Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Centre INRS-Institut Armand-Frappier

Étude de la dynamique de dénitrification et de la diversité bactérienne d'un biofilm dénitrifiant en conditions salines

Par

Geneviève Payette

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Jonathan Perreault INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Pascale Beauregard Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

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

© Droits réservés de Geneviève Payette, 9 décembre 2014

REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes remerciements à mon directeur de recherche, le Dr Richard Villemur, pour la qualité de son encadrement, sa grande disponibilité et son ouverture, qui ont fortement contribué à la réussite de ce projet. J'exprime également ma gratitude pour l'aide reçue lors des analyses bioinformatiques, la rédaction de ce mémoire et pour le soutien financier qui m'a permis de me consacrer pleinement à ce projet.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour l'ambiance de travail, le temps, le partage, les discussions constructives et l'entraide que vous m'avez consacrés. Je remercie particulièrement Karla Vazquez qui m'a enseigné la majorité des techniques de laboratoire utilisées dans ce projet et qui était toujours disponible pour m'aider en faisait preuve d'une grande patience lorsque je rencontrai un problème. Je remercie également Florian Mauffrey et Christine Martineau d'avoir répondu à toutes mes interrogations avec implication, intérêt et gentillesse. Votre aide, vos suggestions et votre disponibilité m'ont été précieuses.

À tous les membres du Groupe de recherche en microbiologie de l'environnement (GRME), merci pour le climat d'entraide motivant qui régnait en tout temps au sein du groupe et pour le partage d'expertises et de ressources. Je remercie particulièrement Quentin Liot pour son écoute et ses suggestions intéressantes, Laure Cockenpot pour son aide précieuse les fins de semaine, Sylain Milot pour son aide dans la résolution de problèmes techniques et la formation reçue pour l'utilisation du GC-FID et Claude Guertin pour son aide avec l'utilisation du logiciel SAS.

Finalement, merci à tous mes proches qui m'ont accompagnée et encouragée dans la réalisation de ce projet d'envergure.

RÉSUMÉ

En grande concentration, le nitrate est toxique pour la faune aquatique. Le Biodôme de Montréal utilisait une filière de dénitrification opérée en mode continu pour abaisser la concentration de cet ion dans le mésocosme du St-Laurent marin. La filière était supplémentée en méthanol et contenait des supports colonisés par un biofilm formé d'une quinzaine d'espèces bactériennes endogènes. Deux bactéries méthylotrophes, *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 et *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1, ont été identifiées comme dominantes et responsables de la majeure partie de l'activité dénitrifiante. La souche JAM1 peut réduire le nitrate jusqu'en nitrite alors que la souche NL23 est un dénitrificateur complet. Le dynamisme régissant l'activité dénitrifiante dans le mode d'opération continu se définit comme étant principalement la réduction du nitrate en nitrite par *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et la réduction du nitrate produit jusqu'en azote gazeux par *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23.

Malgré l'utilisation du bioréacteur, les concentrations en nitrate retrouvées dans le mésocosme se maintenaient au-dessus du seuil de toxicité, le biofilm n'offrant pas une performance suffisante. Les membres du laboratoire du Prof. Villemur avec des partenaires de recherche avaient proposé au Biodôme de convertir le mode opératoire de la filière de continu en mode cuvée. Ce projet visait donc à évaluer l'impact du mode cuvée sur la diversité bactérienne et sur la dynamique de dénitrification du biofilm afin de caractériser la dynamique bactérienne régissant le processus de dénitrification et d'optimiser le procédé dénitrifiant.

Pour ce faire, le biofilm récupéré du bioréacteur a été dispersé et cultivé en mode cuvée. Le biofilm a également été confronté aux facteurs physicochimiques suivants présentant un potentiel d'optimisation de l'activité dénitrifiante: des concentrations plus importantes en nitrate (C/N = 1,5), une température d'incubation plus élevée et des concentrations fortes ou faibles en NaCl.

Le taux de dénitrification spécifique s'est avéré être plus de 70 % supérieur lorsque le biofilm s'est développé à 30 °C ou à 0,0 % NaCl, et à près de 35 % supérieur lorsqu'il s'est développé à 0,5 % NaCl. Concernant les hautes concentrations en NaCl, le développement du biofilm et son taux de dénitrification ont été dramatiquement affectés pour des expositions à 5,0 et 8,0 % NaCl. Cependant, un biofilm déjà adapté en concentration d'eau de mer (2,75 % NaCl) n'a démontré aucun ralentissement au niveau de son taux de dénitrification spécifique et aucun changement dans sa communauté bactérienne. Concernant la quantité de nitrate, le taux de dénitrification spécifique est demeuré stable pour une exposition en nitrate (C/N = 1,5) trois fois supérieure.

Dans toutes les conditions de culture du biofilm, des analyses de qPCR ont indiqué que *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 s'est maintenu à un niveau élevé alors qu'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 s'est retrouvé en concentration élevée uniquement lorsque le biofilm a été cultivé dans un milieu pauvre en NaCl (0,0 et 0,5 %) ou dans le milieu Instant Ocean® salt mix. L'espèce s'est retrouvée en concentration drastiquement plus faible lorsque le biofilm a été cultivé dans les autres conditions. Malgré sa quasi-absence, une dénitrification complète s'est opérée dans toutes les conditions étudiées, supposant que la réduction du nitrite a pu être prise en charge par au moins une autre espèce de la communauté.

Pour toutes les conditions testées, hormis la culture dans de fortes concentrations en NaCl, des études de pyroséquençage ciblant le biofilm adapté au mode cuvée ont révélé que de 20 à 40 espèces composaient le biofilm selon la condition de culture et que la souche JAM1 dominait dans toutes les conditions analysées en représentant de 85 à 97 % des séquences associées à la population du biofilm. Également, hormis la culture à 0,0 % NaCl où il représente 0,24 % des séquences, le genre *Marinicella* s'est avéré présent dans toutes les conditions testées en concentration plus élevée que les autres espèces mineures, passant de 1 à 5 % des séquences issues de la communauté selon les paramètres de culture. Des séquences affiliées à des genres dont certains de leurs membres ont été associés au processus de dénitirifcation ont été retrouvées tels *Winogradskyella*, *Pseudomonas* et *Stappia*. Le biofilm a été ensuite cultivé sur différents milieux de culture pour obtenir des isolats ayant une activité dénitrifiante. Ainsi, des isolats appartenant aux genres *Marinobacter*, *Paracoccus*, *Rhodovulum* et *Roseobacter* ont été obtenus avec la capacité de dénitrification complète. Également, un isolat associé à la souche

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 qui a un pouvoir de dénitrification complète a été isolé.

Étudiante

Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

RI	EMERC	IEMENTS	II
RÍ	ÉSUMÉ.		III
TA	TABLE DES MATIÈRES V		
LI	STE DE	S TABLEAUX	IX
LI	STE DE	S FIGURES	XI
LI	STE DE	S ABRÉVIATIONS	1
1 INTRODUCTION		INTRODUCTION	3
2		REVUE DE LITTERATURE	5
	2.1	SURVOL DU CYCLE DE L'AZOTE	5
	2.2	RESPIRATION CELLULAIRE	6
	2.3	DENITRIFICATION	7
	2.3.1	Enzymes impliquées dans la dénitrification	8
	2.3.2	Dénitrification autotrophique et hétérotrophique	11
	2.3.3	La dénitrification pour contrer l'accumulation d'ions nitrate	12
	2.4	CARACTERISTIQUES DES BIOFILMS	13
	2.4.1	Développement d'un biofilm bactérien en cinq étapes	14
	2.4.2	Organisation d'un biofilm	16
	2.5	LA FILIERE DE DENITRIFICATION OPEREE EN MODE CONTINU AU BIODOME DE MONTREAL	17
	2.5.1	Analyse de la diversité microbienne	19
	2.5.2	Identification des méthylotrophes dénitrifiants	22
	2.5.3	Les espèces dominantes Hyphomicrobium nitrativorans NL23 et Methylophaga	
	nitrat	ireducenticrescens JAM1	25
	2.6	LE MODE D'OPERATION CUVEE	27
3		MATERIEL ET METHODE	29
	3.1	CULTURE DU BIOFILM EN MODE CUVEE	29
	3.1.1	Milieux de culture et conditions de croissance	29
	3.1.2	Acclimatation au mode cuvée : inoculation et repiquages	30
	3.1.3	Culture du biofilm pour l'étude de l'influence de la variation de paramètres physicochimiques	31
	3.2	SUIVI DE L'EVOLUTION DE LA POPULATION BACTERIENNE PRESENTE AU SEIN DU BIOFILM	33
	3.2.1	Extraction de l'ADN total du biofilm	34

