ^a Même position que JPB-1.02, JPB-1.05, JPB-1.06, JPB-1.08, JPB-1.11, JPB-1.13, JPB-1.14, JPB-1.17c, JPB-2.01, JPB-2.02, JPB-2.04, JPB-2.05, JPB-2.06, JPB-2.09. ^b Même position que JPB-2.11 et 2.14. ^c Même position que JPB-2.08.

3.2.4. Séquençage des colonies

La comparaison des séquences d'ADNr 16S a permis le regroupement de certains génotypes identifiés à l'étape du criblage. Nous avons en effet considéré que les isolats dont les séquences présentaient plus de 99 % de similarité pouvaient être considérés comme faisant partie d'un même groupe. Nous avons ainsi obtenu 13 génotypes. La Figure 20 identifie certaines bandes du consortium en les associant à ces regroupements d'isolats. Un représentant de chaque groupe d'isolats a été utilisé pour construire un arbre phylogénique (Figure 21). Ces isolats se rapprochent d'espèces connues appartenant à différentes classes bactériennes (3 γ -*proteobacteria*, 3 β -*proteobacteria*, 4 α -*proteobacteria*, 1 *Flavobacteria* et 2 *Actinobacteria*).

Tableau 6. Génotypes isolés à partir de la biomasse du RBS-2 et affiliation la plus probable de chacun.

Génotype	Isolats correspondants	Affiliation la plus probable
JPB-1.01	JPB-1.02 ; JPB-1.05 ; JPB-1.06 ; JPB-1.08 ; JPB-1.11 ; JPB-1.13 ; JPB-1.14 ; JPB-1.17c ; JPB-2.01 ; JPB-2.02 ; JPB-2.04 ; JPB-2.05 ; JPB-2.06 ; JPB-2.09	<i>Pseudomonas sp.</i>
JPB-1.03	NA	<i>Chitinimonas sp.</i>
JPB-1.07	NA	<i>Acinetobacter sp.</i>
JPB-1.09	NA	<i>Brevundimonas sp.</i>
JPB-1.12	JPB-1.08	<i>Pseudomonas sp.</i>
JPB-1.15	NA	<i>Leucobacter sp.</i>
JPB-1.16	NA	<i>Chryseobacterium sp.</i>
JPB-1.17a	NA	<i>Janthinobacterium sp.</i>
JPB-1.17b	NA	<i>Rhodocyclus sp.</i>
JPB-1.18	NA	<i>Rhodobacter sp.</i>
JPB-2.03	NA	<i>Serratia sp.</i>
JPB-2.07	JPB-2.11 ; JPB-2.14	<i>Catellibacterium sp.</i>
JPB-2.10	NA	<i>Bosea sp.</i>

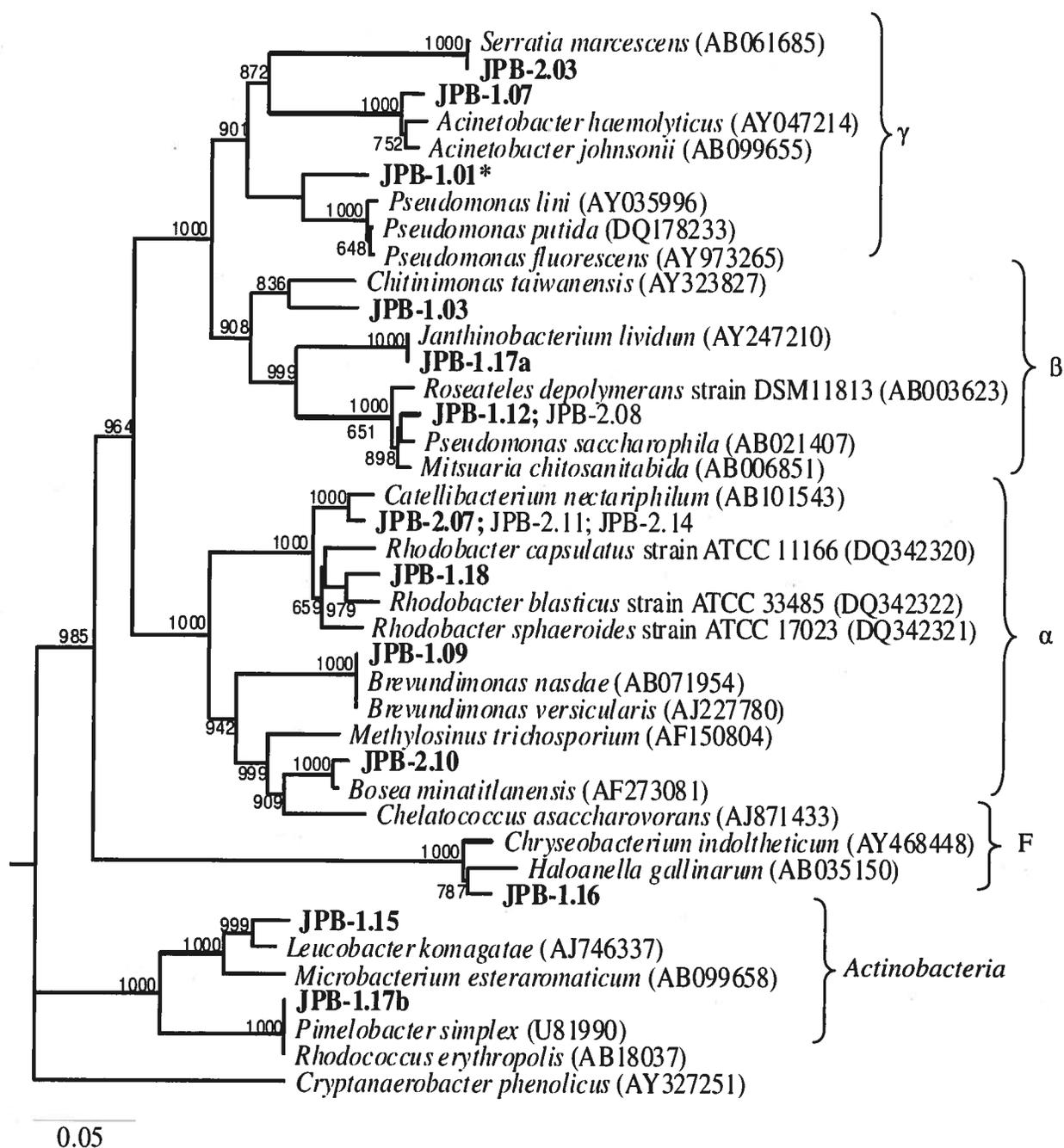


Figure 21. Relation phylogénique des isolats obtenus à partir de la biomasse du RBS-2 avec les espèces bactériennes les plus rapprochées. L'ADN ribosomal 16S a servi d'outil de comparaison. L'analyse statistique « bootstrap » a été effectuée à partir de 1000 réarrangements aléatoires des séquences. Seuls les embranchements dont les valeurs « bootstrap » sont supérieures à 500 ont été illustrés. γ pour γ -proteobacteria, β pour β -proteobacteria et α pour α -proteobacteria, F pour Flavobacteria. L'espèce *Pseudomonas saccharophila* a été reclassifiée *Pelomonas saccharophila*.

* JPB-1.02 ; JPB-1.05 ; JPB-1.06 ; JPB-1.08 ; JPB-1.11 ; JPB-1.13 ; JPB-1.14 ; JPB-1.17c ; JPB-2.01 ; JPB-2.02 ; JPB-2.04 ; JPB-2.05 ; JPB-2.06 ; JPB-2.09.

3.3. Hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

La présence et l'abondance des bactéries de la classe β -proteobacteria et de l'espèce « *Candidatus Accumulibacter phosphatis* » a été vérifiée par la technique d'hybridation fluorescente *in situ*. La Figure 22 révèle l'abondante présence de la bactérie « *Ca. Accumulibacter* » dans la biomasse du RBS-2. Les bactéries de la classe β -proteobacteria ont aussi été retrouvées en grande quantité selon cette même figure, mais étonnamment, les deux groupes ne se chevauchent pas alors que « *Ca. Accumulibacter* » est considéré être membre des β -proteobacteria.

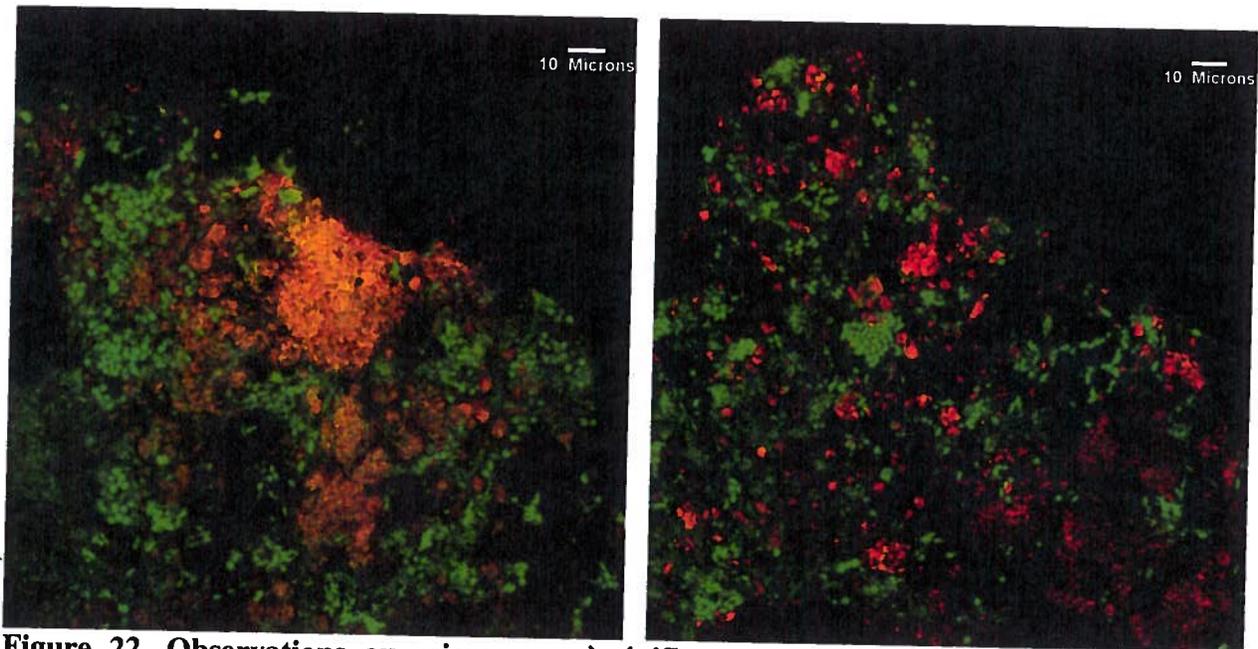


Figure 22. Observations au microscope à épifluorescence de l'hybridation des sondes PAO651 et Beta42a aux bactéries de la biomasse du RBS-2. La sonde PAO651, ciblant spécifiquement « *Ca. Accumulibacter* » et couplée au chromophore CY3, apparaît de couleur rouge alors que la sonde Beta42a, ciblant spécifiquement la classe bactérienne β -proteobacteria et couplé au chromophore FITC, apparaît de couleur verte. Un chevauchement des signaux apparaîtrait en couleur jaune. Magnitude 1000X sur microscope à épifluorescence Eclipse E800 (Nikon).

3.4. Élaboration et évaluation de paires d'amorces ciblant spécifiquement « *Ca. Accumulibacter* » et « *Ca. Competibacter* ».

Les amorces utilisées pour détecter « *Ca. Accumulibacter* » et « *Ca. Competibacter phosphatis* » par PCR ont été construites pour la première fois dans le cadre de la présente étude. Celles-ci ont été élaborées à partir de séquences de sondes répertoriées dans la banque « probeBbase » et normalement destinées à des analyses de type FISH. Il a été nécessaire d'établir les conditions d'utilisation de ces amorces afin d'obtenir un PCR de qualité. L'efficacité d'appariement de chaque paire d'amorces à leur ADN cible a donc été testée à plusieurs températures. Il a été déterminé par les Figures 23, à 27 que la température permettant à la fois une meilleure intensité et une meilleure spécificité d'amplification était de 55 °C pour les paires d'amorces PAO462F / PAO846R, PAO462F / Rc988R et PAO462F-GC / PAO651R, de 53 °C pour la paire d'amorces PAO651F-GC / PAO846R et de 57 °C pour la paire d'amorces GAOQ431F / GAOQ989R. La Figure 24 dévoile la présence d'une amplification non spécifique de la paire d'amorces PAO462F / RC988R puisqu'une bande pâle est visible au-dessus de celle correspondant à la taille attendue de l'amplicon. Puisque l'amplification non spécifique est moins importante pour les amorces PAO462F / PAO 846R (Figure 23) et que cette paire d'amorces cible les mêmes organismes que les amorces PAO462F / RC988R, c'est le couple PAO462F / PAO 846R qui a été choisi pour être utilisé ultérieurement pour la détection rapide de la présence de « *Ca. Accumulibacter* » dans les échantillons complexes et chez les isolats. Les paires d'amorces PAO462F-GC / PAO651R et PAO651F-GC / PAO846R ont été utilisées pour effectuer la génomique (section 3.8). Les amorces GAOQ431F / GAOQ989R n'ont pas été davantage utilisées lors du présent projet, toutefois leurs conditions d'utilisations ont ici été établies pour d'éventuels projets. Lors de l'évaluation de toutes les paires d'amorces, un contrôle de spécificité a été fait en essayant d'amplifier l'ADN provenant de la biomasse des bioréacteurs thermophiles, soupçonnée de ne pas contenir les organismes ciblés par ces amorces. Dans tous les cas, même si les résultats ne sont pas toujours présentés ici, aucune amplification n'a été obtenue.

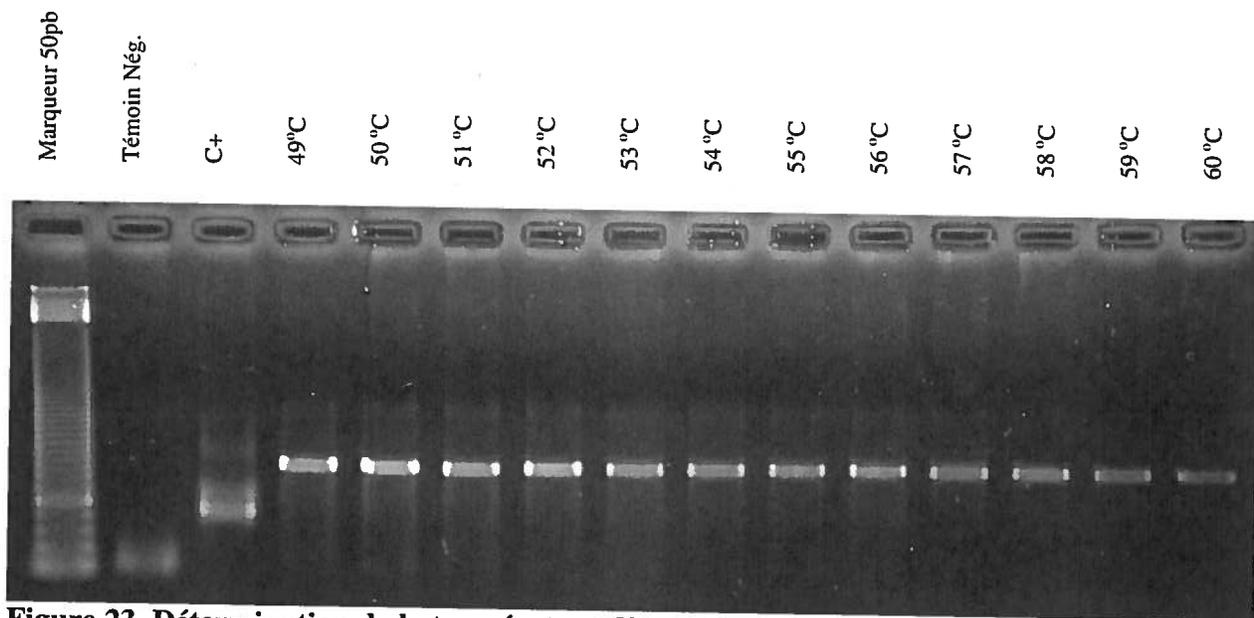


Figure 23. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces PAO462F / PAO 846R. L'amplification a été effectuée sur l'ADN de la biomasse totale du RBS-2 selon un gradient de température allant de 49 °C à 60 °C. Le contrôle positif (C+) a été une amplification de l'ADN du même consortium bactérien avec les amorces 341F (pince GC) / 534R à 55 °C. Le témoin négatif contenait de l'eau stérile en remplacement de l'ADN.