3.2.2	Réaction en chaine par polymérase (PCR)	36
3.2.3	Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)	37
3.3	QUANTIFICATION DE METHYLOPHAGA NITRATIREDUCENTICRESCENS JAM1 ET HYPHOMICROBIUM	
	NITRATIVORANS NL23	
3.3.1	PCR quantitative (qPCR)	40
3.4	ACTIVITE DENITRIFIANTE DU BIOFILM	43
3.4.1	Suivi de la réduction du nitrate et du nitrite par chromatographie ionique	43
3.4.2	Méthode de Bradford	44
3.4.3	Calcul du taux de dénitrification spécifique	46
3.4.4	Test statistique ANOVA sur le taux de dénitrification spécifique	46
3.5	ANALYSE DU METAGENOME 16 S	47
3.6	ISOLATS PROVENANT DU BIOFILM CULTIVE EN MODE CUVEE POUR 5 REPIQUAGES	48
3.6.1	Milieux de culture choisis	48
3.6.2	Méthodologie de culture et d'incubation pour l'obtention d'isolats	50
3.6.3	Analyse de l'activité dénitrifiante	53
3.6.4	Identification et conservation des isolats	54
	RESULTATS	56
4.1	CULTURE DU BIOFILM EN MODE CUVEE: CULTURE DE REFERENCE	56
4.2	INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE	60
4.3	INFLUENCE DE PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES SUR L'ACTIVITE DENITRIFIANTE DU BIOFILM	64
4.3.1	Liste des paramètres physicochimiques testés sur les supports de deuxième génération en fonct	ion
des re	epiquages	65
4.3.2	Suivi de la population bactérienne des supports de deuxième génération	65
4.3.3	Influence de la concentration en nitrate et en méthanol ($C/N = 1,5$)	67
4.3.4	Influence de la concentration en méthanol (C/N variable)	
4.3.5	Influence de la concentration en nitrate (C/N variable)	73
4.3.6	Influence du pH du milieu de culture	76
4.3.7	Influence de la température d'incubation	79
4.3.8	Influence de la salinité du milieu de culture	81
4.3.9	Résumé de l'étude préliminaire portant sur l'influence des paramètres physicochimiques	84
4.4	ADAPTATION A DE FORTES CONCENTRATIONS EN NACL	86
4.5	ADAPTATION A DE FAIBLES CONCENTRATIONS EN NACL	93
4.6	Adaptation a des temperatures et/ou a des concentrations en nitrate (C/N = 1,5)	
	ELEVEES	99
4.7	Étude du metagenome des genes de l'ARNr 16S sur le biofilm adapte a des	
	TEMPERATURES ET A DES CONCENTRATIONS EN NITRATE ($C/N = 1,5$) elevees ainsi qu'a de	
	FAIBLES CONCENTRATIONS DE NACL	105

4

	4.8	ISOLEMENT DU BIOFILM D'ISOLATS AVEC UNE ACTIVITE DENITRIFIANTE	108
5		DISCUSSION	112
	5.1	L'OPERATION EN MODE CUVEE SELON LE TYPE DE MILIEU DE CULTURE	112
	5.2	ÉTUDE PRELIMINAIRE SUR LA VARIATION DE PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES	117
	5.2.1	Influence de la concentration en nitrate et en méthanol ($C/N = 1,5$)	118
	5.2.2	Influence du ratio C/N	120
	5.2.3	Influence du pH	124
	5.2.4	Influence de la température	125
	5.3	INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN NACL	126
	5.4	Adaptation a des temperatures et/ou a des concentrations en nitrate ($C/N = 1,5$)	
		ELEVEES	131
	5.5	Étude du metagenome des genes de l'ARNr 16S sur le biofilm adapte a des	
		TEMPERATURES ET A DES CONCENTRATIONS EN NITRATE ($C/N = 1,5$) elevees ainsi qu'a de	
		FAIBLES CONCENTRATIONS DE NACL	132
	5.6	IDENTIFICATION DES ISOLATS	136
6		CONCLUSION	140
RÉFÉRENCES142			
AN	NEXES		152

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1	Amorces utilisées pour l'amplification PCR de la région V3 du gène de l'ARN	[
ribosoma	ıl 16S	. 36	
Tableau 3.2	Paires d'amorces utilisées pour créer la courbe standard de qPCR chez		
Methylop	haga nitratireducenticrescens JAM1 et Hyphomicrobium nitrativorans NL23	. 41	
Tableau 3.3	Paires d'amorces spécifiques utilisées pour la quantification de Methylophaga		
nitratired	ducenticrescens JAM1 et Hyphomicrobium nitrativorans NL23, dans les		
échantille	ons d'ADN provenant du biofilm, par qPCR	. 42	
Tableau 3.4	Amorces utilisées pour l'amplification de gène codant pour l'ARNr 16S par		
PCR		. 55	
Tableau 4.1	Taux de dénitrification spécifique moyen de la culture de référence.	. 60	
Tableau 4.2	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm adapté aux milieux EMS	et	
ΙΟ		. 64	
Tableau 4.3	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à diverses		
concentra	ations de nitrate ($C/N = 1,5$)	. 69	
Tableau 4.4	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à diverses		
concentra	ations de méthanol (C/N variable)	. 72	
Tableau 4.5	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à diverses		
concentra	ations en nitrate (C/N variable)	. 75	
Tableau 4.6	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à différents pH	. 78	
Tableau 4.7	Mesure du pH en début et en fin de cinétique de dénitrification	. 78	
Tableau 4.8	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à différentes		
températ	ures	. 81	
Tableau 4.9	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à différentes		
concentra	ations de NaCl	. 83	
Tableau 4.10	Sommaires des résultats préliminaires de l'influence des paramètres		
physicoc	physicochimiques		
Tableau 4.11	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm adapté à diverses		
concentra	ations fortes en NaCl	. 92	

Tableau 4.12	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm adapté à des		
concentratio	ons faibles en NaCl	98	
Tableau 4.13	Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm adapté à des température	S	
et/ou à des	et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées		
Tableau 4.14	Activités dénitrifiantes des isolats obtenus du biofilm sur le Milieu Marin		
2216		09	
Tableau 4.15	Activités dénitrifiantes des isolats obtenus du biofilm sur les milieux 1403,		
EMS et R2A			

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Principales étapes du cycle de l'azote	6
Figure 2.2	Enzymes membranaires ou périplasmiques impliquées dans la dénitrification	10
Figure 2.3 Développement d'un biofilm en cinq étapes.		16
Figure 2.4	Mode d'opération continu au Biodôme de Montréal (A) et mode d'opération	
cuvée en	laboratoire (B)	23
Figure 2.5	Interactions possibles entre les souches JAM1 et NL23	27
Figure 3.1	Système d'adaptation de la biomasse en provenance du Biodôme de Montréal au	l
mode cu	vée jusqu'à cinq repiquages	31
Figure 3.2	Développement et adaptation du biofilm au mode cuvée sur les supports de	
première	et de deuxième génération.	32
Figure 3.3	Appareillage nécessaire à la réalisation du gel en gradient dénaturant.	38
Figure 3.4	Méthodologie de culture et d'incubation pour l'obtention d'isolats purs et	
l'analyse	de leur potentiel dénitrifiant	53
Figure 3.5	Méthodologie de culture pour la conservation et l'extraction d'ADN pour le	
séquençage des isolats dont l'activité dénitrifiante avait été testée préalablement		
Figure 4.1	Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne lors de l'adaptation du	
biofilm p	our la culture de référence	57
Figure 4.2	Quantification de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 et	
d'Hypho	microbium nitrativorans NL23 par qPCR sur la culture de référence	58
Figure 4.3 Réduction de nitrate, de nitrite et de l'azote total (NO _x) réalisée par la culture		
référence	5	59
Figure 4.4	Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne lors de l'adaptation du	
biofilm c	lans le milieu EMS (A) et IO (B)	51
Figure 4.5	Quantification par qPCR de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 (A) e	t
d'Hypho	microbium nitrativorans NL23 (B) dans le biofilm adapté aux milieux EMS et	
IO		52
Figure 4.6	Activités dénitrifiantes du biofilm adapté aux milieux EMS et IO	53
Figure 4.7	Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne des supports de premièr	·e
génératio	on (PG) et de deuxième génération (DG)	56

Figure 4.8	Quantification de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 et
d' <i>Hypho</i>	microbium nitrativorans NL23 par qPCR sur les supports de première génération
(PG) et d	le deuxième génération (DG)
Figure 4.9	Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à diverses concentrations de nitrate
(C/N = 1)	,5)
Figure 4.10	Activités dénitrifiantes du biofilm exposé 3 000 mg-N L ⁻¹ de nitrate
(C/N = 1)	,5)
Figure 4.11	Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à diverses concentrations de méthanol
(C/N var	iable)
Figure 4.12	Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à 0,0 % de méthanol (C/N = 0,0) 72
Figure 4.13	Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à diverses concentrations en nitrate
(C/N var	iable)
Figure 4.14	Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à 3 000 mg-N L^{-1} de nitrate (C/N =
0,15)	
Figure 4.15	Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à différents pH77
Figure 4.16	Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à différentes températures
Figure 4.17	Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à différentes concentrations de
NaCl	
Figure 4.18	Profils migratoires PCR-DGGE lors de l'adaptation du biofilm en conditions
hautement salines	
Figure 4.19	Quantification de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 (A) et
d' <i>Hypho</i>	microbium nitrativorans NL23 (B) par qPCR dans le biofilm adapté à diverses
concentra	ations fortes en NaCl
Figure 4.20	Quantification de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 et
d' <i>Hypho</i>	microbium nitrativorans NL23 par qPCR dans le biofilm cultivé dans 5,0 % NaCl
R8	
Figure 4.21	Activités dénitrifiantes du biofilm adapté à différentes concentrations fortes en
NaCl	
Figure 4.22	Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne lors de l'adaptation du
biofilm c	lans diverses concentrations faiblement salées

Figure 4.23	Quantification de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 (A) et	
d'Hypho	microbium nitrativorans NL23 (B) par qPCR dans le biofilm adapté à diverses	
concentra	ations faibles en NaCl	
Figure 4.24	Activités dénitrifiantes du biofilm adapté des concentrations faibles en NaCl 97	
Figure 4.25	Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne lors de l'adaptation du	
biofilm à	300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5) et incubé à $30 {}^{0}$ C	
Figure 4.26	Quantification de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 (A) et	
d' <i>Hypho</i> l	microbium nitrativorans NL23 (B) par qPCR dans le biofilm adapté à des	
températ	ures et/ou à des concentrations en nitrate ($C/N = 1,5$) élevées	
Figure 4.27 Activités dénitrifiantes du biofilm adapté à des températures et/ou à des		
concentra	ations en nitrate (C/N = 1,5) élevées	
Figure 4.28	Taux de dénitrification spécifique moyen réalisé par le biofilm adapté à des	
températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées		
Figure 4.29	Affiliations les plus probables des séquences des gènes de l'ARNr 16S issues du	
biofilm adapté à des températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées		
et à des concentrations faibles en NaCl		

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
DGGE	Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EMS	Eau de mer synthétique
EPS	Substance polymérique extracellulaire
FISH	Hybridation in situ en fluorescence
g	Force-G
g	Gramme
Gb	Giga bases
GLM	Modèle linéaire généralisé
IO	Instant Ocean® salt mix
L	Litre
MAR-FISH	Microautoradiographie et FISH
mg	Milligramme
min	Minute(s)
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
MM	Milieu Marin 2216
nm	Nanomètre
pb	Paires de bases
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
pmol	Picomole
PSI	Livre par pouce carré
p/v	Poids par volume
RPM	Révolutions par minute

SDS	Dodécylsulfate de sodium
SIP	Stable isotope probing
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
U	Unité
UV	Lumière ultraviolette
V	Volt
v/v	Volume par volume
μg	Microgramme
μL	Microlitre
μm	Micromètre

1 INTRODUCTION

Le nitrate est une forme de l'azote naturellement présente dans le sol et l'eau. L'ion est produit, par exemple, par la nitrification, une branche du cycle de l'azote, ou encore par la décomposition microbienne. En environnements aqueux naturels, une concentration maximale de $0,7 \text{ mg-N L}^{-1}$ de NO₃⁻ est atteinte (Milero *et al.*, 1992). Dès une exposition à 2,5 mg-N L⁻¹ de NO₃⁻, l'ion engendre des malformations néfastes chez certains amphibiens (Rousse *et al.*, 1999). Une concentration supérieure à 20 mg-N L⁻¹ de NO₃-, s'avère toxique et affecte négativement le développement de la faune marine en général (Camargo *et al.*, 2005).

Le Biodôme de Montréal abrite plusieurs espèces d'oiseaux, de poissons et d'invertébrés dans un mésocosme opéré en circuit fermé de 3 millions de litres d'eau de mer artificielle qui représente l'estuaire du golfe du fleuve St-Laurent. Une accumulation maximale de 180 mg-N L⁻¹ de NO_3^- a été enregistrée dans le mésocosme, quantité bien au-delà du seuil de toxicité le plus permissif. Pour pallier à ce problème, le Biodôme a implanté en 1998 une filière de dénitrification à lit fluidisé, nourrie au méthanol et opérée en mode continu pour traiter l'eau du mésocosme. Des supports de plastique contenus à l'intérieur de la filière de dénitrification permettaient la colonisation par des microorganismes présents naturellement dans l'eau à traiter et le développement d'un biofilm dénitrifiant. Malheureusement, l'activité dénitrifiante de la filière n'a jamais atteint des performances permettant de diminuer adéquatement la concentration en nitrate. Une équipe de recherche, pilotée par Richard Villemur de l'INRS et Yves Comeau de l'École Polytechnique de Montréal, a suggéré le remplacement du mode continu par un mode cuvée pour l'opération de la filière de dénitrification (rapport interne). Malgré les essais prometteurs en unités pilotes (Dupla et al., 2006 et Labelle et al., 2005) et les ajustements subséquents sur la filière, l'activité dénitrifiante ne s'est jamais installée dans le réacteur. Conséquemment à cette inefficacité, le Biodôme de Montréal a décidé en 2007 de démanteler la filière, et poursuit actuellement un protocole couteux de changement d'eau (eau de mer artificielle) pour contrôler le nitrate de son bassin.

La biomasse du dénitrificateur opéré en mode continu a été préservée pour des études ultérieures par le laboratoire du Prof. Villemur. Les études microbiennes ont montré que le biofilm était composé d'une vingtaine d'espèces bactériennes (Labbé *et al.*, 2003 et 2007). Parmi ces espèces, deux bactéries méthylotrophes, *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 et *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1, représentaient plus de 80 % du biofilm et étaient associées à la majeure partie de l'activité dénitrifiante. À l'heure actuelle, le laboratoire du Prof. Villemur étudie activement ces deux souches.

Comme mentionnés plus haut, des bancs d'essai opérés en mode cuvée ont déjà été étudiés en employant les supports colonisés en mode continu au Biodôme de Montréal et avaient démontré un potentiel de dénitrification intéressant. L'échec de l'implantation d'un biofilm dénitrifiant dans le dénitrificateur a fait ressortir le besoin d'une étude plus approfondie de la microbiologie sur les conditions de culture associées au mode cuvée.