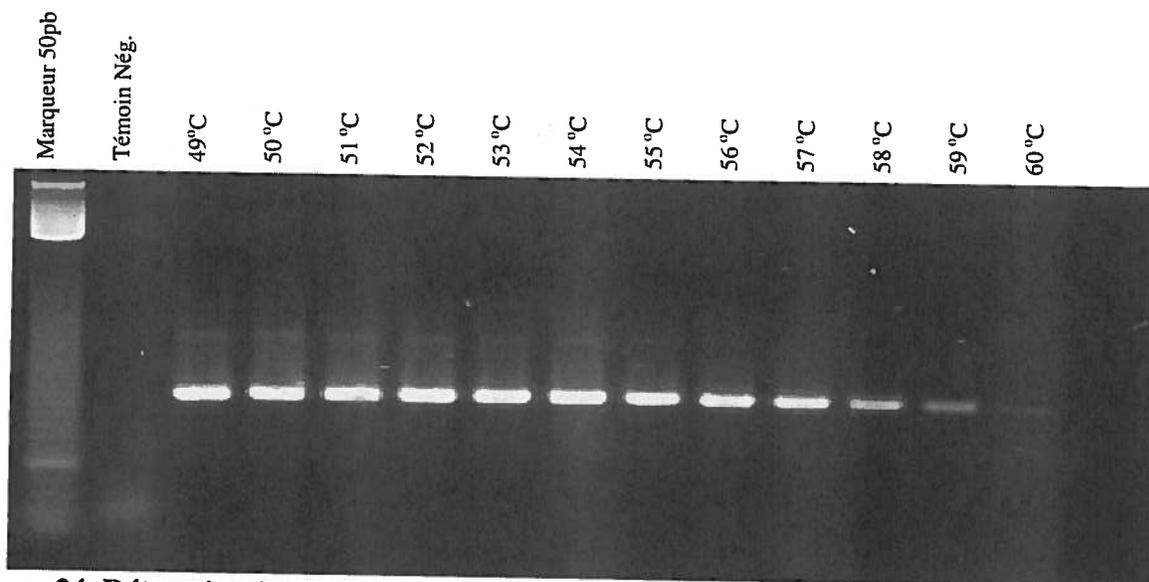


Figure 24. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces PAO462F / RC988R. L'amplification a été effectuée sur l'ADN de la biomasse totale du RBS-2 selon un gradient de température allant de 49 °C à 60 °C. Le témoin négatif contenait de l'eau stérile en remplacement de l'ADN.

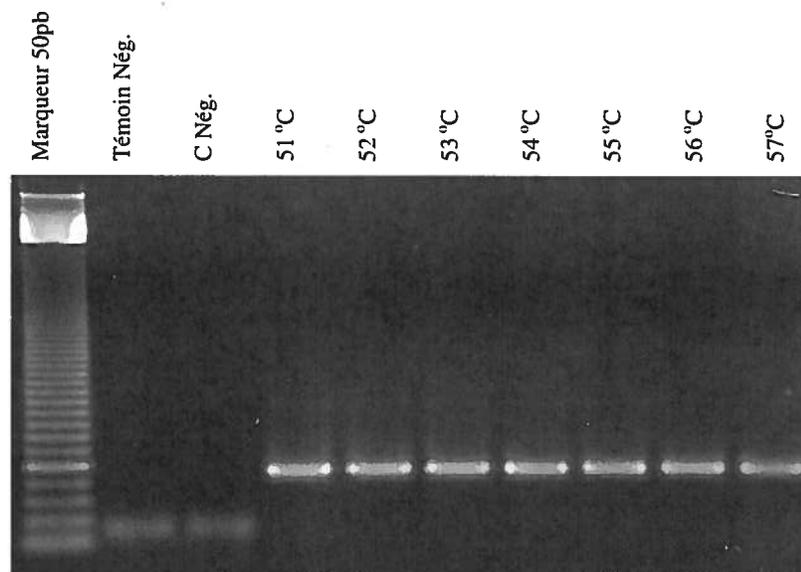


Figure 25. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces PAO462F (pince GC) / PAO651R. L'amplification a été effectuée sur l'ADN de la biomasse totale du RBS-2 selon un gradient de température allant de 51 °C à 56 °C. Le témoin négatif contenait de l'eau stérile en remplacement de l'ADN. Pour le contrôle négatif (C Nég.), l'ADN cible était celui du consortium bactérien d'un bioréacteur thermophile, non reconnu pour effectuer la déphosphatation, avec les mêmes amorces.

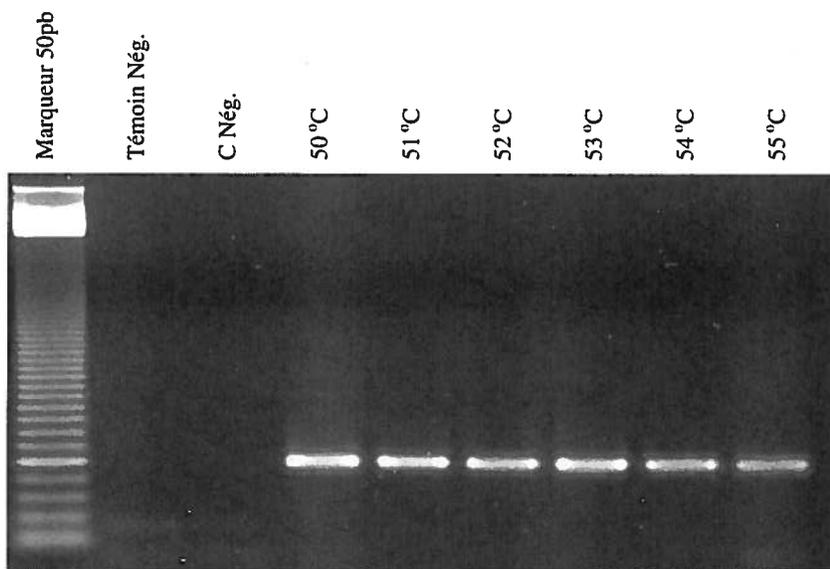


Figure 26. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces PAO651F (pince GC) / PAO846R. L'amplification a été effectuée sur l'ADN de la biomasse totale du RBS-2 selon un gradient de température allant de 50 °C à 55 °C. Le témoin négatif contenait de l'eau stérile en remplacement de l'ADN. Pour le contrôle négatif (C Nég.), l'ADN cible était celui du consortium bactérien d'un bioréacteur thermophile, non reconnu pour effectuer la déphosphatation, avec les mêmes amorces.

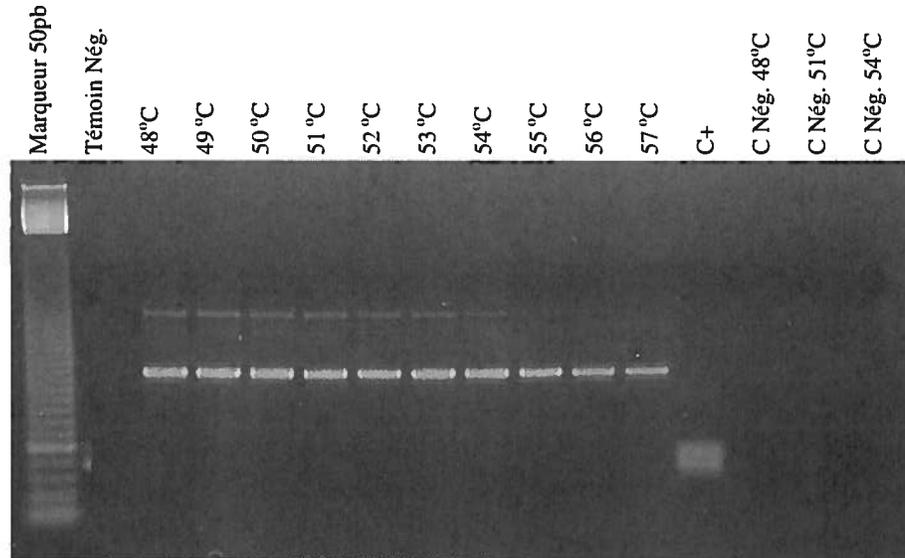


Figure 27. Détermination de la température d'appariement optimale des amorces GAOQ431F / GAOQ989R. L'amplification a été effectuée sur l'ADN de la biomasse totale du RBS-2 selon un gradient de température allant de 48 °C à 57 °C. Le témoin négatif contenait de l'eau stérile en remplacement de l'ADN. Pour les contrôles négatifs (C Nég.), l'ADN cible était celui du consortium bactérien d'un bioréacteur thermophile, non reconnu pour effectuer la déphosphatation, avec les mêmes amorces. Le contrôle positif (C+) a été une amplification de l'ADN du consortium bactérien RBS-2 avec les amorces 341F (pince GC) / 534R à 55 °C.

3.5. Enrichissement et tentative d'isolement de bactéries déphosphatantes

Puisque l'isolement de colonies à partir de la biomasse totale du RBS-2 n'a pas permis d'obtenir « *Ca. Accumulibacter* », il a été nécessaire d'effectuer un enrichissement de cette espèce préalablement à une nouvelle tentative d'isolement.

La biomasse fraîchement prélevée à la fin de la dernière période aérobie du RBS-2 et bien dispersée a donc été séparée par différence de densité sur un gradient de Percoll. La biomasse encore présente sous forme d'amas s'est rassemblée au sommet du gradient de densité, alors que les bactéries bien séparées du reste des floccs se sont regroupées en plusieurs bandes tout le long du gradient, en fonction de leur densité (Figure 28). Les bandes ont été récoltées en 14 fractions afin de déterminer dans quelles portions du gradient se trouve la majorité des « *Ca. Accumulibacter* ». Pour les 2^e et 3^e essais de séparation sur gradient de Percoll, les bandes ont été récoltées en 16 fractions.

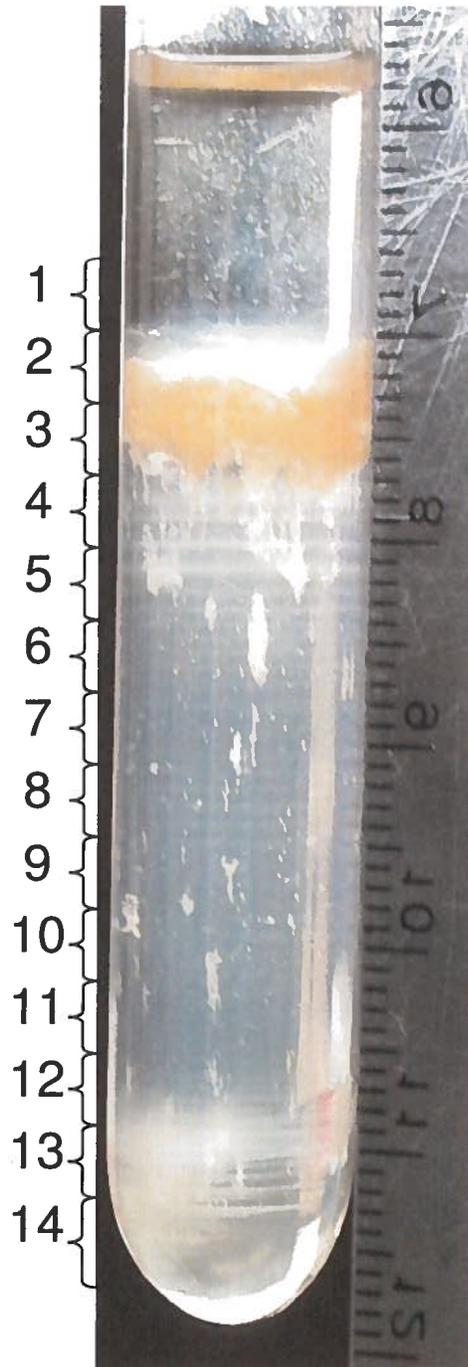


Figure 28. Photo illustrant la séparation en bandes du consortium bactérien après une centrifugation de 75 minutes à 10 000 rpm à 20 °C sur un gradient de Percoll. Les chiffres à gauche correspondent approximativement aux fractions prélevées.

3.5.1. Détermination des fractions riches en PAO

L'identification des PAO dans les fractions de Percoll a d'abord été accomplie par une coloration spécifique des granules de Poly-P (coloration Neisser, section 2.6.1). Sachant que la biomasse a été fraîchement prélevée à la fin de la période aérobie, juste avant de procéder à la centrifugation sur gradient de Percoll, il était attendu que les PAO présentes dans le consortium allaient contenir de larges granules de poly-P. Suite à l'observation au microscope de la coloration Neisser, la Figure 29 révèle la présence en grande proportion des PAO dans la fraction 13 principalement, ainsi qu'à moindre échelle dans les fractions 12 et 14. Une coloration Gram effectuée sur les fractions d'intérêt a permis d'identifier l'appartenance de ces bactéries au type Gram négatif (Figure 29).

La présence de « *Ca. Accumulibacter* » dans chacune des fractions a été révélée par PCR avec les amorces PAO462F / PAO846R. Ce résultat met en évidence l'aptitude de l'ADN de toutes les fractions à être amplifié, donc à contenir des PAO. Par contre, l'amplification est retrouvée à une intensité supérieure aux fractions 1, 2, 3, 4, 12, 13 et 14 (Figure 30). Sachant que les fractions 1 à 4 sont davantage composées d'un consortium bactérien mal séparé plutôt que de bactéries bien isolées (Figure 28), notre intérêt s'est plutôt porté sur les fractions 12, 13 et 14. Ceci va donc de pair avec les conclusions obtenues suite à la coloration Neisser effectuée sur les 14 fractions, proposant la présence d'un enrichissement de PAO aux fractions 12, 13 et 14.

Un PCR avec les amorces universelles de l'ADNr 16S (pA / pH) a été accompli sur chacune des fractions dans le but de vérifier si l'ADN extrait de ces fractions était bien amplifiable et de valider que les différences d'intensité dans l'amplification des fractions avec les amorces PAO sont bien causées par l'abondance de PAO et non simplement par l'abondance de bactéries. La figure 31 démontre une amplification d'intensité similaire pour toutes les fractions, à l'exception des fractions 2 et 3 qui se démarquent par une intensité supérieure aux autres et des fractions 9 et 10 qui sont d'intensité moindre.

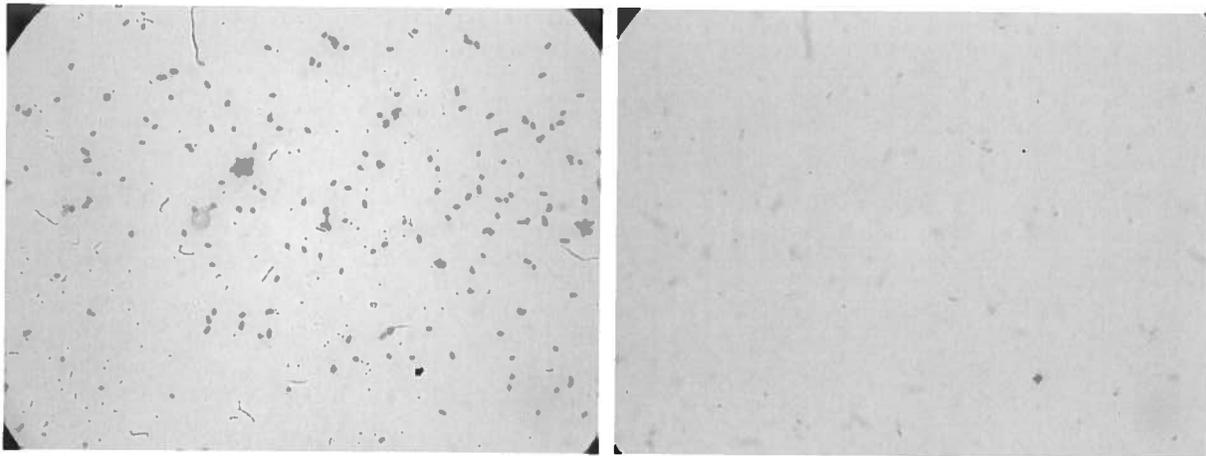


Figure 29. Colorations de Neisser (gauche) et de Gram (droite) réalisées sur les bactéries récoltées dans la fraction 13 du gradient de Percoll. Magnitude 1000X sur microscope confocal Eclipse E800 (Nikon).