Le projet de recherche reposait sur l'hypothèse suivante : le mode d'opération cuvée a une incidence sur la population microbienne, tant sur son taux de dénitrification que sa composition. L'objectif général visait donc à étudier à l'échelle du laboratoire la cinétique de dénitrification du biofilm dénitrifiant provenant du bioréacteur du Biodôme de Montréal, en mode cuvée et à évaluer l'incidence de ce mode sur la population bactérienne du biofilm. Pour se faire, les objectifs spécifiques suivants ont été étudiés : (1) Adapter le biofilm au mode cuvée; (2) Varier plusieurs paramètres physicochimiques pouvant influencer la performance de l'activité dénitrification du biofilm. Pour ces deux objectifs, l'incidence du mode cuvée sur le taux de dénitrification du biofilm, sur la population bactérienne et sur la concentration des souches *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 a été mesurée. Dans un troisième objectif, nous avons voulu isoler du biofilm adapté en mode cuvée des isolats directement impliqués dans la dénitrification.

2 **REVUE DE LITTÉRATURE**

2.1 Survol du cycle de l'azote

L'azote est un élément chimique essentiel à plusieurs processus biologiques. Son assimilation permet son incorporation dans la biomasse en entrant, par exemple, dans la composition des acides nucléiques et des acides aminés. Sa dissimilation permet un apport d'énergie par la respiration où un composé azoté peut servir d'oxydant ou de réductant (Thamdrup, 2012). L'atmosphère est constituée de près de 80 % de diazote et en est la principale source (Martinez-Espinosa *et al.*, 2011). Le cycle de l'azote est réalisé tant dans l'eau (milieu naturel ou aquarium) que dans le sol. Entre l'atmosphère, la géosphère et l'hydrosphère, l'azote passe par plusieurs transformations microbiennes favorisant son accessibilité et son recyclage en prenant la forme d'un cycle biogéochimique séparé principalement en trois grandes parties (Thamdrup, 2012). Ces dernières sont représentées à la figure 2.1.

Le cycle de l'azote débute par une étape de fixation ($N_2 \rightarrow NH_3$) qui brise la triple liaison liant les deux atomes d'azote. Ce processus est pris en charge par certaines bactéries et cyanobactéries possédant une nitrogénase (Ricklefs *et al.*, 2005). Comme il est très énergétique, il n'est pratiquement jamais réalisé dans les environnements où une autre forme d'azote est déjà présente. L'apparition d'ammoniac dans un milieu peut aussi provenir de l'action de décomposeurs (bactéries ou champignons) qui récupèrent l'azote que contiennent les déjections ou la matière organique morte, comme c'est le cas pour les aquariums publics (Pagni, 1998). La nitrification ($NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$) suit la fixation et est un processus aérobie divisé en deux étapes réalisées par deux groupes de microorganismes génétiquement distincts (le plus souvent des bactéries). Généralement, les microorganismes impliqués ne possèdent qu'une des deux enzymes nécessaires au passage de l'ammoniac en nitrate (Thamdrup, 2012). Le nitrate est finalement pris en charge par la dénitrification ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$), un procédé respiratoire généralement anaérobie effectué par plusieurs types de microorganismes, qui permet le retour de l'azote dans l'atmosphère sous forme de diazote (Thamdrup, 2012).



Figure 2.1 Principales étapes du cycle de l'azote. Tirée de Pagni, 1998.

2.2 **Respiration cellulaire**

Les procaryotes et eucaryotes effectuent la respiration cellulaire afin d'obtenir l'énergie nécessaire à leur bon fonctionnement. La respiration peut être aérobie ou anaérobie. Lors de la respiration aérobie, un composé organique constituant une source d'électrons est métabolisé en glucose puis en pyruvate par l'intermédiaire d'une voie métabolique adaptée (voie Embden-Meyerhof-Parnas, voie des pentoses phosphates, voie Entner-Doudoroff, etc.) (Prescott *et al.*, 2003). Le pyruvate entre ensuite dans le cycle de Krebs qui produit des molécules de NADH et FADH₂ riches en électrons. Ces coenzymes donnent leurs électrons à une série de transporteurs, situés dans la membrane plasmique, qui forment la chaîne de transport d'électrons. Via des réactions d'oxydoréduction, les électrons sont transportés dans la chaîne jusqu'à l'oxygène qui est l'accepteur final d'électrons (Prescott *et al.*, 2003). Le passage des électrons dans la chaîne de transport mène à la création d'un gradient transmembranaire de protons qui passent par l'ATP synthase qui génère de l'ATP en phosphorylant l'ADP. La chaîne de transport d'électrons, couplée à la phosphorylation oxydative, génère la majeure partie des 36 molécules d'ATP par molécule de glucose issue de la respiration cellulaire aérobie (Prescott *et al.*, 2003).

Certains microorganismes sont en mesure d'effectuer la respiration en conditions anaérobies en utilisant un accepteur final d'électrons autre que l'oxygène, dont les plus communs sont le nitrate, le sulfate et le dioxyde de carbone (Prescott *et al.*, 2003). La respiration anaérobie suit donc les mêmes étapes que la respiration aérobie, à l'exception de l'accepteur final d'électron. La respiration anaérobie est moins énergétique que la respiration aérobie étant donnée la différence de potentiel de réduction qui est moins grande en comparaison avec l'oxygène, menant à une production plus faible d'ATP.

2.3 Dénitrification

La dénitrification s'opère en conditions anaérobies et est accomplie par une grande diversité de microorganismes biochimiquement et taxonomiquement différents, comprenant des bactéries, des archées et des eucaryotes (Kraft *et al.*, 2011). Elle a toutefois été étudiée le plus en profondeur chez les protéobactéries. C'est un processus respiratoire dissimilatoire qui permet la génération d'ATP suite au passage d'électrons dans la chaîne de transport membranaire, lesquels sont acceptés au final par un composé azoté tel le nitrate, plutôt que par l'oxygène (Zumft, 1997). Permettant de boucler le cycle de l'azote, une dénitrification complète mène à la réduction de nitrate en azote gazeux selon l'équation suivante : $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$. Ainsi, la dénitrification est le couplage modulaire subséquent de la respiration sur le nitrate, la respiration sur le nitrite, la réduction de l'oxyde nitrique et la respiration sur l'oxyde nitreux, où chacun de ces trois processus respiratoires maintient un certain degré d'indépendance (Zumft, 1997). Quatre enzymes périplasmiques ou cytoplasmiques permettent la conversion entre ces divers composés azotés : la nitrate réductase, la nitrite réductase, l'oxyde nitrique réductase et l'oxyde nitreux réductase.

Plusieurs généralités s'appliquent à la dénitrification. Premièrement, chacune des quatre enzymes impliquées nécessite une dizaine de gènes groupés dans le génome d'un organisme dénitrifiant et prenant souvent la forme d'opéron (Zumft, 1997). Ces gènes codent, entre autres, pour les petites et les grandes sous-unités de l'enzyme catalytique et les protéines d'assemblages et de localisation. Au total, environ 50 gènes sont requis chez un organisme pour lui permettre d'accomplir une dénitrification complète (Zumft, 1997). Deuxièmement, la dénitrification est un

processus régulé initialement par la présence de nitrate et d'oxygène (Darwin et al., 1998). En effet, les gènes codant pour la nitrate réductase ne sont exprimés qu'en présence de nitrate (Zumft, 1997). Des senseurs membranaires de type NarX ou NarQ détectent le nitrate et phosphorylent ensuite les régulateurs NarL et NarP qui se lient en amont du groupe de gènes impliqués dans la réduction de nitrate pour y induire la transcription. La dénitrification étant effectuée principalement par des anaérobies facultatifs, ces derniers, en présence d'oxygène, utilisent cet élément chimique en premier ce qui assure une respiration plus efficace leur rapportant plus d'énergie. C'est un régulateur transcriptionnel de type FNR qui détecte la concentration en oxygène dans l'environnement du microorganisme dénitrifiant (Darwin et al., 1998). Ce dernier est continuellement exprimé et inactivé par la présence d'oxygène. Lorsque peu ou pas d'oxygène est présent dans l'environnement, le régulateur FNR devient actif et se lie devant plusieurs groupes de gènes impliqués dans la dénitrification pour y induire la transcription (Darwin et al., 1998). Troisièmement, bien que la réduction dissimilatoire et la réduction assimilatoire du nitrate possèdent la même première étape de conversion du nitrate en nitrite, les deux processus sont assurés par des enzymes différentes et peuvent être effectués simultanément (Zumft, 1997).