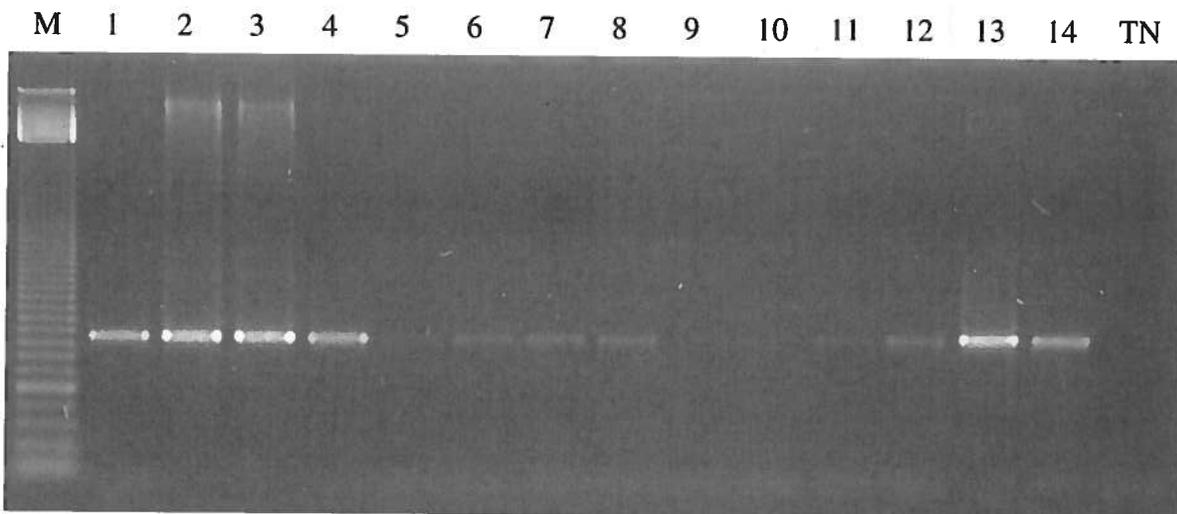


Figure 30. PCR avec les amorces PAO462F et PAO846R accompli sur les 14 fractions issues de la séparation sur gradient de Percoll. Marqueur utilisé : 50 pb. Le témoin négatif constitue la réaction PCR avec l'ajout d'eau stérile en remplacement de l'ADN.

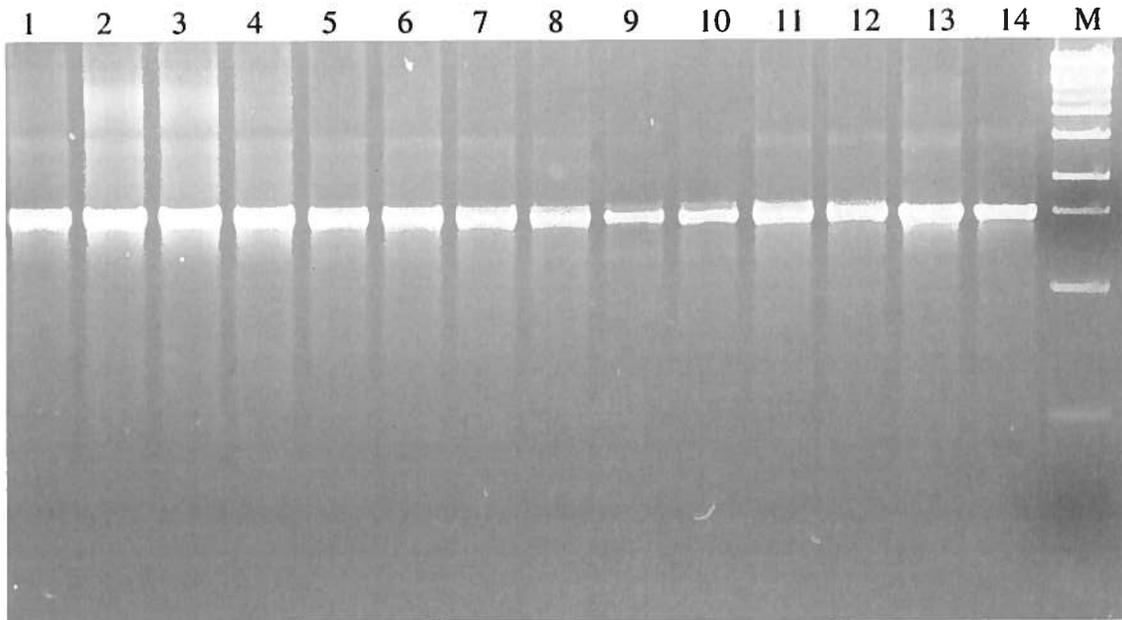


Figure 31. PCR avec les amorces pA et pH accompli sur les 14 fractions issues de la séparation sur gradient de Percoll. Marqueur utilisé : λ / *StyI*.

3.5.2. Isolement des colonies

Le Tableau 6 décrit la morphologie des colonies observées sur les géloses RBS-2 (2) à partir des fractions de Percoll 12, 13 et 14, incubées à température pièce en condition aérobie. Douze isolats à l'apparence distincte ont poussé sur ces géloses. Une vérification rapide de la présence de « *Ca. Accumulibacter* » a été effectuée par PCR sur l'ADN de ces isolats avant de procéder au séquençage de ceux-ci. Aucun des isolats n'a été amplifié par les amorces spécifiques aux PAO.

Un deuxième essai, semblable à celui-ci, a été mené en incubant toutefois les fractions de Percoll sur des géloses en condition microaérobie. Aucun nouveau type morphologique n'a été observé comparativement à ceux obtenus lors de l'essai précédant, donc aucun de ces isolats n'a été repiqué pour être étudié davantage.

Un troisième et dernier essai d'isolement après séparation sur Percoll a été réalisé en condition anoxique avec le nitrite comme accepteur potentiel d'électron. Le milieu utilisé était également enrichi en cobalt. De plus, une tentative d'isolement de « *Ca. Accumulibacter* » sur ce milieu en condition aérobie a été faite en parallèle. Après centrifugation, le lit de Percoll a été divisé en 16 fractions et ce sont les trois dernières qui ont été utilisées pour cet essai. Le Tableau 7 donne la description morphologique des colonies isolées sur géloses en condition d'anoxie et d'aérobie. Un PCR préliminaire a été mené sur les isolats JPB-5.01 à JPB-5.08 (les isolats JPB-5.09 à JPB-5.11 n'ayant pas encore été sélectionnés à ce moment) afin de vérifier leur appartenance au groupe des PAO. Aucun isolat n'a été amplifié avec les amorces PAO. Les bactéries composant les fractions 14, 15 et 16 à différentes dilutions ont aussi été ensemencées en milieu liquide RBS-2 (2) supplémenté afin de vérifier si « *Ca. Accumulibacter* » avait la capacité de croître sous cette condition. Après 5 jours d'incubation dans ce milieu liquide, l'ADN des bactéries ayant poussé a été extrait. Un PCR a aussi été effectués avec les amorces PAO. Les résultats ont démontré que « *Ca. Accumulibacter* » n'avait poussé nulle part.

Tableau 7. Description des colonies isolées sur géloses RBS-2 (2) à partir des dilutions des fractions de Percoll 12, 13 et 14, incubées à température pièce en conditions aérobies.

Colonie	Isolée à partir de		Description
	Fraction Percoll	Dilution	
JPB-3.01	13	10 ⁻⁴	Transparente, Ø < 1 mm, forme de flocon de neige.
JPB-3.02	13	10 ⁻³	Beige presque transparente, Ø 2 mm, lisse, ronde.
JPB-3.03	13	10 ⁻³	Beige presque transparente, ressemble à 3.02 mais moins ronde.
JPB-3.04	13	10 ⁻³	Transparente, Ø 2 mm, étalée.
JPB-3.05	14	10 ⁻³	Ressemble à 3.04.
JPB-3.06	14	10 ⁻³	Beige, Ø 1.5 mm, centre épais, contour étalé (comme œuf miroir).
JPB-3.07	14	10 ⁻²	Beige, rond inégal (un peu étalé), ressemble à 3.03.
JPB-3.08	14	10 ⁻²	Beige-transparente, ressemble à 3.02.
JPB-3.09	14	10 ⁻²	Ressemble à 3.05.
JPB-3.10	12	10 ⁻²	Ressemble à 3.04.
JPB-3.11	12	10 ⁻²	Transparente, ronde, Ø < 0.5 mm.
JPB-3.12	13	10 ⁻⁴	Jaune-orangé, Ø 1 mm, ronde.

Ø = diamètre

Tableau 8. Description des colonies isolées sur géloses RBS-2 (2) supplémentées à partir des dilutions des fractions de Percoll 14, 15 et 16, incubées à température pièce en conditions aérobie et anoxie.

Colonie	Isolée à partir de		Description
	Fraction Percoll	Dilution	
JPB-5.01	16	10 ⁻⁶ A	Beige, Ø 2 mm, ronde, lisse.
JPB-5.02	16	10 ⁻⁴ A	Beige, Ø 2 mm, ronde, non-lisse.
JPB-5.03	16	10 ⁻³ A	Beige, Ø 2 mm, ronde, non-lisse.
JPB-5.04	15	10 ⁻² A	Beige opaque, Ø 2 mm, ronde, lisse.
JPB-5.05	14	10 ⁻¹ A	Beige opaque, Ø 1 mm, ronde avec étalement transparent.
JPB-5.06	15	10 ⁻⁴ N	Beige, Ø 1 mm, ronde, lisse.
JPB-5.07	16	10 ⁻¹ N	Transparente, Ø < 0.5 mm.
JPB-5.08	14	10 ⁻³ N	Blanches, Ø 1 mm,
JPB-5.09	16	10 ⁻³ A	Beige, Ø 1 mm, ronde avec étalement transparent.
JPB-5.10	15	10 ⁻² A	Rose, Ø 1 mm, ronde.
JPB-5.11a	16	10 ⁻³ A	Beige, Ø 1 mm, ronde
JPB-5.11b	16	10 ⁻³ A	Beige, Ø 2 mm, diffuse

Ø = diamètre

A : gélose en condition d'aérobie

N : gélose en condition d'anoxie

3.5.3. Séquençage et étude phylogénique

La présente étude phylogénique regroupe les isolats obtenus lors des premier et troisième essais d'isolement de « *Ca. Accumulibacter* » sur gradient de Percoll. Afin de simplifier l'analyse, les séquences d'ADNr 16S montrant plus de 99 % de similitude ont été regroupées. Ainsi, 10 groupes génotypiques ont été formés. Un représentant de chacun a été utilisé pour construire un arbre phylogénique contenant aussi les séquences d'intérêt les plus proches, tel que déterminé à l'aide des bases de données informatiques (Figure 32). Ces isolats se rapprochent d'espèces connues appartenant à différentes classes bactériennes (1 Bacillales, 4 β -*proteobacteria*, 2 γ -*proteobacteria* et 3 α -*proteobacteria*).

Tableau 9. Génotypes isolés à partir des fractions basales des gradients de Percoll et affiliation la plus probable de chacun.

Génotype	Isolats correspondants	Affiliation la plus probable
JPB-3.01	JPB-3.04 ; JPB-3.05 ; JPB-3.09	<i>Simplicispira sp.</i>
JPB-3.02	JPB-3.03 ; JPB-3.07 ; JPB-3.08	<i>Thauera sp.</i>
JPB-3.06b	JPB-3.06a	<i>Bacillus sp.</i>
JPB-3.10	NA	<i>Hydrogenophaga sp.</i>
JPB-3.11	JPB-5.01 ; JPB-5.04 ; JPB-5.05 ; JPB-5.08 ; JPB-5.09 ; JPB-5.11b	<i>Pseudomonas sp.</i>
JPB-3.12	NA	<i>Sphingomonas sp.</i>
JPB-5.02	NA	<i>Acidovorax sp.</i>
JPB-5.03	NA	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
JPB-5.10	JPB-5.06	<i>Methylobacterium sp.</i>
JPB-5.11a	NA	<i>Bosea sp.</i>

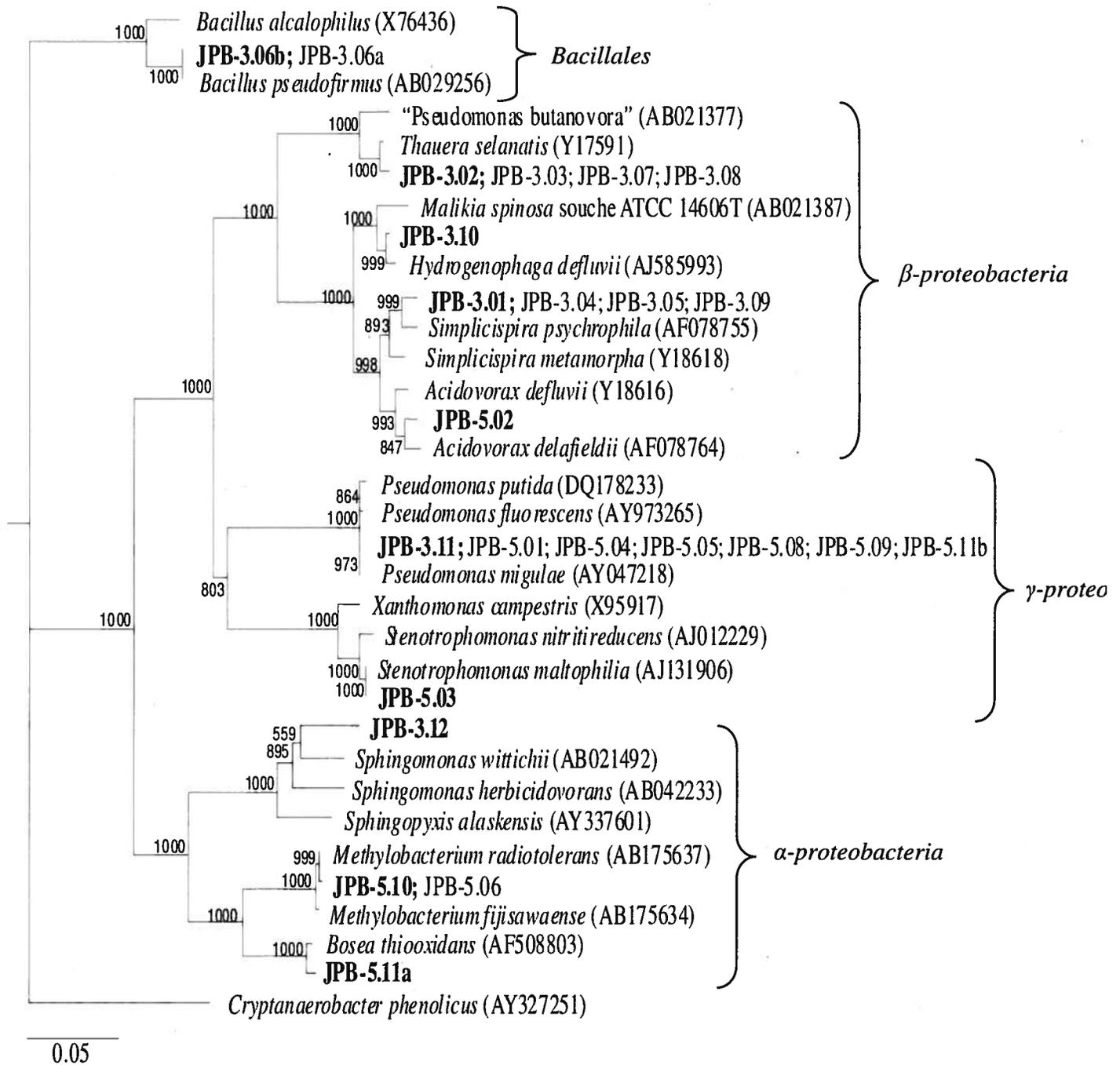


Figure 32. Relation phylogénique des isolats obtenus à partir de l'ensemencement des fractions basales des gradients de Percoll avec les espèces bactériennes les plus rapprochées. L'ADN ribosomal 16S a servi d'outil de comparaison. L'analyse statistique « bootstrap » a été effectuée à partir de 1000 réarrangements aléatoires des séquences. Seuls les embranchements dont les valeurs « bootstrap » sont supérieures à 500 ont été illustrés.

3.6. Génothèque

Une génothèque d'une partie des gènes 16S ribosomiaux a été élaborée à partir d'un pool de deux extraits d'ADN de la biomasse du RBS-2 en septembre 2006 et en janvier 2007, avec la paire d'amorces PAO462F / PAO651R. Ces amorces ont été sélectionnées préférentiellement aux paires d'amorces PAO462F / PAO846R et PAO651F / PAO846R car elles présentaient un profil de séparation des bandes sur DGGE (avec une pince riche en GC incorporée à l'amorce de gauche) mieux dispersé et plus équilibré en terme d'intensité (Figure 33). La dispersion suggère de bonnes différences de séquences alors que l'intensité similaire des bandes indique des abondances relatives équivalentes, ce qui est de nature à faciliter le travail de criblage de la banque de clones. Le profil de migration sur DGGE de l'amplification du pool d'ADN du RBS-2 avec les amorces PAO462F / PAO651R a aussi servi d'échantillon de référence lors de ce criblage. Suite à la ligation des amplicons dans le vecteur pGEM®-T Easy et à leur transformation, 46 colonies blanches ont été obtenues et mises en culture. L'extraction d'ADN plasmidique n'a pas permis de vérifier si les colonies blanches possédaient bien les inserts (par comparaison de poids moléculaire avec la colonie bleue) puisque ceux-ci ont une longueur très peu significative (206 pb) sur l'ensemble du plasmide (3206 pb). Il a donc été nécessaire d'effectuer un PCR avec les amorces PAO462F-GC / PAO651R et de vérifier la présence de l'insert dans les plasmides par leur aptitude à être amplifiés avec ces amorces. Sur les 46 clones, uniquement le clone 19 ne possédait pas l'insert.

Un criblage sur DGGE à gradient dénaturant de 0 % à 8 0% a donc été effectué sur les 45 clones dans lesquels la présence de l'insert a été prouvée. De ce criblage, 9 groupes de clones potentiellement différents ont été identifiés, dont 4 correspondent à des bandes générées par l'amplification de l'échantillon qui a servi de matériel de base pour la construction de la banque de clone (Figure 34). Cet échantillon a aussi produit 5 autres bandes qui n'ont pas de correspondance avec aucun des 45 clones. Un représentant de chacun des 9 groupes a été amplifié par PCR avec les amorces Sp6 et T7 et envoyé au séquençage. Les clones 29 et 35 ont été regroupés car leurs séquences étaient identiques, de même que les clones 34 et 38, pour la même raison, ce qui réduit le nombre de groupes à 7. La Figure 35 rassemble, dans un arbre phylogénique, un représentant de ceux-ci, les séquences d'espèces bactériennes rapprochées, de même que celles des clones dont Crocetti et al. (2000) se sont servis pour concevoir les sondes

visant « *Ca. Accumulibacter* » et à partir desquelles les amorces utilisées ici ont été construites. Tous les clones appartiennent à la classe des β -*proteobacteria*.

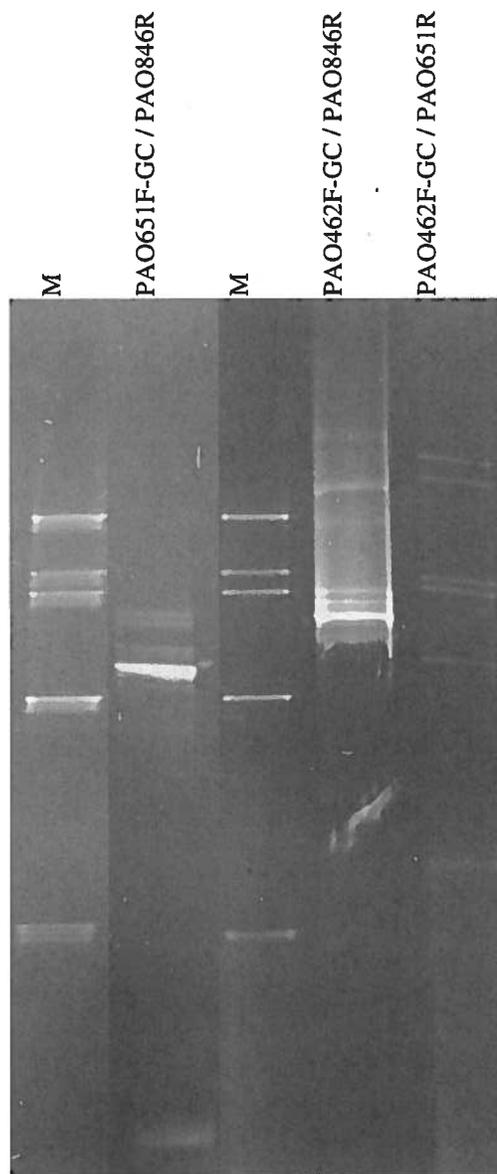


Figure 33. Comparaison des profils de bandes obtenus par DGGE avec trois paires d'amorces différentes visant « *Ca. Accumulibacter* ». Ces analyses ont été faites sur deux gels différents, c'est pourquoi ces photos ont été regroupées en alignant bien le marqueur de chaque gel. L'ADN utilisé pour les trois amplifications est le consortium bactérien du RBS-2. Le marqueur (M) utilisé a été élaboré par Tremblay (2003) et les bandes correspondent aux espèces (de haut en bas) : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Streptomyces coelicolor*.

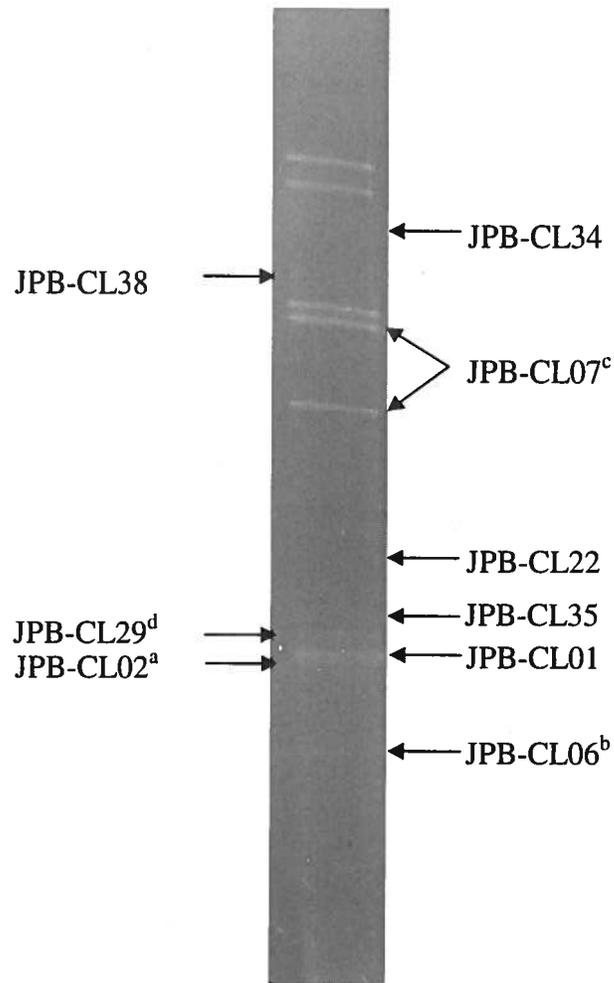


Figure 34. Identification des bandes de l'échantillon de référence sur DGGE. L'ADN du consortium total du RBS-2 amplifié avec les amorces PAO462F-GC / PAO651R sert d'échantillon de référence. Certaines bandes sont très pâles ou non visibles. Elles ont tout-de-même été identifiées à des clones qui avaient ces positions. a : Même position que les clones 03, 08, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 23, 24, 28, 30, 31, 37, 40, 42, 44, 45 et 46. b : Même position que les clones 04, 06, 09, 10, 20, 25, 32, 33, 39, 41 et 43. c : Même position que les clones 0,5 et 0,7. d : Même position que les clones 26 et 29.

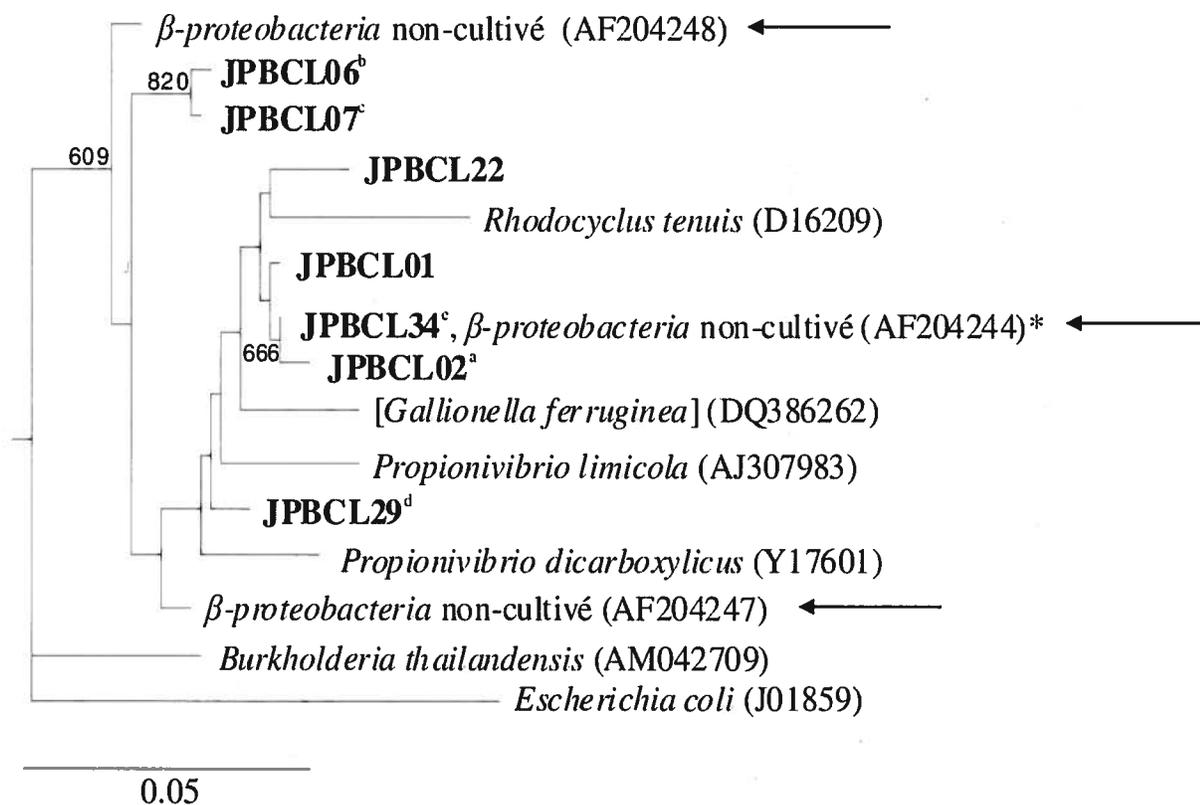


Figure 35. Relation phylogénique des clones avec les espèces bactériennes les plus rapprochées. Les clones ont été obtenus à partir de l'amplification d'une partie des ADNr 16S de la biomasse totale du RBS-2 avec les amorces PAO462F / PAO651R visant « *Ca. Accumulibacter* ». Les séquences des clones utilisées par Crocetti et al. (2000) pour construire des sondes ciblant ce même groupe de bactéries et qui ont servi de base pour la conception des amorces utilisées ici ont été ajoutées et sont identifiées par une flèche. Un fragment de 190 nucléotides de l'ADN ribosomal 16S a servi d'outil de comparaison, soit la taille du fragment obtenu avec les amorces PAO462F / PAO651R, sans les séquences des amorces. L'analyse statistique « bootstrap » a été effectuée à partir de 1000 réarrangements aléatoires des séquences. Seuls les embranchements dont les valeurs « bootstrap » sont supérieures à 500 ont été illustrés.

La séquence entre crochets n'a pas été publiée.

* Les 190 nucléotides de ce clone sont identiques à ceux de deux autres clones utilisés par Crocetti et al. (2000) pour construire les sondes : *β-proteobacteria* non-cultivé (AF204245) et *Rhodocyclus* sp. (AJ224937).

a : Similaire aux clones JPBCL03, JPBCL08, JPBCL11, JPBCL12, JPBCL13, JPBCL14, JPBCL15, JPBCL16, JPBCL17, JPBCL18, JPBCL21, JPBCL23, JPBCL24, JPBCL28, JPBCL30, JPBCL31, JPBCL37, JPBCL40, JPBCL42, JPBCL44, JPBCL45 et JPBCL46.

b : Similaire aux clones JPBCL04, JPBCL06, JPBCL09, JPBCL10, JPBCL20, JPBCL25, JPBCL32, JPBCL33, JPBCL39, JPBCL41 et JPBCL43. c : Similaire aux clones JPBCL05 et JPBCL07. d : Similaire aux clones JPBCL26 et JPBCL35. e : Similaire aux clones JPBCL36 et JPBCL38.

Chapitre 4. Discussion

4.1. Évaluation des performances des bioréacteurs de type RBS

Les deux RBS utilisés lors de ce travail ont d'abord permis de tester différentes séquences d'opération pour le conditionnement d'une biomasse et l'efficacité de cette dernière à enlever les composés indésirables présents dans l'effluent du traitement AT-RBS. Les résultats positifs de ces essais ont suggéré que la biomasse était constituée des acteurs bactériens d'intérêt dans la nitrification, la dénitrification et la déphosphatation biologique.

4.1.1. RBS-1

Ce traitement a été mis de l'avant de façon très sommaire ; néanmoins, la communauté bactérienne s'y étant installée a démontré sa capacité à effectuer la nitrification et la dénitrification. Des essais d'optimisation pourraient éventuellement avoir lieu afin de mieux exploiter le potentiel de cette biomasse. Ceci pourrait avoir lieu en établissant des conditions où l'alternance entre l'aérobie et l'anoxie seraient plus fréquentes et plus nombreuses dans un même cycle, soit avant la vidange de l'effluent. L'ajout d'affluent se ferait graduellement avant chaque période d'anoxie afin que les bactéries dénitrifiantes aient accès à une source de carbone présente dans l'affluent (Filali-Meknassi *et al.*, 2005) et que les bactéries nitrifiantes puissent ensuite effectuer la nitrification en absence ou quasi-absence de carbone (Figure 36).

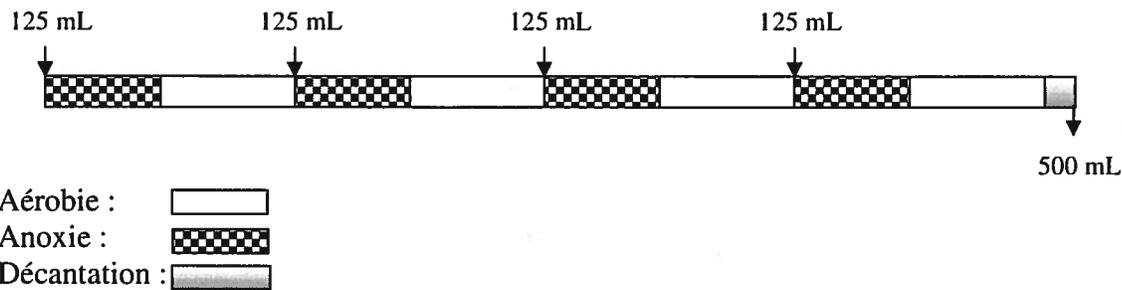


Figure 36. Scénario d’opération proposé pour RBS-1. Afin d’améliorer le rendement de la nitrification et la dénitrification au cours d’un cycle, plusieurs périodes d’aérobic et d’anoxie seraient établies en alternance afin de retrouver un minimum de pollution azotée dans l’effluent. Les quatre moments d’alternance ne sont présentés ici qu’à titre d’exemple car ils pourraient bien être plus nombreux. De plus, l’échelle de temps a volontairement été omise car des essais devraient d’abord être menés afin de déterminer le temps nécessaire à l’accomplissement de la nitrification et de la dénitrification dans ces conditions.

Une autre stratégie d’opération de ce type de bioréacteur serait d’effectuer la nitrification et la dénitrification en simultanée en aérant constamment le contenu du bioréacteur pour maintenir une concentration d’OD de 0.5 mg O₂/L. En maintenant bien cette concentration en OD, il serait peut-être même possible d’effectuer la SND à partir du nitrite et d’économiser 40 % des besoins en carbone par rapport à la SND via le nitrate (Munch *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 2003a; Gibbs *et al.*, 2004; Mota *et al.*, 2005a)

L’élimination du phosphore encore présent dans l’effluent de ce traitement pourrait ensuite s’effectuer sur un lit de scories d’aciérie. Cet effluent exempt de polluants azotés serait, de plus, très pauvre en carbone car ce dernier élément aura été consommé par les bactéries lors de la dénitrification. Ceci constituerait un avantage, sachant que le carbone peut nuire aux systèmes d’adsorption du phosphore en favorisant la prolifération de biomasse dans la chambre d’adsorption, réduisant ainsi la superficie d’adsorption du phosphore et le débit de passage de l’effluent (Johansson et Gustafsson, 2000).

4.1.2. RBS-2

Dès les premières semaines d’opération de ce bioréacteur et jusqu’à la fin, la biomasse avait la capacité de sédimenter rapidement. Tel que rapporté par Jenkins *et al.*, (1993), cette propriété est considérée comme un indicateur de la taille et de la densité des floes ainsi que par une bonne

proportion de bactéries filamenteuse / bactéries non-filamenteuse pour un systèmes à boues activées. La sédimentation rapide des floccs suggère de plus que ces derniers contiennent une bonne quantité de bactéries accumulatrices de produits de stockage tels les PHA et les polyphosphates car ces derniers augmentent la densité des bactéries, donc leur aptitude à sédimenter rapidement (Schuler et Jang, 2007). Les colorations effectuées sur la biomasse (présentés à la section 3.2.1) ont démontré effectivement la présence de quelques bactéries filamenteuses ainsi qu'environ 30% de bactéries positives aux colorations Neisser et PHA.

Les résultats des analyses physico-chimiques et des observations microscopiques ont démontré que des bactéries nitrifiantes, dénitrifiantes et déphosphatantes s'étaient implantées avec succès dans les floccs de ce bioréacteur expliquant le fait que la nitrification, la dénitrification et la déphosphatation par voie biologique a bien eu lieu. Les conditions d'opération ont été modifiées à deux reprises lors du fonctionnement du RBS-2 afin de maximiser l'enlèvement de l'azote, du phosphore et de la DCO. Une élimination complète et constante de tous ces polluants n'a toutefois pas été rendue possible avec aucune des trois conditions testées.