Parmi ces trois caractéristiques associées aux microorganismes dénitrifiants, plusieurs exceptions sont toutefois relevées. Ce phénomène est principalement causé par la grande diversité de microorganismes qui possèdent une activité dénitrifiante partielle ou complète. Ces derniers ne partagent pas toujours des similitudes au niveau physiologique ou phylogénétique.

2.3.1 Enzymes impliquées dans la dénitrification

Les nitrate réductases dissimilatoires comprennent 2 à 3 sous-unités. Le groupement de gènes de type *nar* code pour une nitrate réductase ancrée dans la membrane plasmique (Fig. 2.2) par la sous-unité NarI qui reçoit des électrons en provenance d'une quinone membranaire et les transmet à la sous-unité NarH adjacente (Kraft *et al.*, 2011). La sous-unité NarH contient quatre groupements Fe-S qui transfèrent les électrons au même groupement sur la sous-unité NarG. Cette dernière contient un cofacteur à molybdène, le site actif où le nitrate est réduit en nitrite, qui reçoit finalement les électrons (Kraft *et al.*, 2011). Chez certaines bactéries, la réduction du

nitrate est assurée par un groupement de gènes de type *nap*. Les sous-unités NapA et NapB contiennent un peptide signal les localisant dans l'espace périplasmique (Zumft, 1997). NapA est une grande sous-unité comprenant aussi un cofacteur à molybdène et un centre à 4Fe-4S. La sous-unité NapB est un cytochrome c impliqué dans le transfert d'électrons jusqu'à la sous-unité catalytique où le nitrate est réduit en nitrite (Zumft, 1997). Les électrons sont acheminés de la membrane à la réductase par la sous-unité NapC. Certains microorganismes possèdent les deux types de réductases fonctionnelles dans leur génome, à l'exemple de *R. eutropha* (Zumft, 1997). Les microorganismes pouvant seulement effectuer la réduction du nitrate en nitrite sont considérés comme étant des respirateurs de nitrate. Ceux pouvant réduire le nitrate jusqu'en azote gazeux sont considérés comme étant des dénitrificateurs complets.

Il existe également deux types de nitrite réductases périplasmiques, codées par un groupement de gènes de type *nir*, qui peuvent être impliquées dans la dénitrification (Fig. 2.2). L'enzyme NirK contient deux centres de cuivre de type 1 et 2. Les électrons sont transférés du centre de cuivre de type 1 au centre de cuivre de type 2 où le nitrite peut se lier pour y être réduit en oxyde nitrique (Kraft *et al.*, 2011). L'enzyme NirS possède deux cytochromes cd1 liant l'hème c ou l'hème d. Les électrons sont reçus à l'hème c qui les transfère à l'hème d, où le nitrite se lie pour être réduit en oxyde nitrique. Jusqu'ici, aucun microorganisme n'a été découvert possédant les deux types d'enzymes (Zumft, 1997). Également, dépendamment de l'emplacement des enzymes impliquées dans la dénitrification, le nitrate et le nitrite traversent la membrane plasmique pour atteindre le périplasme ou le cytoplasme via des protéines membranaires de type antiport (Zumft, 1997).

Comme l'oxyde nitrique produit par les nitrite réductases est très réactif et toxique, ce dernier ne s'accumule jamais longtemps dans l'environnement bactérien. Sa réduction est assurée par une oxyde nitrique réductase membranaire (Fig. 2.2), codée par des gènes de type *nor*, qui est co-régulée avec la réduction du nitrite (Kraft *et al.*, 2011). La réductase est formée des sousunités NorB et NorC. La sous-unité NorC est un cytochrome c qui transfère les électrons à NorB qui est la sous-unité catalytique de type cytochrome b où l'oxyde nitrique est réduit en oxyde nitreux. Cette sous-unité catalytique pointe vers l'espace périplasmique (Kraft *et al.*, 2011) et Zumft, 1997). Certaines oxyde nitrique réductases ne possèdent pas la sous-unité NorC et l'unité catalytique reçoit ces électrons d'une quinone membranaire. Selon la provenance des électrons qu'elle accepte, soit le cytochrome c ou une quinone, la réductase est respectivement désignée cNorB ou qNorb (Braker *et al.*, 2003).

L'oxyde nitreux réductase NosZ est une enzyme périplasmique codée par un groupement des gènes de type *nos* (Fig. 2.2). C'est un homodimère possédant deux centres de cuivre par monomère dits Cu_z et Cu_A . Le site Cu_A d'un monomère permet l'entrée des électrons et les transfère au site Cu_z de l'autre monomère. Le site Cu_z est un centre catalytique, où l'oxyde nitreux est réduit en diazote, qui contient quatre atomes de cuivre liés par sept résidus d'histidine et un atome de soufre (Braker *et al.*, 2003).



Figure 2.2 Enzymes membranaires ou périplasmiques impliquées dans la dénitrification. Adaptée de Paustian, 2000. AP : Antiport, DH : NADH dehydrogénase, NAR : nitrate réductase, NIR : nitrite réductase, NOR : oxyde nitrique réductase, N₂OR : oxyde nitreux réductase. Pour chaque enzyme impliquée dans la dénitrification, la sous-unité catalytique est celle marquée d'une flèche noire courbée.

2.3.2 Dénitrification autotrophique et hétérotrophique

La dénitrification autotrophique est assurée par des organismes chimiolithotrophes comme *Thiobacillus denitrificans* et *Thiomicrospira denitrificans* (Koenig *et al.*, 2004). Elle ne requiert généralement pas l'ajout d'une source de carbone dans le milieu et est donc peu couteuse. Elle s'effectue sur une source de carbone inorganique comme le dioxyde de carbone ou le bicarbonate (Zhao *et al.*, 2011). Les électrons proviennent de donneurs inorganiques à l'exemple du sulfure d'hydrogène, du soufre et du thiosulfate. La dénitrification autotrophique génère peu de biomasse et est souvent moins efficace que la dénitrification hétérotrophique (Zhao *et al.*, 2011).

La dénitrification hétérotrophique requiert l'ajout d'une source de carbone organique au milieu de culture qui constitue la source d'électrons une fois métabolisée. Le méthanol, l'éthanol, le glucose, le glycérol, l'acide acétique et l'acide lactique en sont des exemples (Zhao *et al.*, 2011). Elle est réalisée entre autres par des chimioorganohétérotrophes comme *Pseudomonas stutzeri* et *Paracoccus denitrificans*. Ce type de dénitrification est très efficace et peut permettre une croissance accrue et rapide aux microorganismes, selon la source de carbone utilisée. Cet excédant de biomasse est toutefois à surveiller puisqu'il peut entrainer des problèmes de colmatage au niveau des bioréacteurs (Zhao et *al.*, 2011). Également, certaines des sources de carbone ajoutées ou des sous-produits issus de leur métabolisme peuvent rester dans l'eau traitée et y être toxiques, impliquant d'autres méthodes de traitement pour les éliminer (Zhao et *al.*, 2011).

Tant la dénitrification autotrophique que la dénitrification hétérotrophique peuvent être utilisées dans un bioréacteur. Il n'est pas rare que les deux types de dénitrification y soient combinés. Certains bioréacteurs exploitent effectivement la dénitrification hétérotrophique en ajoutant une source de carbone organique à l'eau à traiter et le dioxyde de carbone produit par le métabolisme de microorganismes impliqués est utilisé par ceux supportant la dénitrification autotrophique (Zhao et *al.*, 2011). Dans certains bioréacteurs, les deux populations de microorganismes se trouvent dans des compartiments distincts alors que dans d'autres, ils cohabitent dans le même espace sans barrière (Zhao *et al.*, 2011).

2.3.3 La dénitrification pour contrer l'accumulation d'ions nitrate

En concentrations élevées, le nitrate devient toxique pour plusieurs formes de vie aquatiques. La toxicité de l'ion nitrate est principalement causée par la conversion de l'hémoglobine en méthémoglobine qu'il engendre lorsqu'il est réduit en nitrite. Cette conversion est provoquée par l'oxydation de l'atome de fer ferreux contenu dans l'hémoglobine en fer ferrique par le nitrite. La méthémoglobine, qui ne peut plus lier l'oxygène, altère ainsi son transport dans l'organisme, phénomène pouvant être mortel. En grande quantité, l'ion nitrate favorise également le développement d'infections parasitaires chez la faune marine conséquemment à un affaiblissement du système immunitaire (Parent *et al.*, 2000).