Encore ici, l'ajout d'une source exogène de carbone immédiatement avant la période d'anoxie (soit par l'ajout d'une source de carbone synthétique ou par l'ajout de nouvel effluent thermophile) aurait pu favoriser une meilleure dénitrification et donc minimiser la présence de nitrate dans l'effluent.

Parmi les polluants ciblés dans cette étude, le phosphore a été le nutriment présentant le taux d'enlèvement le plus bas. Ce résultat suggère que des organismes compétiteurs aux PAO pour l'assimilation de l'acétate en conditions d'anaérobie étaient présents dans le RBS-2. Ce type de problème a souvent été rencontré dans des systèmes déphosphatants de format laboratoire (Crocetti *et al.*, 2002; Levantesi *et al.*, 2002; Dabert *et al.*, 2005) ainsi que dans des procédés à pleine échelle (Crocetti *et al.*, 2002; Burow *et al.*, 2007). Afin de prévenir l'implantation de ces organismes indésirables qui compétitionneraient avec les PAO, plusieurs études ont été menées pour identifier les conditions favorisant la prédominance des bactéries de type PAO par rapport aux bactéries de type GAO. Ainsi, le choix de la source de carbone dans l'affluent a été identifié comme un paramètre pouvant avoir un impact important sur la dominance d'un groupe bactérien par rapport à l'autre (Pijuan *et al.*, 2004; Oehmen *et al.*, 2005b; Oehmen *et al.*, 2006). Effectivement, comme l'ont démontré Pijuan *et al.*, (2004) et Lu *et al.*, (2006) et tel que

mentionné à la section 1.5., l'alternance entre l'acétate et le propionate favoriserait la compétitivité des PAO sur les GAO, puisque les PAO ont la capacité de passer instantanément de l'acétate au propionate, ce que les GAO sont incapables de faire. Il serait fortement suggéré d'employer cette stratégie dans de futurs essais d'optimisation d'un biotraitement déphosphatant. Cette alternance entre les deux sources de carbone aurait l'avantage de favoriser un meilleur enrichissement de « *Ca. Accumulibacter* », ce qui pourrait faciliter les essais d'isolement de cette dernière. Ceci impliquerait toutefois l'utilisation d'un affluent synthétique puisque l'affluent utilisé lors des présents essais contenait déjà du carbone sous forme d'acétate. L'alternance entre les deux sources de carbone est donc une méthode ne pouvant pas s'appliquer sur l'effluent thermophile, ni être utilisée pour le traitement du lisier à grande échelle.

4.2. Caractérisation et de isolement de la microflore du RBS-2

Une caractérisation de la microflore du RBS-2 a été mise de l'avant afin de mieux connaître la composition de cette dernière et possiblement isoler des bactéries de type PAO.

4.2.1. Types morphologiques observés suite aux colorations Neisser et PHA

Il aurait été intéressant d'observer certains types cellulaires négatifs à la coloration Neisser après la période anaérobie, puis positifs après la période aérobie, et d'observer ces mêmes types cellulaires positifs à la coloration PHA après la période anaérobie et négatifs après la période aérobie. Toutefois, cette caractéristique propre aux PAO n'a pas été retrouvée. Les résultats des figures 14 à 17 n'ont toutefois pas exclu la possibilité de la présence de PAO dans la biomasse composant le RBS-2. Effectivement, il se peut que les granules de PHA ne soient pas complètement consommés par la bactérie à la fin de la période aérobie, comme il se peut que les granules de poly-P ne soient pas complètement consommés à la fin de la période aérobie.

La bactérie *Microlunatus phosphovorius*, tel que mentionné à la section 1.4, est un bacille à Gram positif accumulant de grandes quantités de polyphosphate en condition aérobie (Nakamura *et al.*, 1995a). La description morphologique de cette dernière rappelle celle des petites coques en doublets retrouvées dans le RBS-2 (Figure 14), étant positives aux coloration PHA et Neisser après la période anaérobie et positives à la coloration Neisser après la période aérobie (type

morphologique 4). Aucune analyse n'a cependant été mise de l'avant afin d'identifier plus amplement ce type morphologique.

Similairement, les types morphologiques 2 et 7 (Figures 14, 15 et 17) n'ont pas été étudiés davantage dans la biomasse du RBS-2, mais leurs caractéristiques laissent supposer qu'ils ne représentent qu'une seule bactérie et que cette dernière pourrait être associée à *Tetracoccus cechii*, une coque à Gram négatif organisée en tétrades appartenant à la classe des α -*proteobacteria*. *T. cechii* a déjà été isolée en Italie et en République Tchèque dans des boues activées et a été caractérisée comme étant une bactérie G (Blackall *et al.*, 1997). Il a déjà été reporté dans la littérature que la bactérie *T. cechii* répond positivement à la coloration Neisser à sa surface plutôt que de contenir des inclusions intracellulaires positives normalement retrouvées lorsqu'il s'agit de polyphosphate (Cech et Hartman, 1990; Jenkins *et al.*, 1993; Blackall *et al.*, 1997), ce qui correspond au type morphologique 2. Cette dernière a de plus la capacité d'emmagasiner des PHA en quantités si excessives que les cellules en sont quelque peu déformées (Blackall *et al.*, 1997). La Figure 17 révèle clairement la présence de coques en tétrades (type morphologique 7) possédant une petite quantité de granules de PHA suite à la période aérobie. Par contre, la Figure 16 propose, sans grande certitude (type morphologique 7 suivi d'un point d'interrogation), que des coques en tétrades contenant de larges quantités de granules de PHA sont retrouvées suite à la période anaérobie. La forme des cellules sur cette figure n'est pas très claire, mais ceci peut être dû à la déformation causée par la quantité excessive de PHA. Selon la littérature, *T. cechii* a la capacité de réduire le nitrate en nitrite, mais pas le nitrite en N_2 (Blackall *et al.*, 1997).

Blackall *et al.*, (1997) et Wong *et al.*, (2005) ont révélé que la majorité des cellules positives à la coloration Neisser sont souvent des coccobacilles rassemblés en amas denses de différentes tailles. Les types morphologiques 1 et 5 observés sur les photos de la section 3.2.1 présentent plutôt des coques associés à cette description. Par contre, ces bactéries sont si densément regroupées qu'il est possible que l'analyse de leur forme ait été erronée et qu'il s'agisse bien de coccobacilles et non de coques.

4.2.2. Identification des types morphologiques isolés

Les criblages par DGGE et par RFLP précédant l'identification des isolats par séquençage ont permis de regrouper les bactéries appartenant à la même espèce afin de ne poursuivre les

efforts d'identification que sur un représentant de chaque groupe. Ce criblage successif a été rendu nécessaire puisque des bandes retrouvées à une position identique sur un DGGE ne proviennent pas nécessairement d'une même espèce (Muyzer *et al.*, 1993). Effectivement, le criblage par RFLP cible tout le gène d'ADNr 16S alors que le DGGE n'en cible que 20 % environ. Ce problème peut être en partie résolu en utilisant un gradient en dénaturant plus étroit (Muyzer *et al.*, 1993), lequel permet de séparer plus finement les bandes et donc d'observer de légères différences non-observables sur un gradient plus large. Effectivement, le gradient en dénaturant utilisé sur deux gels étant large (0-80 %), ce dernier n'a pas permis de bien distinguer la différence entre la température de fusion de l'isolat JPB-2.03 et des isolats JPB-1.01, JPB-1.02, JPB-1.05, JPB-1.06, JPB-1.08, JPB-1.13, JPB-1.14, JPB-1.17c, JPB-2.01, JPB-2.02, JPB-2.04, JPB-2.05 et JPB-2.06, différence qui a bien été rendue visible suite au criblage par RFLP avec l'enzyme de restriction *Afa1* (Figure 19). À partir de la séquence de l'ADN ribosomal 16S des isolats JPB-2.03 et JPB-1.01, il a été possible de confirmer que chacun de ces isolats est composé d'une séquence en nucléotides bien distincte, y compris dans la région V3.

Sur DGGE, un fragment d'ADNr 16S soumis à l'analyse reste entier et générera une bande unique sur un gel (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer et Smalla, 1998). Afin de vérifier la pureté d'un isolat, il est même possible d'utiliser cette dernière caractéristique. Ainsi, la présence d'une seule bande est un bon indice de la pureté d'une souche. L'inverse n'est cependant pas nécessairement vrai, c'est-à-dire que le fait de voir plus d'une bande sur DGGE n'est pas toujours synonyme d'absence de pureté. En effet, dans certains cas, il est possible qu'il y ait une hétérogénéité dans les différentes copies d'ADNr 16S que possède une même bactérie (Villemur *et al.*, 2002). Une telle hétérogénéité peut effectivement générer plusieurs bandes sur DGGE, alors que la souche est bel et bien pure. Dans la présente étude, deux isolats ont généré chacun trois bandes, soit JPB-1.17a et JPB-2.07. Lorsque l'ADNr 16S de JPB-1.17a a été séquencé, sept positions seulement se sont avérées ambiguës ("N"), soit 0.5 % de la séquence. Ceci suggère que la souche est pure mais qu'elle possède plusieurs copies d'ADNr 16S légèrement différentes les unes des autres. Quant à JPB-2.07, aucune ambiguïté n'a été trouvée dans sa séquence. Ceci laisse supposer que la souche est pure, sans toutefois expliquer les bandes multiples sur DGGE.

Parmi les espèces bactériennes les plus rapprochées phylogénétiquement des différents isolats obtenus (Figure 21), certaines ont été rapportées dans la littérature comme ayant des caractéristiques d'intérêt pour le traitement effectué par le RBS-2. La bactérie *Leucobacter*

komagatae fait partie de la classe des *Actinobacteria* et est associée à l'isolat JPB-1.15. Cette dernière est un bacille aérobique à Gram positif capable d'assimiler l'acétate et incapable d'effectuer la réduction du nitrate (Takeuchi *et al.*, 1996). Cet isolat ne serait pas considéré comme un compétiteur aux PAO pour l'assimilation de l'acétate car il consomme cette source de carbone en condition aérobie (Takeuchi *et al.*, 1996).

Le groupe de recherche de Blackall *et al.*, (1997) a identifié, dans des boues activées, une α -*proteobacteria* présumée bactérie G en forme de coque arrangée en tétrades, nommée *Tetracoccus cechii*. Les voisins phylogéniques les plus rapprochés (à 93 % de similarité) de cette dernière sont *Rhodobacter sphaeroides* et *R. capsulatus* (Blackall *et al.*, 1997), soit les voisins phylogénique les plus rapprochés du type morphologique JPB-1.18. Il serait intéressant de se pencher sur l'implication de ce dernier en tant que compétiteur aux PAO.

Une autre bactérie appartenant à la classe des α -*proteobacteria*, *Bosea minatitlanensis*, est associée à l'isolat JPB-2.10. Cette dernière est un bacille à Gram négatif, aérobie stricte, isolée à partir d'un digesteur anaérobique (Ouattara *et al.*, 2003). Elle a la capacité d'assimiler l'acétate (Ouattara *et al.*, 2003), donc, pourrait agir dans la compétition contre les PAO pour ce substrat.

L'isolat JPB-2.07 est phylogénétiquement proche de la bactérie *Catellibacterium nectariphilum*, un bacille plutôt ovoïde à Gram négatif isolé au Japon dans des boues activées (Tanaka *et al.*, 2004). Il avait été remarqué alors que la croissance de *C. nectariphilum* était clairement stimulée par l'ajout, dans le milieu de culture, du surnageant provenant d'une culture bactérienne mixte (Tanaka *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que lors de la présente étude, l'isolat JPB-2.07 a justement été obtenu en le faisant croître sur le milieu de culture constitué d'affluent du RBS-2 (soit le surnageant de la culture bactérienne évoluant dans l'AT-RBS). Selon Tanaka *et al.*, (2004) *C. nectariphilum* aurait tendance à demeurer en chaînes, ressemblant donc au type morphologique 8 retrouvé sur la figure 15.C. L'accumulation de PHA intracellulaire est observée chez *C. nectariphilum*. Cette bactérie est incapable d'effectuer la réduction du nitrate (Tanaka *et al.*, 2004).

Les bactéries *Pseudomonas lini*, *P. fluorescens* et *P. putida*, des γ -*proteobacteria*, sont associées à l'isolat JPB-1.01. Ce dernier isolat est abondamment retrouvé dans le RBS-2 car il représente 15 isolats. Leur présence pourrait provenir d'une distorsion due à la méthode de culture. Une vérification par FISH serait à faire pour confirmer ou infirmer leur haute proportion.

La bactérie *P. lini* est un bacille à Gram négatif ayant été isolée en France à partir de la rizosphère et de l'eau et capable d'effectuer la dénitrification (Delorme *et al.*, 2002).

Les isolats JPB-1.03, JPB-1.12 et JPB-1.17a se rapprochent phylogénétiquement de bactéries appartenant à la classe des *β -proteobacteria*, soit la classe bactérienne de « *Ca. Accumulibacter* ». L'isolat JPB-1.12 se rapproche de la bactérie *Roseateles depolymerans*, un bacille à Gram négatif isolé dans de l'eau de rivière au Japon et capable de faire des réserves de PHA (Suyama *et al.*, 1999). *R. depolymerans* a la capacité de dégrader le polycarbonate de polyhexaméthylène (PHC) et d'autres plastiques biodégradables (Suyama *et al.*, 1999). Cette bactérie peut produire des pigments caroténoïdes et des pigments bactériochlorophylles a (BChl a) lorsque mise en culture sur un milieu solide contenant phytol esters (Suyama *et al.*, 1999). De tels pigments donnant à la colonie la couleur rose n'ont pas été produits chez l'isolat JPB-1.12. Ce même isolat se rapproche de la bactérie *Pelomonas saccharophila* (autrefois nommé *Pseudomonas saccharophila*), un bacille aérobic à Gram-négatif isolé à partir de boue, ayant la capacité de fixer l'azote et capable d'une croissance autotrophique (Barraquio *et al.*, 1986; Xie et Yokota, 2005). Cette bactérie a la capacité d'assimiler l'acétate et de stocker des granules de PHA (Xie et Yokota, 2005). Elle peut aussi effectuer la dénitrification (Xie et Yokota, 2005). Enfin, l'isolat JPB-1.12 est aussi associé à la bactérie *Mitsuaria chitosanitabida*, un bacille à Gram négatif, aérobic stricte, capable de produire du chitosane (Amakata *et al.*, 2005). Cette bactérie obtenue au Japon à partir du sol peut réduire le nitrate en nitrite. Elle ne contient pas de granules intracellulaires de PHA (Amakata *et al.*, 2005).

La littérature ne rapporte aucune espèce associée à l'un ou à l'autre de ces 13 génotypes ayant la capacité d'emmagasiner des granules de poly-P en grande quantité. Tous ces isolats obtenus à partir de la biomasse du RBS-2 ne joueraient donc aucun rôle significatif dans la déphosphatation biologique.

4.3. FISH

L'analyse FISH a permis d'évaluer à environ 50 % l'abondance de « *Ca. Accumulibacter* » parmi l'ensemble des bactéries appartenant à la classe des *β -proteobacteria* de l'échantillon de boues activées provenant du RBS-2. Toutefois, cette analyse n'a pas permis de déterminer l'abondance des *β -proteobacteria* ni l'abondance de « *Ca. Accumulibacter* » parmi l'ensemble des bactéries. Cette information aurait pu être connue si l'hybridation de la sonde EUB avait été

effectuée simultanément avec l'hybridation de la sonde BET sur le même échantillon microbien (Wagner *et al.*, 1993). Une étude menée par Wong *et al.*, (2005), lors de laquelle cette hybridation simultanée avec ces deux sondes a été effectuée, a permis de déterminer que les cellules fluorescentes avec la sonde PAO contribuaient à plus de 9 % des cellules fluorescentes avec la sonde EUB dans les boues activées de 11 usines sur 13.

« *Ca. Accumulibacter* » étant une *β-proteobacteria*, il était attendu d'observer un chevauchement des signaux des sondes Beta42a et PAO651 à la figure 22. Surprenamment, ce chevauchement n'a pas été observé. L'explication réside probablement dans la spécificité de la sonde Beta42a qui cible les *β-proteobacteria*. Celle-ci présente en effet un nucléotide de divergence par rapport à la séquence connue pour « *Ca. Accumulibacter* » :

« <i>Ca. Accumulibacter</i> »:	5' GCC TTC CCA CCT CGT TT 3'
Sonde Beta42a :	5' GCC TTC CCA CAT CGT TT 3'

Les sondes à oligonucléotides étant très spécifiques (Wagner *et al.*, 1994), la sonde Beta42a n'est pas parvenue à s'hybrider sur la séquence légèrement différente de la bactérie « *Ca. Accumulibacter* ». Cette divergence suggère qu'il existe probablement d'autres bactéries appartenant à la classe des *β-proteobacteria* n'ayant pas été ciblées par la sonde Beta42a à cause d'aussi peu qu'un nucléotide de différence. Un tel non-appariement peut aussi avoir lieu avec toutes autres sondes à large spectre.

Dans de futurs essais, il serait intéressant de déterminer la proportion relative des *α-proteobacteria*, des *γ-proteobacteria* et des *β-proteobacteria* parmi les *Eubacteria* afin de vérifier si la biomasse du RBS-2 est dominée par les *β-proteobacteria* comme c'est le cas dans d'autres études du consortium bactérien de boues activées provenant d'EBPR (Manz *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2007).

Enfin, il est aussi possible d'effectuer une coloration spécifique des granules intracellulaires de polyP avec une solution DAPI simultanément à l'hybridation avec la sonde PAO (Wong *et al.*, 2005). Cette double coloration a déjà permis d'observer des proportions considérables de cellules positives à l'hybridation avec la sonde PAO, sans toutefois posséder de granules de polyP (Wong *et al.*, 2005; Beer *et al.*, 2006). Il serait très pertinent d'adopter cette méthode de coloration pour

identifier la morphologie et l'organisation des vrais PAO dans l'échantillon, soit ceux qui sont positifs à l'hybridation avec la sonde PAO et positifs à la coloration avec la solution DAPI.

4.4. Analyse de l'isolement de la microflore du RBS-2 suite à la séparation des bactéries sur gradient de Percoll

4.4.1. Évaluation de la méthode de séparation des bactéries sur gradient de Percoll

Afin de permettre la séparation de chaque bactérie individuellement sur un gradient de densité, il a été nécessaire de défaire la biomasse retrouvée sous forme de floccs. La méthode retenue a été inspirée d'une méthode retrouvée dans la littérature, cherchant à optimiser le ratio de la fragmentation des floccs versus la mortalité cellulaire. (Falcioni *et al.*, 2006). Cette méthode procédait d'abord à 5 passages d'un échantillon de 5 mL dans un appareil défaisant mécaniquement les agrégats (MediFASTH (CONSUL T.S., Torino, Italie), normalement utilisé pour préparer des suspensions cellulaires de tissus animaux et végétaux) dont chaque cycle de 45 secondes constituait en une rotation à 23 000 révolutions par seconde. L'échantillon, maintenu dans un contenant sur glace, était ensuite sonifié pendant 2 cycles de 45 secondes à 100W. Une sonification trop prolongé était à éviter car elle inactiverait les bactéries en perforant leur membrane (Zhang *et al.*, 2007). Dans le cadre de la séparation des boues activées du RBS-2, la méthode de dispersion mécanique avec l'homogénéisateur MediFASTH a été remplacée par une dispersion mécanique constituant 20 passages dans un homogénéisateur de type « Potter » et la sonification a été effectuée de façon identique à Falcioni *et al.* (2006). Une filtration sur membrane de 20 – 25 µm de porosité avait ensuite pour objectif l'élimination des agrégats résiduels. À cette étape, le filtrat avait l'apparence lisse et exempt de agrégats. Pourtant, la figure 28 montre la présence d'amas de bactéries ressemblant à des floccs, surtout au niveau des fractions 2 et 3. Il est possible que les bactéries séparées aient tendance à se regrouper soit pendant la centrifugation permettant la concentration de la biomasse, soit pendant la centrifugation formant le gradient de densité. Il serait profitable de parvenir à empêcher ce regroupement de bactéries afin qu'une plus grande quantité d'entre elles parviennent à migrer individuellement sur le gradient de Percoll et ainsi contribuer à l'enrichissement des bandes formées.

Les paramètres de la centrifugation du Percoll et de la biomasse semblent avoir été bien établis puisque des bandes de bactéries ont été retrouvées tout le long du gradient (Figure 28). La présence de la majorité des PAO dans les bandes du bas a été démontrée par la coloration Neisser (Figure 29) et par PCR avec les amorces PAO et universelles bactériennes (Figures 30 et 31). Ceci va de paire avec ce qui est rapporté dans la littérature puisque les bactéries riches en poly-P ont une densité élevée et sédimentent rapidement (Schuler et Jang, 2007). Il est donc normal que les PAO se soient retrouvés au bas du gradient de densité.

Il serait très pertinent, dans un futur essai, d'obtenir une plus grande distance entre les bandes du bas en effectuant une centrifugation avec une force légèrement inférieure. Ceci permettrait de prélever les bandes individuellement, plutôt que de regrouper quelques bandes en fractions.

4.4.2. Évaluation des méthodes d'enrichissement sur gradient de Percoll

L'ensemencement des fractions du bas obtenues par séparation sur gradient de densité a permis l'isolement de 10 génotypes différents. Des espoirs étaient mis sur la possibilité d'y retrouver « *Ca. Accumulibacter* ». Effectivement, bien qu'il n'ait jamais été possible d'obtenir une culture pure de cette bactérie (Blackall *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2006), les conditions de mise en cultures développées lors de la présente étude laissaient croire en la possibilité d'obtenir des colonies de « *Ca. Accumulibacter* » puisque cette dernière avait d'abord été enrichie pour ensuite être déposée sur un milieu de croissance contenant possiblement des métabolites essentiels à sa croissance.

Les connaissances régissant les interrelations entre les micro-organismes sont souvent très limitées, expliquant pourquoi il est fréquent d'observer que des bactéries de l'environnement sont non-cultivables seules sur un milieu artificiel (Ohno *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2004). Lors des différents ensemencements des fractions du bas, l'addition d'effluent provenant du RBS-2 dans le milieu de culture était présumée apporter les facteurs de croissance fournis par d'autres micro-organismes du consortium et essentiels à la croissance de « *Ca. Accumulibacter* », et donc permettre la croissance de cette dernière.

Différentes stratégies d'ensemencement des fractions démontrant un enrichissement en PAO ont été employées afin de favoriser la croissance de « *Ca. Accumulibacter* ». Lors du premier essai d'isolement, le milieu RBS-2 (2) a été choisi comme milieu de croissance en condition aérobie. De plus, dans l'éventualité où les facteurs de croissance essentiels à « *Ca.*

Accumulibacter » seraient détruits lors de l'autoclavage du milieu pour fabriquer les géloses RBS-2 (2), un petit volume de ce même milieu, liquide et stérilisé par filtration sur 0.22 μm , a été étalé à la surface des géloses immédiatement avant l'inoculation des bactéries. Malheureusement, aucun des isolats ayant poussé sur ces géloses n'a été identifié comme étant « *Ca. Accumulibacter* » suite à des analyses PCR.

Un deuxième essai, très semblable au premier, a été mené en incubant en condition microaérobie les géloses de milieu RBS-2 (2) inoculées des bandes inférieures à différentes dilutions. Ce test avait pour objectif de vérifier l'hypothèse selon laquelle « *Ca. Accumulibacter* », dans la structure organisationnelle du floc, pourrait se situer à un lieu précis où elle ne serait soumise qu'à une faible concentration d'oxygène. Selon cette hypothèse, la concentration d'oxygène présente lors de l'incubation aérobie du premier essai aurait possiblement inhibé la croissance de « *Ca. Accumulibacter* ». Cette hypothèse a été rejetée puisqu'aucun type morphologique nouveau n'a été retrouvé parmi les colonies ayant crû sous les conditions microaérobies, et que la croissance de ces dernières a été ralentie, et non accélérée.

Un troisième essai a été mis de l'avant, à la lumière des informations recueillies à partir d'un article publié par Martin *et al.* (2006). Ce dernier expose les résultats obtenus lors d'une récente étude métagénomique de boues activées de deux traitements EBPR de format laboratoire dominées par la bactérie « *Ca. Accumulibacter* », démontrant que cette dernière possède les gènes pour effectuer la dénitrification à partir du nitrite. Pour cette raison, le milieu RBS-2 (2) a été supplémenté avec du nitrite à une concentration permettant l'activation de ces gènes, et les bactéries ont été incubées en conditions d'anoxies, le nitrite étant l'accepteur final d'électron disponible. Martin *et al.* (2006) proposent aussi que la croissance de « *Ca. Accumulibacter* » dépend fortement de la présence de cobalt. Ainsi, du cobalt a aussi été ajouté au milieu RBS-2 (2). Un petit volume de ce même milieu, liquide et stérilisé par filtration sur membrane de 0.22 μm de porosité, a été étalé à la surface des géloses immédiatement avant l'inoculation des bactéries. Ces changements de milieu et de conditions de croissance ont semblé prometteurs pour avantager la croissance de « *Ca. Accumulibacter* » retrouvée dans les fractions 14, 15 et 16. L'expérience a été reproduite simultanément en incubant les bactéries des mêmes fractions sur géloses RBS-2 (2) supplémentées, en condition aérobie. Encore ici, aucun isolat n'a été identifié comme étant « *Ca. Accumulibacter* » selon des analyses PCR.

4.4.3. Analyse des isolats obtenus à partir de l'enrichissement sur gradient de Percoll

Les 10 géotypes obtenus se rapprochent d'espèces connues ayant tout-de-même un intérêt soit dans le biotraitement, et au minimum, dans la meilleure connaissance du consortium bactérien dans lequel évolue « *Ca. Accumulibacter* ». Un premier isolat, JPB-3.06b, se rapproche des espèces *Bacillus pseudofirmus* et *B. alcalophilus*, toutes deux étant des bacilles à Gram positif dont la croissance est optimum à pH 9 (Vargas *et al.*, 2005). *B. alcalophilus* a la capacité de réduire le nitrate et est reconnue pour son activité lipolytique en conditions alcalines (Vargas *et al.*, 2004). Quant à *B. pseudofirmus*, cette bactérie ne peut réduire le nitrate.

Parmi les bactéries appartenant à la classe des α -*proteobacteria*, l'isolat JPB-5.10 se rapproche de la bactérie *Methylobacterium radiotolerans*. La présence de cette bactérie a été retrouvée, à l'aide de méthodes PCR, dans un composteur auto-chauffant à l'échelle d'un champ, traitant des déchets agro-industriels (Pedro *et al.*, 2003). Les auteurs ne sont pas parvenus à faire croître cette dernière en culture pure. Il est possible que l'isolat JPB-5.10 retrouvé dans le RBS-2 provienne du traitement AT-RBS puisque les conditions retrouvées dans les réservoirs de ce dernier ressemblent aux conditions où a été retrouvée la bactérie *M. radiotolerans*.

L'isolat JPB-5.11a se rapproche de la bactérie *Bosea thiooxidans*, un bacille à Gram négatif isolé à partir de sols où l'on pratique l'agriculture, capable d'oxyder le thiosulfate en présence de carbone organique (Das *et al.*, 1996). Cet organisme vit en aérobie stricte et peut effectuer la dénitrification à partir du nitrate en condition de croissance hétérotrophe. Les colonies obtenues par Das *et al.* (1996) sur de l'agar étaient rondes, lisses, de couleur crème et d'un diamètre de 1 à 1.5 mm. Ces caractéristiques correspondent effectivement aux colonies de l'isolat JPB-5.11a (Tableau 7).

L'isolat JPB-3.12 se rapproche de la bactérie *Sphingomonas wittichii*, bacille à Gram négatif isolé à partir d'un échantillon d'eau de la rivière Elbe au Japon (Yabuuchi *et al.*, 2001). Cette bactérie est reconnue pour sa capacité à dégrader et à utiliser le dibenzo-p-dioxin (DD) et le dibenzofurane (DF) comme unique source de carbone et d'énergie. Après trois jours d'incubation, les auteurs Yabuuchi *et al.* (2001) ont observé que ces colonies étaient lisses, brillantes, convexes, de couleur jaune pâle et d'un diamètre de 1 mm. Lors de la présente étude, les colonies avaient un diamètre de 1 mm et étaient plutôt de couleur jaune-orangé. L'isolat JPB-3.12 se rapproche aussi de la bactérie *Sphingopyxis alaskensis*, un bacille à Gram négatif dominant isolé à partir d'un environnement marin oligotrophe (Vancanneyt *et al.*, 2001; Godoy *et*

al., 2003). Les colonies sont rondes, jaune-beige et convexes. Cette bactérie peut contenir des PHA jusqu'à 26 % de son poids sec, mais n'assimile pas l'acétate (Vancanneyt *et al.*, 2001).

Parmi les bactéries d'intérêt appartenant à la classe des *γ-proteobacteria*, l'isolat JPB-3.11 est très proche de l'espèce *Pseudomonas migulae* (Verhille *et al.*, 1999). Cette bactérie est un bacille à Gram négatif isolé à partir d'eau minérale naturelle. Les colonies sont rondes et lisses, ce qui correspond à la description coloniale de l'isolat JPB-3.11 (Tableau 6). La capacité de ce micro-organisme à effectuer la dénitrification à partir du nitrate a été démontrée (Verhille *et al.*, 1999).

L'isolat JPB-5.03 se rapproche de la bactérie *Stenotrophomonas nitritireducens*, isolée pour la première fois à partir d'un biofiltre maintenu avec des gaz de rejets artificiels contenant de l'ammoniac et du disulfide diméthyl ainsi qu'à partir des gaz de rejet d'une usine de production animale (Finkmann *et al.*, 2000). Cette bactérie a la capacité de réduire le nitrite, et non le nitrate, et a comme produit final l'oxyde nitreux (N_2O). Si l'isolat JPB-5.03 possède cette même capacité à dénitrifier à partir du nitrite, il est réaliste de croire que ce dernier a profité, pour croître, de l'ajout de nitrite au milieu de culture RBS-2 (2) supplémenté lors du troisième essai de séparation de la biomasse sur gradient de Percoll. Seulement une minorité d'organismes dénitrifiants sont déficients de la première ou de la dernière réaction de la voie de dénitrification complète (NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O , N_2) (Finkmann *et al.*, 2000). Selon Martin *et al.* (2006), « *Ca. Accumulibacter* » est une bactérie possédant tous les gènes de la dénitrification à l'exception de la première réaction, soit la réduction du nitrate en nitrite. Les bactéries *Stenotrophomonas maltophilia* et *Xanthomonas campestris* sont aussi très proches de l'isolat JPB-5.03. Il a été démontré que ces dernières ne possédaient pas les gènes de la dénitrification (Finkmann *et al.*, 2000). *S. maltophilia* est un bacille à Gram négatif retrouvée dans les sédiments riches en sélénium des bassins d'évaporation en agriculture (Dungan *et al.*, 2003). En production porcine québécoise, le sélénium se retrouverait dans les bassins suite à la supplémentation de cet élément essentiel dans la nourriture (Helie *et al.*, 1998). Cet élément devient toutefois toxique lorsqu'il est administré en excès chez les humains et les animaux et peut être bioaccumulé le long de la chaîne alimentaire (Dungan *et al.*, 2003). *S. maltophilia* a la capacité de réduire le sélénate (SeO_4^{2-}) et le sélénite (SeO_3^{2-}) en sélénium (Se_0) (moins toxique et biologiquement non-disponible grâce à sa nature insoluble) et en produits volatils tels le diméthyl selenide (DMSe), le diméthyl selenenyl (DMSeS) et le diméthyl diselenide (DMDS₂) (Dungan *et al.*, 2003).

Enfin, 4 des 10 isolats se rapprochent d'espèces bactériennes appartenant à la classe des *β-proteobacteria*. Ces derniers sont particulièrement intéressants puisqu'ils font partie de la même classe que « *Ca. Accumulibacter* ». L'isolat JPB-3.01 se rapproche des bactéries *Simplicispira metamorpha* et *Simplicispira psychrophila*. *S. psychrophila* a récemment été isolée à partir d'eaux usées industrielles (Grabovich *et al.*, 2006). Toutes deux ont la capacité d'assimiler l'acétate et de former des réserves de PHA. Ces bacilles légèrement recourbés à Gram négatif sont capables d'effectuer la dénitrification à partir du nitrate.

L'isolat JPB-3.02 se rapproche de l'espèce *Thauera selenatis*, bacille à Gram négatif possédant un mécanisme de respiration anaérobie lui permettant d'utiliser le sélénate et d'autres composés aromatiques comme accepteurs d'électrons, en effectuant simultanément la dénitrification à partir du nitrate (Macy *et al.*, 1993; Song *et al.*, 1998). La bactérie « *Pseudomonas butanovora* » est aussi associée à l'isolat JPB-3.02. Cette dernière a été isolée à partir d'une suspension de pétrole en 1980, et depuis, a été identifiée dans la lignée *Thauera* selon des analyses de l'ARN 16S, sans toutefois avoir été officiellement reclassifiée (Anzai *et al.*, 2000).