Plusieurs facteurs contribuent à la fréquente augmentation de concentrations en nitrate supérieures au seuil de toxicité dans les aquariums à circuit fermé. Premièrement, l'accumulation de nitrate provient en partie des déjections de la faune marine dans l'eau. Ces déjections sont dégradées en ammonium puis oxydées en ions nitrate par des microorganismes naturellement présents. Également, pour éviter les relations de prédations, une source exogène de nourriture riche en nitrate est ajoutée quotidiennement au bassin. Finalement, les aquariums possèdent généralement un excédent de poissons et autres organismes aquatiques et une minorité de consommateurs de nitrate, à l'exemple des algues (Pagni, 1998).

Plusieurs technologies peuvent être employées pour le traitement d'eau contaminée en ions nitrate, tels l'osmose inverse, l'échange ionique et l'électrodialyse. Elles comportent plusieurs désavantages concernant la disposition responsable des déchets hautement contaminés en nitrate, l'exigence d'opérateurs qualifiés nécessaires au maintien et à l'opération des systèmes et leur grand coût d'utilisation (Khan *et al.*, 2004). La dénitrification est une approche des plus prometteuses, car contrairement aux technologies énumérées ci-haut, elle constitue un procédé à faible coût, peu contraignant et sélectif à l'ion nitrate, pouvant transformer biologiquement cet ion en azote gazeux, un gaz inoffensif (Mohseni-Bandpi *et al.*, 2013).

2.4 Caractéristiques des biofilms

Dans la nature, les bactéries passent par deux modes de vie différents au cours de leur maturation. Le mode planctonique désigne les bactéries isolées en flottaison dans leur milieu alors que le mode sessile réfère aux bactéries implantées sur une surface et vivant en communauté (Dolan et al., 2002). Ce deuxième mode de vie est le plus fréquent et est rencontré au sein d'un biofilm. Un biofilm est trouvé en milieu aqueux ou humide et se définit comme étant une communauté multicellulaire hautement organisée et complexe de microorganismes. Ces derniers peuvent être de la même espèce ou d'espèces différentes (le plus fréquemment rencontré dans la nature) (Dolan et al., 2002 et Lens et al., 2003). Mis à part les bactéries, un biofilm peut comprendre des protozoaires, des virus, des levures et des algues. Les microorganismes au sein du biofilm vivent le plus souvent en symbiose et adhèrent entre eux et à une surface solide. Ils sont contenus dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) qu'ils produisent en bonne partie. Cette matrice est formée principalement d'exopolysaccharides, mais aussi de protéines, de lipides, d'ADN, de résidus cellulaires et parfois même de résidus abiotiques relatifs à l'environnement (Lens et al., 2003). Dans le biofilm, les bactéries sessiles subissent des régulations géniques et phénotypiques différentes de leurs homologues à l'état planctonique pouvant atteindre environ 40 % du protéome (Prigent-Combaret et al., 1999). En effet, certains gènes sont surexprimés alors que d'autres sont réprimés par les systèmes de quorum sensing. Cette différenciation induit une coopérativité entre les microorganismes du biofilm, ce qui y amène des fonctions spécifiques ainsi que des avantages pour la communauté. Parmi ces avantages sont retrouvés entre autres : la protection contre la prédation ou le système immunitaire, l'utilisation de nouveaux substrats et la colonisation de nouvelles niches écologiques ainsi que l'économie d'énergie via la division du travail entre les divers microorganismes. De ce fait, la vie en communauté au sein de biofilms est ubiquitaire puisque ce mode de vie permet aux microorganismes de s'adapter à la quasi-totalité des conditions environnementales présentes sur la biosphère (Renner et al., 2011).

Les biofilms peuvent se former sur plusieurs types de surfaces abiotiques ou biotiques. Beaucoup de ces organisations ont des effets néfastes puisqu'elles sont trouvées sur le matériel médical entrant en contact avec l'homme à l'exemple des cathéters, des implants chirurgicaux et des verres de contact. Plusieurs problèmes de santé comme la fibrose kystique, l'ostéomyélite, les otites sérieuses et les caries dentaires sont associés aux biofilms (Costerton *et al.*, 1999). Dans le milieu hospitalier, 60 % des infections nosocomiales sont causées par des biofilms qui engendrent des infections persistantes difficilement traitables conséquemment à la résistance élevée conférée par cette organisation microbienne (Bryers, 2009). Cependant, les biofilms peuvent avoir des effets bénéfiques, à commencer par ceux associés au microbiote humain qui contribuent positivement à un bon état de santé. Aussi les biofilms sont utilisés à bon escient notamment dans le domaine des biotechnologies, par exemple dans l'utilisation de biofiltres ou de bioréacteurs capables de décontaminer des sources d'eau ou des portions de sol (Lear *et al.*, 2012).

2.4.1 Développement d'un biofilm bactérien en cinq étapes

Étape 1 (Fig. 2.3): Au départ, les bactéries planctoniques se déplacent librement dans l'environnement de façon aléatoire ou par motilité (swimming, chimiotaxie). Elles peuvent user de plusieurs organites extracellulaires comme des protéines membranaires, des pilis, un ou des flagelles et des fimbriaes pour repérer la surface solide à laquelle elles s'attachent réversiblement via des liaisons faibles électrostatiques, hydrophobes, hydrodynamiques ou de Van der Wall (Donlan *et al.*, 2002 et Lars *et al.*, 2011). Plusieurs facteurs variant selon l'espèce bactérienne ou les conditions environnementales influencent cet attachement. En plus de celles énumérées cihaut, les propriétés cellulaires associées à l'espèce bactérienne incluent : la production d'EPS et la présence de protéines extracellulaires, d'une capsule, de l'antigène O et de lipopolysaccharides (Donlan *et al.*, 2002 et Lars *et al.*, 2011). Concernant les conditions environnementales, celles qui influencent l'attachement sont les caractéristiques de la surface (rugosité, hydrophobicité, polarité, formation de films de conditionnement composés de polymères et de polysaccharides, sels inorganiques, lipides, etc.) et les caractéristiques physicochimiques du milieu (pH, température, quantité de nutriments, source de carbone, présence de facteurs de croissance et niveau d'agitation du milieu aqueux) (Donlan *et al.*, 2002 et Lars *et al.*, 2011).

Étape 2 (Fig. 2.3): Si les bactéries adoptent l'environnement, elles s'attachent de façon irréversible via des liaisons moléculaires entre les adhésines bactériennes (un ou plusieurs types selon l'espèce) et la surface (Lars *et al.*, 2011). L'adhésion cellulaire est renforcée par la production d'une matrice par les bactéries. Aussi, des couples « ligand-récepteur » formés entre

la surface solide et la bactérie au niveau des flagelles, des pilis ou des fimbriaes avantagent l'ancrage. En adhérant à la surface, ces microorganismes produisent des métabolites pouvant être utilisés par d'autres espèces en plus de leur offrir une variété de sites de liaison leur permettant de s'attacher et de prendre place dans le biofilm sans entrer en contact avec la surface solide. Cependant, ces colonisateurs primaires peuvent entrainer une compétition pour certains nutriments et produisent des déchets toxiques pouvant affecter la diversité au sein du biofilm (Dunne Jr., 2002).

Étape 3 (Fig. 2.3): Les microorganismes se multiplient et se développent sous forme de microcolonies. Leur rapidité de croissance dépend des conditions du milieu de culture, comprenant : la quantité de nutriments et de sources de carbone assimilables, la pénétration d'oxygène, le pH et l'osmolarité (Dunne Jr., 2002).

Étape 4 (Fig. 2.3): En se développant, les microcolonies forment une structure tridimensionnelle macroscopique, hétérogène, robuste et organisée par laquelle est caractérisé le biofilm mature. Ce biofilm mature doit sa stabilité à la matrice qui le contient ainsi qu'aux diverses interactions intercellulaires (Dunne Jr., 2002).