L'isolat JPB-3.10 se rapproche de la bactérie *Hydrogenophaga defluvii*, bacille à Gram négatif isolé à partir de boues activées d'une usine d'épuration des eaux usées en Allemagne (Kampfer *et al.*, 2005). Les colonies ayant poussé sur milieu YPG sont rondes, lisses et jaune pâle, ce qui ne correspond pas à l'apparence des colonies observées lors de la présente étude, ayant poussé sur le milieu RBS-2 (2) (Tableau 6). *H. defluvii* est capable d'effectuer la réduction du nitrate, mais ne procède pas à la dénitrification complète (Kampfer *et al.*, 2005). Cette dernière est aussi capable d'accumuler des réserves de PHA dans des conditions où l'azote est limitant (Spring *et al.*, 2005). L'isolat JPB-3.10 se rapproche aussi de la bactérie *Malikia spinosa*, un bacille à Gram négatif isolé à partir de l'eau de la rivière DuPage, IL, É.U (Spring *et al.*, 2005). La croissance coloniale de *S. spinosa* après quelques jours est transparente et mucoïde, ce qui ressemble aux caractéristiques de la colonie JPB-3.10 (Tableau 6). *M. spinosa* possède certaines caractéristiques similaires à celles des PAO, telles la capacité d'accumuler de larges quantités de PHA en conditions d'anaérobiose, et la disparition de ces granules au profit de l'apparition de réserves de poly-P en conditions de limitation en carbone (Spring *et al.*, 2005). Par contre l'acétate n'est pas utilisé par cette dernière comme source de carbone. De plus, *M. spinosa* peut réduire le nitrate en nitrite, mais est incapable de réduire le nitrite.

Enfin, l'isolat JPB-5.02 se rapproche des espèces *Acidovorax delafieldii* et *A. defluvii*. Ces deux espèces bactériennes sont fréquemment retrouvées dans les boues activées d'usines d'épuration des eaux municipales (Schulze *et al.*, 1999; Zhao et Ward, 1999). La bactérie *A. defluvii* est un bacille à Gram négatif possédant souvent de larges granules de PHA et peut réduire le nitrate (Schulze *et al.*, 1999). La bactérie *A. delafieldii* a démontré sa grande capacité à dégrader des nitrophénols et du nitrobenzène (Zhao et Ward, 1999).

Bien que la bactérie « *Ca. Accumulibacter* » n'ait pas été obtenue parmi les isolats, cela ne signifie pas qu'aucun PAO n'a été isolé lors de cette étude. Il est possible que certaines des bactéries isolées soient des PAO, simplement différentes de « *Ca. Accumulibacter* ». Il serait intéressant de pousser les analyses sur certaines des bactéries isolées, particulièrement celles appartenant à la classe *β -proteobacteria*, afin de déterminer leur capacité à se comporter comme ce qui est attendu des PAO.

4.5. Analyse des clones obtenus

Les amorces utilisées pour effectuer cette génothèque ont été construites à partir de séquences de sondes élaborées par Crocetti *et al.*, (2000) destinées à des analyses de type FISH. La génothèque faite avec ces amorces (PAO462F / PAO651R) avait pour but de vérifier la diversité bactérienne du RBS-2 amplifiable par ces amorces, et de vérifier la correspondance de cette diversité avec celle obtenue par Crocetti *et al.* (2000). Une étude très récente menée par Ahn *et al.*, (2007) a employé une stratégie similaire pour connaître la diversité bactérienne d'un RBS déphosphatant sous aération continue et entretenu avec un affluent synthétique. Lors de l'étude menée par cette équipe, une génothèque a été obtenue avec les amplicons provenant des amorces PAO462F et PAO846R. Des 24 clones séquencés avec cette étude, tous ont été identifiés à *Dechloromonas* sp (Ahn *et al.*, 2007).

Le présent travail, contrairement à celui mené par Anh *et al.*, (2007), a permis de cibler, dans la biomasse du RBS-2, les bactéries correspondant aux séquences de Crocetti *et al.*, (2000), des *β -proteobacteria* non-cultivées. Les autres clones obtenus ont tous été des *β -proteobacteria* phylogénétiquement rapprochés des bactéries ciblées.

Le clone JPBCL22 se rapproche de *Rhodocyclus tenuis*, une bactérie retrouvée dans les boues activées d'un système EBPR (McMahon *et al.*, 2002). Dans un tel système, il a été reconnu

que *R. tenuis* exprimait les gènes codant pour la PPK et aurait donc un rôle significatif dans la déphosphatation biologique (McMahon *et al.*, 2002).

La bactérie *Propionivibrio limicola* se rapproche des clones obtenus. Cette dernière est une bactérie anaérobie aérotolérante ayant pour seuls substrats l'acide quinique et l'acide shikimique, qu'elle fermente en acétate, en propionate et en CO₂ (Brune *et al.*, 2002). Toutefois, la littérature ne rapporte pas son implication dans un système EBPR.

Les séquences des clones obtenus se rapprochent de la bactérie *Gallionella ferruginea*. Cette dernière a la capacité d'enlever efficacement le fer, l'arsenic (III) et l'arsenic (V) de l'eau (Katsoyiannis *et al.*, 2004; Bruneel *et al.*, 2006). Son rôle dans un système EBPR n'a pas été rapporté dans la littérature.

Le groupe représenté par le clone JPBCL29 se rapproche de *Propionivibrio dicarboxylicus*. Cette bactérie anaérobie reconnue pour fermenter le malate et pour former de l'acide propionique (Hippe *et al.*, 1999) n'a pas été rapportée comme faisant partie d'un système EBPR.

La bactérie *Burkholderia thailandensis* a été isolée à partir d'un échantillon prélevé dans l'environnement et se rapproche de *B. pseudomallei*, un pathogène pour les humains et les animaux (Brett *et al.*, 1998). Son rôle dans un système EBPR n'a jamais été démontré dans la littérature jusqu'à présent.

Conclusion

Les deux RBS opérés lors de cette étude ont mené à l'enrichissement de microflore d'intérêt dans le traitement biologique des eaux usées des porcheries ainsi que dans le traitement des eaux usées municipales. Effectivement, une flore nitrifiante, reconnue pour être difficile et lente à s'installer, a bien démontré avoir colonisé le RBS-1 en octroyant à ce dernier de bonnes performances nitrifiantes. Le RBS-2, quant à lui, a profité de l'installation d'une microflore à la fois nitrifiante, dénitrifiante et déphosphatante pour réduire les concentrations en composés carbonés, azotés et phosphorés de son affluent. Les performances des deux RBS n'ont toutefois pas atteint les niveaux d'élimination des polluants souhaités afin qu'une recirculation de l'eau pour de futurs lavages de la porcherie ou qu'un rejet dans les cours d'eau soient rendus possibles.

La composition de la communauté microbienne des boues activées du RBS-2 a été étudiée davantage en portant une attention particulière sur les PAO. L'hybridation fluorescente *in situ* (FISH), l'analyse par PCR et l'élaboration d'une génothèque ont toutes trois révélé et confirmé la présence de « *Ca. Accumulibacter* » dans cette biomasse. Malheureusement, toutes les tentatives d'isolement de « *Ca. Accumulibacter* » ayant été développées dans la présente étude ne sont pas arrivées à leur fin. La course à l'isolement de cette bactérie, commencée il y a plus de trente ans, poursuit son cours et les expériences menées lors de la présente étude s'ajoutent à cette grande odyssée.

Des pistes et des outils empruntés et raffinés pour ce travail gagneraient à être exploités davantage dans la poursuite du projet d'isolement de « *Ca. Accumulibacter* ». En effet, les séquences d'opération du RBS-2 se sont déjà montrées efficaces pour enrichir la biomasse en « *Ca. Accumulibacter* » et pourraient être optimisées davantage. De plus, la détection de la présence de « *Ca. Accumulibacter* » par analyse PCR avec des amorces ciblant spécifiquement l'ADNr 16S de cette bactérie, expérimentée pour la première fois lors de ce travail, s'est avérée être une méthode très rapide et efficace dans l'atteinte de son objectif. Aussi, la séparation des bactéries sur un gradient de densité pourrait encore être exploitée en tentant de mieux séparer les bactéries des flocs et en tentant d'obtenir une meilleure distance entre chaque bande obtenue. Enfin, il serait intéressant de poursuivre les analyses sur les bactéries appartenant à la classe β -

proteobacteria isolées lors de cette étude afin de déterminer leur capacité à se comporter comme ce qui est attendu des PAO.

L'isolement de « *Ca. Accumulibacter* » ou de toute autre bactérie ayant les propriétés déphosphatantes du consortium microbien effectuant la déphosphatation biologique demeure un objectif très actuel en environnement. L'isolement de cette bactérie ouvrira des voies à d'autres recherches ce qui permettra de mieux comprendre et de mieux contrôler les systèmes de déphosphatation biologique et donc de mieux réduire l'apport anthropique de ce composé dans l'environnement.

Références

- Ahn, J., S. Schroeder, *et al.* (2007). "Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor." Applied and Environmental Microbiology **73**(7): 2257-2270.
- Amakata, D., Y. Matsuo, *et al.* (2005). "*Mitsuaria chitosanitabida* gen. nov., sp. nov., an aerobic, chitosanase-producing member of the 'Betaproteobacteria'." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**(5): 1927-1932.
- Anzai, Y., H. Kim, *et al.* (2000). "Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**(4): 1563-1589.
- APHA (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, D.C., American Public Health Association.
- Arp, D. J., L. A. Sayavedra-Soto, *et al.* (2002). "Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*." Archives of Microbiology **178**(4): 250-255.
- Barraquio, W. L., B. C. Padre, *et al.* (1986). "Nitrogen fixation by *Pseudomonas saccharophila* Douforoff ATCC 15946." Journal of Genetics in Microbiology **132**: 237-241.
- Beaudet, R., C. Gagnon, *et al.* (1990). "Microbiological aspects of aerobic thermophilic treatment of swine waste." Applied and Environmental Microbiology **56**(4): 971-976.
- Beer, M., H. M. Stratton, *et al.* (2006). "Which are the polyphosphate accumulating organisms in full-scale activated sludge enhanced biological phosphate removal systems in Australia?" Journal of Applied Microbiology **100**(2): 233-243.
- Blackall, L. L., G. Crocetti, *et al.* (2002). "A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **81**(1-4): 681-691.
- Blackall, L. L., S. Rossetti, *et al.* (1997). "The characterization and description of representatives of 'G' bacteria from activated sludge plants." Letters in Applied Microbiology **25**(1): 63-69.
- Bond, P. L., R. Erhart, *et al.* (1999). "Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems." Applied and Environmental Microbiology **65**(9): 4077-4084.
- Bond, P. L., P. Hugenholtz, *et al.* (1995). "Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors." Applied and Environmental Microbiology **61**(5): 1910-1916.

Bothe, H., G. Jost, *et al.* (2000). "Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments." FEMS Microbiology Reviews **24**(5): 673-690.

Brett, P. J., D. DeShazer, *et al.* (1998). "*Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species." International Journal of Systematic Bacteriology **48**(1): 317-320.

Brune, A., W. Ludwig, *et al.* (2002). "*Propionivibrio limicola* sp. nov., a fermentative bacterium specialized in the degradation of hydroaromatic compounds, reclassification of *Propionibacter pelophilus* as *Propionivibrio pelophilus* comb. nov. and amended description of the genus *Propionivibrio*." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **52**(2): 441-444.

Bruneel, O., R. Duran, *et al.* (2006). "Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoules, France." Applied and Environmental Microbiology **72**(1): 551-556.

Burow, L. C., Y. Kong, *et al.* (2007). "Abundance and ecophysiology of *Defluviicoccus* spp., glycogen-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment processes." Microbiology **153**(1): 178-185.

Cech, J. S. et P. Hartmman (1990). "Glucose induced break down of enhanced biological phosphate removal." Environmental Technology **11**: 651-656.

Cheng, J. Y. et B. Liu (2001). "Nitrification/denitrification in intermittent aeration process for swine wastewater treatment." Journal of Environmental Engineering-Asce **127**(8): 705-711.

Coffey, M. T. (1999). "A swine integrator's perspective on nutrient management procedures." Journal of Animal Science **77**(2): 445-449.

Collivignarelli, C. et G. Bertanza (1999). "Simultaneous nitrification-denitrification processes in activated sludge plants: Performance and applicability." Water Science and Technology **40**(4-5): 187-194.

Cooper, C. M. (1993). "Biological Effects of Agriculturally Derived Surface-Water Pollutants on Aquatic Systems - a Review." Journal of Environmental Quality **22**(3): 402-408.

Crocetti, G. R., J. F. Banfield, *et al.* (2002). "Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes." Microbiology-Sgm **148**: 3353-3364.

Crocetti, G. R., P. Hugenholtz, *et al.* (2000). "Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation." Applied and Environmental Microbiology **66**(3): 1175-1182.

Dabert, P., J. P. Delgenes, *et al.* (2005). "Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem." Applied Microbiology and Biotechnology **66**(5): 575-588.

- Das, S. K., A. K. Mishra, *et al.* (1996). "Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing." International Journal of Systematic Bacteriology **46**(4): 981-987.
- Delorme, S., P. Lemanceau, *et al.* (2002). "*Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **52**(2): 513-523.
- Dungan, R. S., S. R. Yates, *et al.* (2003). "Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment." Environmental Microbiology **5**(4): 287-295.
- Edwards, U., T. Rogall, *et al.* (1989). "Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA." Nucleic Acids Research **17**(19): 7843-7853.
- Falcioni, T., A. Manti, *et al.* (2006). "Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry." Cytometry Part B-Clinical Cytometry **70B**(3): 149-153.
- Filali-Meknassi, Y., M. Auriol, *et al.* (2005). "Design strategy for a simultaneous nitrification/denitrification of a slaughterhouse wastewater in a sequencing batch reactor: ASM2d modeling and verification." Environmental Technology **26**(10): 1081-1100.
- Filipe, C. D. M., G. T. Daigger, *et al.* (2001a). "A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: Stoichiometry, kinetics, and the effect of pH." Biotechnology and Bioengineering **76**(1): 17-31.
- Filipe, C. D. M., G. T. Daigger, *et al.* (2001b). "pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms." Water Environment Research **73**(2): 223-232.
- Filipe, C. D. M., G. T. Daigger, *et al.* (2001c). "Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs." Biotechnology and Bioengineering **76**(1): 32-43.
- Finkmann, W., K. Altendorf, *et al.* (2000). "Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**(1): 273-282.
- Fitch, W. M. et E. Margoliash (1967). "Construction of phylogenetic trees." Science **155**: 279-284.

FPPQ (2001). Rapport d'évaluation des technologies de gestion et de traitement du lisier - Plan agroenvironnemental de la production porcine. Longueuil, Fédération des Producteurs de Porcs du Québec: 61.

FPPQ (2007). Rapport Annuel 2006-2007. Longueuil: 68.

Gibbs, B. M., L. R. Shephard, *et al.* (2004). "The presence of ammonium facilitates nitrite reduction under PHB driven simultaneous nitrification and denitrification." Water Science and Technology **50**(10): 181-188.

Gieseke, A., U. Purkhold, *et al.* (2001). "Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm." Applied and Environmental Microbiology **67**(3): 1351-1362.

Godoy, F., M. Vancanneyt, *et al.* (2003). "*Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov." International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology **53**(2): 473-477.

Gouvernement du Québec (2003). Règlement sur les exploitations agricoles en bref. Québec.

Grabovich, M., E. Gavrish, *et al.* (2006). "Proposal of *Giesbergeria voronezhensis* gen. nov., sp. nov. and *G-kuznetsovii* sp. nov. and reclassification of [*Aquaspirillum*] *anulus*, [*A.*] *sinuosum* and [*A.*] *giesbergeri* as *Giesbergeria anulus* comb. nov., *G-sinuosa* comb. nov. and *G-giesbergeri* comb. nov., and [*Aquaspirillum*] *metamorphum* and [*A.*] *psychrophilum* as *Simplicispira metamorpha* gen. nov., comb. nov. and *S-psychrophila* comb. nov. (vol 56, pg 569, 2006)." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**: 1179-1179.

Hanselman, T. A., D. A. Graetz, *et al.* (2003). "Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review." Environmental Science and Technology **37**(24): 5471-5478.

Hardoyo, K. Yamada, *et al.* (1994). "Production and release of polyphosphate by a genetically engineered strain of *Escherichia coli*." Applied and Environmental Microbiology **60**(10): 3485-3490.

Hartig, E. et W. G. Zumft (1999). "Kinetics of nirS expression (cytochrome cd(1) nitrite reductase) in *Pseudomonas stutzeri* during the transition from aerobic respiration to denitrification: Evidence for a denitrification-specific nitrate- and nitrite-responsive regulatory system." Journal of Bacteriology **181**(1): 161-166.

He, S., A. Z. Gu, *et al.* (2006). "Fine-scale differences between *Accumulibacter*-like bacteria in enhanced biological phosphorus removal activated sludge." Water Science and Technology **54**(1): 111-117.

Head, I. M., W. D. Hiorns, *et al.* (1993). "The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16s ribosomal-RNA gene-sequences." Journal of General Microbiology **139**: 1147-1153.

Helie, P., R. A. Sauvageau, *et al.* (1998). "Chronic selenium toxicosis in growing-finishing pigs in southwestern Quebec." The Canadian Veterinary Journal **39**(9): 591-592.

Henze, M., P. Harremoës, *et al.* (2000). Wastewater treatment : Biological and chemical process. Berlin, Springer.

Hesselmann, R. P., C. Werlen, *et al.* (1999). "Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge." Systematic and Applied Microbiology **22**(3): 454-465.

Hippe, H., A. Hagelstein, *et al.* (1999). "Phylogenetic analysis of *Formivibrio citricus*, *Propionivibrio dicarboxylicus*, *Anaerobiospirillum thomasii*, *Succinimonas amylolytica* and *Succinivibrio dextrinosolvans* and proposal of *Succinivibrionaceae* fam. nov." International Journal of Systematic Bacteriology **49**(2): 779-782.

Hiraishi, A. et S. T. Khan (2003). "Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment." Applied Microbiology and Biotechnology **61**(2): 103-109.

Hollender, J., U. Dreyer, *et al.* (2002). "Selective enrichment and characterization of a phosphorus-removing bacterial consortium from activated sludge." Applied Microbiology and Biotechnology **58**(1): 106-111.

Hooda, P. S., A. C. Edwards, *et al.* (2000). "A review of water quality concerns in livestock farming areas." Science of the Total Environment **250**(1-3): 143-167.

Jenkins, D., M. G. Richard, *et al.* (1993). Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. New York, Lewis Publishers.

Jin, L. et M. Nei (1990). "Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis." Molecular Biology Evolution **7**(1): 82-102.

Johansson, L. et J. P. Gustafsson (2000). "Phosphate removal using blast furnace slags and opoka-mechanisms." Water Research **34**(1): 259-265.

Juteau, P. (2006). "Review of the use of aerobic thermophilic bioprocesses for the treatment of swine waste." Livestock Science **102**(3): 187-196.

Juteau, P., D. Tremblay, *et al.* (2004a). "Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors." Water Research **38**(3): 539-546.

Juteau, P., D. Tremblay, *et al.* (2004b). "Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste." Applied Microbiology and Biotechnology **66**(1): 115-122.

- Kampfer, P., R. Schulze, *et al.* (2005). "*Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**(1): 341-344.
- Katsoyiannis, I. A. et Z. A. I. (2004). "Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwater." Water Research **38**: 17-26.
- Kong, Y. H., J. L. Nielsen, *et al.* (2005). "Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants." Applied and Environmental Microbiology **71**(7): 4076-4085.
- Kornberg, A., N. N. Rao, *et al.* (1999). "Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions." Annual Review of Biochemistry **68**: 89-125.
- Kostura, B., H. Kulveitova, *et al.* (2005). "Blast furnace slags as sorbents of phosphate from water solutions." Water Research **39**(9): 1795-1802.
- Kuba, T., G. Smolders, *et al.* (1993). "Biological phosphorus removal from waste-water by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor." Water Science and Technology **27**(5-6): 241-252.
- LaPara, T. M. et J. E. Alleman (1999). "Thermophilic aerobic biological wastewater treatment." Water Research **33**(4): 895-908.
- LaPara, T. M., A. Konopka, *et al.* (2000). "Effects of elevated temperature on bacterial community structure and function in bioreactors treating a synthetic wastewater." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **24**(2): 140-145.
- Lee, N., P. H. Nielsen, *et al.* (2003). "Long-term population dynamics and in situ physiology in activated sludge systems with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal." Systematic and Applied Microbiology **26**(2): 211-227.
- Levantesi, C., L. S. Serafim, *et al.* (2002). "Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor." Environmental Microbiology **4**(10): 559-569.
- Liu, W.-T., T. Mino, *et al.* (1996). "Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal." Water Research **30**: 75-82.
- Loy, A., M. Horn, *et al.* (2003). "probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes." Nucleic Acids Research **31**: 514-516.
- Lu, H., A. Oehmen, *et al.* (2006). "Obtaining highly enriched cultures of "*Candidatus Accumulibacter phosphatis*" through alternating carbon sources." Water Research **40**(20): 3838-3848.

Macy, J. M., S. Rech, *et al.* (1993). "*Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the *beta* subclass of *Proteobacteria* with a novel type of anaerobic respiration." International Journal of Systematic Bacteriology **43**(1): 135-142.

Manz, W., M. Wagner, *et al.* (1994). "In-situ characterization of the microbial consortia active in 2 waste-water treatment plants." Water Research **28**(8): 1715-1723.

Martin, H. G., N. Ivanova, *et al.* (2006). "Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities." Nature Biotechnology **24**(10): 1263-1269.

McGrath, J. W. et J. P. Quinn (2003). Microbial phosphate removal and polyphosphate production from wastewaters. San Diego, Academic Press Inc.

McMahon, K. D., M. A. Dojka, *et al.* (2002). "Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal." Applied and Environmental Microbiology **68**(10): 4971-4978.

Metcalf & Eddy, I. (2003). Wastewater Engineering Treatment and Reuse. New York, McGraw Hill.

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

Mino, T., M. C. M. Van Loosdrecht, *et al.* (1998). "Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process." Water Research **32**(11): 3193-3207.

Miyauchi, R., K. Oki, *et al.* (2007). "Diversity of nitrite reductase genes in *Accumulibacter phosphatis* dominant cultures enriched by flow cytometric sorting." Applied and Environmental Microbiology **73**(16): 5331-5337.

Mohaibes, M. et H. Heinonen-Tanski (2004). "Aerobic thermophilic treatment of farm slurry and food wastes." Bioresource Technology **95**(3): 245-254.

Mota, C., M. A. Head, *et al.* (2005a). "Effects of aeration cycles on nitrifying bacterial populations and nitrogen removal in intermittently aerated reactors." Applied and Environmental Microbiology **71**(12): 8565-8572.

Mota, C., J. Ridenoure, *et al.* (2005b). "High levels of nitrifying bacteria in intermittently aerated reactors treating high ammonia wastewater." FEMS Microbiology Ecology **54**(3): 391-400.

Munch, E. V., P. Lant, *et al.* (1996). "Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors." Water Research **30**(2): 277-284.

Murray, R. G. E., R. N. Doetsch, *et al.* (1994). Determinative and cytological light microscopy. In : Gehardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (Eds), Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington, D.C.

- Muyzer, G., E. C. de Waal, *et al.* (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." Applied and Environmental Microbiology **59**(3): 695-700.
- Muyzer, G. et K. Smalla (1998). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **73**(1): 127-141.
- Nakamura, K., A. Hiraishi, *et al.* (1995a). "*Micrococcus phosphovorus* Gen-Nov, Sp-Nov, a new Gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated-sludge." International Journal of Systematic Bacteriology **45**(1): 17-22.
- Nakamura, K., S. Ishikawa, *et al.* (1995b). "Phosphate-uptake and release activity in immobilized polyphosphate-accumulating bacterium *Micrococcus-Phosphovorus* strain Nm-1." Journal of Fermentation and Bioengineering **80**(4): 377-382.
- Obaja, D., S. Mace, *et al.* (2003). "Nitrification, denitrification and biological phosphorus removal in piggery wastewater using a sequencing batch reactor." Bioresource Technology **87**(1): 103-111.
- Oehmen, A., P. C. Lemos, *et al.* (2007). "Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale." Water Research **41**(11): 2271-2300.
- Oehmen, A., A. M. Saunders, *et al.* (2006). "Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources." Journal of Biotechnology **123**(1): 22-32.
- Oehmen, A., M. T. Vives, *et al.* (2005a). "The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms." Water Research **39**(15): 3727-3737.
- Oehmen, A., Z. Yuan, *et al.* (2005b). "Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms." Biotechnology and Bioengineering **91**(2): 162-168.
- Ohno, M., H. Shiratori, *et al.* (2000). "*Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a symbiotic thermophile that depends on co-culture with a *Bacillus* strain for growth." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**(5): 1829-1832.
- Ouattara, A. S., E. A. Assih, *et al.* (2003). "*Bosea minatitlanensis* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an anaerobic digester." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **53**(5): 1247-1251.
- Paerl, H. W., Fulton, III, *et al.* (2001). "Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria." The Scientific World Journal **1**: 76-113.

- Pagilla, K. R., H. Kim, *et al.* (2000). "Aerobic thermophilic and anaerobic mesophilic treatment of swine waste." Water Research **34**(10): 2747-2753.
- Pan, P. T. et C. M. Drapcho (2001). "Biological anoxic/aerobic treatment of swine waste for reduction of organic carbon, nitrogen, and odor." Transactions of the Asae **44**(6): 1789-1796.
- Panswad, T., A. Doungchai, *et al.* (2003). "Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system." Water Research **37**(2): 409-415.
- Parent, G., G. Belanger, *et al.* (2007). "Precipitation of liquid swine manure phosphates using magnesium smelting by-products." Journal of Environmental Quality **36**(2): 557-567.
- Park, H. D., G. F. Wells, *et al.* (2006). "Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors." Applied and Environmental Microbiology **72**(8): 5643-5647.
- Patel, A., A. Gohil, *et al.* (2006). "Parametric study of the factors influencing simultaneous denitrification and enhanced biological phosphorus removal." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **81**(4): 636-647.
- Pedro, M. S., S. Haruta, *et al.* (2003). "Isolation and characterization of predominant microorganisms during decomposition of waste materials in a field-scale composter." Journal of Bioscience and Bioengineering **95**(4): 368-373.
- Pijuan, M., A. M. Saunders, *et al.* (2004). "Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source." Biotechnology and Bioengineering **85**(1): 56-67.
- Pochana, K. et J. Keller (1999). "Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND)." Water Science and Technology **39**(6): 61-68.
- Sakadevan, K. et H. J. Bavor (1998). "Phosphate adsorption characteristics of soils, slags and zeolite to be used as substrates in constructed wetland systems." Water Research **32**(2): 393-399.
- Schuler, A. I. et H. Jang (2007). "Causes of variable biomass density and its effects on settleability in full-scale biological wastewater treatment systems." Environmental Science and Technology **41**(5): 1675-1681.
- Schulze, R., S. Spring, *et al.* (1999). "Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov." Systematic and Applied Microbiology **22**(2): 205-214.
- Seviour, R. J., T. Mino, *et al.* (2003). "The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems." FEMS Microbiology Reviews **27**(1): 99-127.
- Shoji, T., T. Nittami, *et al.* (2006). "Microbial community of biological phosphorus removal process fed with municipal wastewater under different electron acceptor conditions." Water Science and Technology **54**(1): 81-89.

Smolders, G. J. F., J. Vandermeij, *et al.* (1994). "Model of the Anaerobic Metabolism of the Biological Phosphorus Removal Process - Stoichiometry and Ph Influence." Biotechnology and Bioengineering **43**(6): 461-470.

Song, B., L. Y. Young, *et al.* (1998). "Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition." International Journal of Systematic Bacteriology **48**: 889-894.

Spring, S., M. Wagner, *et al.* (2005). "*Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**: 621-629.

Starnaud, S., J. G. Bisailon, *et al.* (1991). "Microbiological aspects of ammonia oxidation of swine waste." Canadian Journal of Microbiology **37**(12): 918-923.

Stein, L. Y. et D. J. Arp (1998). "Loss of ammonia monooxygenase activity in *nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite." Applied and Environmental Microbiology **64**(10): 4098-4102.

Straub, T. M. et I. L. Pepper (1994). "A method to detect enterovirus in sewage sludge-amended soil using the PCR." Applied and Environmental Microbiology **60**(3): 1014-1017.

Streichan, M., J. R. Golecki, *et al.* (1990). "Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal." FEMS Microbiology Ecology **73**(2): 113-124.

Suyama, T., T. Shigematsu, *et al.* (1999). "*Roseateles depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll a-containing obligate aerobe belonging to the beta-subclass of the *Proteobacteria*." International Journal of Systematic Bacteriology **49**(2): 449-457.

Takeuchi, M., N. Weiss, *et al.* (1996). "*Leucobacter komagatae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic gram-positive, nonsporulating rod with 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall." International Journal of Systematic Bacteriology **46**(4): 967-971.

Tanaka, Y., S. Hanada, *et al.* (2004). "*Catellibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **54**(3): 955-959.

Third, K. A., B. Gibbs, *et al.* (2005). "Long-term aeration management for improved N-removal via SND in a sequencing batch reactor." Water Research **39**(15): 3523-3530.

Thompson, J. D., D. G. Higgins, *et al.* (1994). "CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Research **22**: 4673-4680.

Tosques, I. E., A. V. Kwiatkowski, *et al.* (1997). "Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3." Journal of Bacteriology **179**(4): 1090-1095.

Tran, N.-H. (2005). Évaluation de procédés de biofiltration et de boues activées pour compléter l'épuration du lisier de porc à la suite d'un premier traitement aérobie thermophile. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier.

Tremblay, D. (2003). Caractérisation de la flore microbienne d'un bioprocédé aérobie thermophile pour le traitement du lisier de porc. Microbiologie Appliquée. Laval, Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier.

van Loosdrecht, M. C., G. J. Smolders, *et al.* (1997). "Metabolism of micro-organisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. Use of dynamic enrichment cultures." Antonie Van Leeuwenhoek **71**(1-2): 109-116.

Vancanneyt, M., F. Schut, *et al.* (2001). "*Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**(1): 73-79.

Vanotti, M. B., A. A. Szogi, *et al.* (2003). "Extraction of soluble phosphorus from swine wastewater." Transactions of the Asae **46**(6): 1665-1674.

Vargas, V. A., O. D. Delgado, *et al.* (2004). "Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake." Biotechnol Letters **26**(2): 81-86.

Vargas, V. A., O. D. Delgado, *et al.* (2005). "*Bacillus bogoriensis* sp. nov., a novel alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from a Kenyan soda lake." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**(2): 899-902.

Verhille, S., N. Baida, *et al.* (1999). "*Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters." International Journal of Systematic Bacteriology **49**(4): 1559-1572.

Villemur, R., M. Saucier, *et al.* (2002). "Occurrence of several genes encoding putative reductive dehalogenases in *Desulfitobacterium hafniense/frappieri* and *Dehalococcoides ethenogenes*." Canadian Journal of Microbiology **48**(8): 697-706.

Wagner, M., R. Amann, *et al.* (1993). "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure." Applied and Environmental Microbiology **59**(5): 1520-1525.

Wagner, M., R. Erhart, *et al.* (1994). "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge." Applied and Environmental Microbiology **60**(3): 792-800.

Westerman, P. W. et J. R. Bicudo (2002). "Application of mixed and aerated pond for nitrification and denitrification of flushed swine manure." Applied Engineering in Agriculture **18**(3): 351-358.

Wett, B. et W. Rauch (2003). "The role of inorganic carbon limitation in biological nitrogen removal of extremely ammonia concentrated wastewater." Water Research **37**(5): 1100-1110.

WHO (1985). Health hazards from nitrate in drinking water. E. H. 1. Copenhagen.

Wong, M. T. et W. T. Liu (2007). "Ecophysiology of *Defluviicoccus*-related tetrad-forming organisms in an anaerobic-aerobic activated sludge process." Environmental Microbiology **9**(6): 1485-1496.

Wong, M. T., T. Mino, *et al.* (2005). "In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan." Water Research **39**(13): 2901-2914.

Xie, C. H. et A. Yokota (2005). "Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**(6): 2419-2425.

Yabuuchi, E., H. Yamamoto, *et al.* (2001). "Proposal of *Sphingomonas wittichii* sp. nov. for strain RW1T, known as a dibenzo-p-dioxin metabolizer." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**(2): 281-292.

Yagci, N., N. Artan, *et al.* (2003). "Metabolic model for acetate uptake by a mixed culture of phosphate- and glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions." Biotechnology and Bioengineering **84**(3): 359-373.

Yeates, C. et L. L. Blackall (2006). "Construction and analysis of a metagenomic library from an enhanced biological phosphorus removal biomass." Water Science and Technology **54**(1): 277-284.

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

Zeng, R. J., A. M. Saunders, *et al.* (2003b). "Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms." Biotechnology and Bioengineering **83**(2): 140-148.

Zeng, R. J., M. C. M. van Loosdrecht, *et al.* (2003c). "Metabolic model for glycogen-accumulating organisms in anaerobic/aerobic activated sludge systems." Biotechnology and Bioengineering **81**(1): 92-105.

Zhang, P. Y., G. M. Zhang, *et al.* (2007). "Ultrasonic treatment of biological sludge: Floc disintegration, cell lysis and inactivation." Bioresource Technology **98**(1): 207-210.

Zhao, J. S. et O. P. Ward (1999). "Microbial degradation of nitrobenzene and mono-nitrophenol by bacteria enriched from municipal activated sludge." Canadian Journal of Microbiology **45**(5): 427-432.

Zhu, J., Z. Zhang, *et al.* (2006). "A laboratory scale sequencing batch reactor with the addition of acetate to remove nutrient and organic matter in pig slurry." Biosystems Engineering **93**(4): 437-446.