Étape 5 (Fig. 2.3): Le vieillissement, l'épaississement, le stress ou certaines carences amènent quelques bactéries à se détacher du biofilm pour réacquérir le mode planctonique et aller coloniser d'autres surfaces où un nouveau cycle commence. Cette étape permet la propagation et l'autorenouvellement de la communauté (Dunne Jr., 2002 et Molin *et al.*, 2003).



Figure 2.3 Développement d'un biofilm en cinq étapes. Figure adaptée de Molin *et al.*, 2003.

2.4.2 Organisation d'un biofilm

Les biofilms sont composés principalement de cellules microbiennes et d'EPS très hydratés. L'eau peut représenter de 50 à 95 % du biofilm alors que les EPS constituent de 60 à 98 % de la matière organique du biofilm (Siegert, 1999). La composition d'EPS varie selon les espèces présentes, les conditions de croissance et les systèmes de quorum sensing. Avec la maturation du biofilm, leur production tend à augmenter. Les EPS forment une grande « barrière » au sein du biofilm, le protégeant du milieu extérieur et empêchant ainsi la dessiccation et la prédation, tout en conférant une résistance aux antibiotiques, aux biocides, aux antigènes et aux surfactants. Il les protège aussi des stress mécaniques (Dunne Jr., 2002).

Les biofilms sont très hétérogènes en termes d'espace et en continuel changement en fonction du temps, ce qui influence leur maturation. Aussi, l'hétérogénéité en termes d'espèces microbiennes tend à influencer positivement l'épaisseur d'un biofilm (Donlan *et al.*, 2002). La structure et la dynamique d'un biofilm sont influencées par les conditions environnementales

ainsi que les microorganismes qui le composent. Les bactéries sont organisées dans la matrice sous forme de microcolonies séparées les unes des autres par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant l'apport de nutriments et l'évacuation des déchets (Donlan *et al.*, 2002). La microcolonie est une conformation de choix dans un biofilm, puisqu'elle permet une très grande proximité d'espèces et constitue un environnement idéal pour les systèmes de quorum sensing, l'échange de matériel génétique ainsi que la création d'un gradient de nutriment, de métabolites secondaires et d'oxygène (Donlan *et al.*, 2002). Ces facteurs contribuent à réguler la physiologie et le comportement cellulaire du biofilm, incluant : la croissance, la motilité, la formation du biofilm et le pouvoir pathogène. Aussi, cette proximité permet un meilleur taux de conjugaison entre les cellules appartenant à un biofilm qui peuvent alors acquérir du matériel génétique comme des gènes de résistances à certains antibiotiques (Donlan *et al.*, 2002).

2.5 La filière de dénitrification opérée en mode continu au Biodôme de Montréal

La filière de dénitrification implantée au système de traitement principal du mésocosme était opérée en mode continu, impliquant que des quantités équivalentes d'eau à traiter y entraient et y sortaient continuellement avec un débit de 6 litres par minutes (Fig. 2.4A section 2.5.2). Le mode continu offre des conditions stables et est associé à plusieurs systèmes de traitement des eaux contaminées en nitrate par la dénitrification (Nuhogl *et al.*, 2002 et Mansell et Schroeder (1999)). Avant son entrée dans la filière de dénitrification, l'eau à traiter passait par un système de filtres à sable où une communauté biologique se chargeait de consommer la matière organique (Laurin, 2005). L'eau passait ensuite dans une cuve de désoxygénation, favorisant ainsi la dénitrification, qui est un processus anaérobie, dans la filière. Du méthanol était rajouté quotidiennement à titre de source de carbone. L'emploi de cet alcool repose sur son faible coût et sa grande accessibilité pour la communauté microbienne qui l'utilise. Également, contrairement à l'éthanol ou à l'acide acétique, le méthanol entraîne un développement moins rapide et plus stable de la biomasse (Akunna *et al.*, 1993 et Laurin, 2005). Ainsi, l'emploi de méthanol permet l'obtention d'un biofilm moins imposant sur chaque support présent au sein du bioréacteur, caractéristique essentielle à la diffusion optimale du milieu à traiter au travers de l'ensemble du

biofilm développé, ce qui permet de générer au final une activité dénitrifiante plus efficace. Dans cette même optique de contrôle du développement de la biomasse, la filière était à lit fluidisé, impliquant un mouvement d'eau en son intérieur qui secoue les supports pour y enlever la biomasse excédante (Labelle, 2005).

Plusieurs études ont été effectuées pour améliorer le fonctionnement de la filière. L'une d'entre elles concerne l'ajout d'éléments traces au milieu à traiter. Comme l'eau de mer est pauvre en métaux, cet ajout visait à améliorer l'activité des enzymes impliquées dans la dénitrification, notamment au niveau du transfert d'électrons, étant donné que les quatre types possèdent des cofacteurs métalliques (Labbé et al., 2003). Dans un essai opéré en mode continu en laboratoire, plusieurs combinaisons à dosage élevé ou faible ont été testées avec les métaux suivants : fer, zinc, molybdène, cuivre et manganèse. Pour un haut dosage de ces cinq métaux, le taux de dénitrification a triplé, sans augmentation de biomasse, indiquant une hausse de l'activité métabolique. Cette combinaison a ensuite été reprise dans le bioréacteur du Biodôme de Montréal et a permis une augmentation du taux de dénitrification du biofilm de 3,5 fois (Labbé et al., 2003). Dans les essais en laboratoire, l'addition séparée des cinq métaux n'a pas significativement augmenté l'activité dénitrifiante. Le même phénomène a également été observé pour l'ajout combiné de cuivre, de molybdène et de zinc (Labbé et al., 2003). L'ajout de fer a cependant également fait tripler le taux de dénitrification et lorsque ce dernier élément était combiné avec du manganèse, l'effet était optimal (Labbé et al., 2003). L'ingénierie du réacteur, visant à améliorer la circulation du milieu à traiter et le mouvement des supports colonisés au sein de la cuve, a également été examinée et repensée. La forme des supports a également été repensée pour favoriser l'accessibilité du milieu à traiter à l'ensemble de la biomasse qui s'y est développée (intérieur et extérieur). Ces derniers ont donc passé d'aspect petit (~1 cm de diamètre) à plus grand (~ 8 cm de diamètre), offrant toutefois une surface de contact diminuée. Ils avaient par contre l'avantage de ne pas s'engorger, car le brassage du lit fluidisé permettait à l'excédent du biofilm de détacher facilement (Dupla et al., 2006). Malgré une bonne performance des essais en bioréacteur pilote et une proposition de modification du système et de son plan d'opération (Dupla et al., 2006 et Labelle et al., 2005), les tentatives d'implantation au Biodôme ont été vaines. L'activité de dénitrification ne s'est jamais installée dans le réacteur. Des problèmes logistiques importants sur la gestion du réacteur par le Biodôme ont été rencontrés et ont pu contribuer fortement à son implantation. L'utilisation de la filière de dénitrification au Biodôme de Montréal a conséquemment été délaissée. Les supports colonisés en mode continu ont cependant été conservés adéquatement par les membres du laboratoire du Prof. Villemur.

Des études visant la conservation adéquate de la diversité biologique et de l'activité dénitrifiante, associées à ces supports colonisés, ont été menées. Pour ce faire, des supports colonisés ont été conservés à 4 °C, -20 °C ou -80 °C pendant 1 semaine, 6 mois et 17 mois, avec ou sans glycérol 20 % pour les températures de -20 °C ou -80 °C (Laurin et al., 2006). Après 6 et 17 mois, les échantillons ayant été conservés dans le glycérol à -20 °C et -80 °C ont démontré une activité dénitrifiante comparable au biofilm non congelé (biomasse fraîche). Celle des échantillons conservés aux mêmes températures sans glycérol était basse, mais la diminution la plus drastique a été observée pour une conservation à 4 °C. Après 17 mois de conservation, des différences quant à la présence et à l'intensité des bandes visibles sur les profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne ont été observées pour toutes les conditions de conservation (Laurin et al., 2006). Des bandes associées aux genres Methylophaga et Hyphomicrobium étaient toutefois présentes pour toutes les conditions. Une accumulation de nitrite, non observée en mode continu sur de la biomasse non congelée, a été observée chez certaines conditions de conservation, notamment celle à -20 °C dans le glycérol (Laurin et al., 2006). Ce mode de conservation a cependant été choisi pour son taux de dénitrification élevé obtenu après une conservation à long terme.

2.5.1 Analyse de la diversité microbienne

La caractérisation de la diversité bactérienne du biofilm dénitrifiant opéré en mode continu et retrouvé au Biodôme de Montréal a été effectuée par des méthodes de culture d'isolement et de biologie moléculaire (Labbé *et al.*, 2003). Lors des cultures d'isolement bactérien, des milieux spécifiques (comprenant de l'eau de mer, du nitrate et du méthanol) et non spécifiques ont été utilisés et incubés en conditions aérobies ou dénitrifiantes. Les colonies obtenues ont été sélectionnées en fonction de leur phénotype différent et, selon leur gène codant pour l'ARNr 16S, des affiliations au genre le plus près ont été effectuées (Labbé *et al.*, 2003). Trois isolats distincts ont été obtenus et affiliés au genre *Hyphomicrobium* (isolat NL23) et

Paracoccus denitrificans (isolat NL8), ainsi qu'aux *Phyllobacteriaceae* (isolat NL21). La souche NL23 était de loin l'isolat le plus dominant des trois (Labbé *et al.*, 2003). Les isolats NL23 et NL8 étaient considérés comme des dénitrificateurs complets alors que l'isolat NL21 ne pouvait que respirer le nitrate. Selon des analyses moléculaires (analyses phylogénétiques, des acides gras cellulaires majoritaires et du contenu en GC) ce dernier isolat a été défini comme une nouvelle espèce, *Nitratireductor aquibiodomus* NL21 (Labbé *et al.*, 2004). Le même phénomène a été rencontré pour l'isolat NL23 qui a été associé à la nouvelle espèce *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 (Martineau *et al.*, 2013).

Pour l'identification de bactéries non cultivables, une génothèque de clones contenant le gène codant pour l'ARNr 16S de bactéries en provenance du biofilm a été générée. Parmi ces clones, des séquences affiliées aux genres *Hyphomicrobium*, *Sulfitobacter*, *Delftia*, *Dechloromarinus et Thiomicrospira* ont, entre autres, été identifiées. La littérature les rapporte souvent dans des environnements marins ou anoxiques. Le genre *Methylophaga* a été associé à plus de 70 % des clones. Cette découverte avait été surprenante puisqu'à cette époque, les espèces affiliées au genre *Methylophaga* n'avaient été considérées que comme des aérobies stricts. La diversité des espèces présentes au sein du biofilm a été estimée à environ 15 espèces (Labbé *et al.*, 2003).

La diversité des protozoaires et d'autres organismes eucaryotes unicellulaires au sein du biofilm cultivé en mode continu a également été investiguée par approche moléculaire (création d'une génothèque de gènes de l'ARNr 18S) et par microscopie. Une diversité considérable de protozoaires a été obtenue, comprenant majoritairement des membres appartenant aux *Ciliophora*, à l'exemple de *Euplotes* sp., *Cyclidium* sp. et *Vorticella* sp. (Laurin, 2005). Des membres appartenant aux moisissures ont également été identifiés à l'exemple des *Saccharomycetales* et des *Ichthyosporea*. La culture du biofilm en présence et en absence d'inhibiteurs d'eucaryotes a suggéré que le rôle principal de ces eucaryotes était la consommation des bactéries en suspension, libres dans le milieu à traiter. Ainsi, ils contribuaient au bon fonctionnement du bioréacteur en évitant le colmatage des tuyaux, mais n'avaient aucune activité dénitrifiante et n'influençaient pas le développement du biofilm au sein des supports (Laurin, 2005).

Pour en apprendre davantage sur la structure de la communauté microbienne et les interactions la régissant, la quantification des microorganismes présents dans le biofilm a été effectuée par hybridation in situ en fluorescence (FISH). Des oligonucléotides spécifiques à l'ARNr des eucaryotes et des procaryotes ont été utilisés, de même que des oligonucléotides ciblant plusieurs familles détectées par l'approche moléculaire et les genres Methylophaga et Hyphomicrobium (Labbé et al., 2007). Des lames de microscope ont été introduites dans le bioréacteur opéré en mode continu pour une période de 37 jours. Elles ont été échantillonnées à cinq reprises avec un intervalle régulier durant cette durée de colonisation. Durant les 37 jours de colonisation, les Gamma-proteobacteria et les Alpha-proteobacteria ont été les populations bactériennes les plus abondantes, s'étalant respectivement de 39 à 79 % et de 24 à 57 % (Labbé et al., 2007). Le genre Methylophaga a été associé à la majeure partie des Gamma-proteobacteria et représentait de 39 à 79 % de la population bactérienne. Le genre Hyphomicrobium (Alphaproteobacteria) n'a été détecté qu'à partir du 22^{ème} jour de colonisation et représentait de 7 à 8 % de la population bactérienne. Les eucaryotes ont été identifiés en surface du biofilm et ont vu leur abondance diminuer selon son développement pour n'en représenter que 5 % après les 37 jours de colonisation (Labbé et al., 2007).

Le biofilm s'est avéré exempt de structures typiques comme les canaux aqueux. Il s'est plutôt présenté sous forme d'un enchevêtrement de bactéries et de protozoaires avec plusieurs microcolonies comportant des espèces associées aux genres *Methylophaga* et *Hyphomicrobium*. Également, sa surface était inégale et comportait plusieurs creux, bosses et régions épaisses ou minces (Labbé *et al.*, 2007). Ce phénomène a été expliqué par l'érosion et le remodelage constant engendrés par le mode d'opération à lit fluidisé et la prédation par les protozoaires, qui empêchent l'obtention d'une organisation classique au sein du biofilm.

Des profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne ont également été effectués en parallèle à l'étude de FISH. La bande migratoire correspondant au genre *Methylophaga* était intense pendant les 37 jours de colonisation alors que la bande correspondant au genre *Hyphomicrobium* n'est apparue qu'après 22 jours. Une trentaine de jours ont été nécessaires pour l'obtention d'une population stable (Labbé *et al.*, 2007). Une étude similaire avait démontré ces mêmes tendances, où une durée de colonisation de cinq semaines avait permis l'obtention d'une

population stable où le genre *Hyphomicrobium* n'apparaissait qu'à la dernière semaine de culture (Labbé *et al.*, 2003).

2.5.2 Identification des méthylotrophes dénitrifiants

Les techniques de MAR-FISH (Microautoradiography and Fluorescent in situ hybridization) et de SIP (Stable isotope probing) ont été utilisées pour identifier les bactéries méthylotrophes dénitrifiantes présentes au sein du biofilm. Le biofilm en provenance du bioréacteur opéré en mode continu a été cultivé sans adaptation en mode cuvée pour ces deux essais en conditions dénitrifiantes dans l'Eau de Mer Synthétique (EMS; section 3.1.1). Brièvement, le mode cuvée implique que le biofilm entre en contact en une fois avec l'eau à traiter. Suivant le traitement, l'eau traitée est relâchée et remplacée (section 2.6 et Fig. 2.4). Concernant le MAR-FISH, le biofilm a été supplémenté en méthanol radioactif (¹⁴C) pendant 17 heures (Labbé et al., 2007). Des trappes à CO₂ ont été utilisées pour éviter la consommation de sous-produits carbonés produits par les bactéries pouvant utiliser le méthanol (cross-feeding). La comparaison des images microscopiques en provenance de la microautoradiographie avec celles en provenance de la méthode FISH qui ciblait principalement les bactéries associées aux genres Methylophaga et Hyphomirobium ainsi que les eucaryotes (représentants principaux du consortium microbien), a permis d'identifier les organismes ayant consommé le méthanol radioactif en conditions dénitrifiantes. Ces derniers se sont avérés appartenir au genre Hyphomicrobium. Cependant, la courte période d'incubation a pu empêcher la détection d'une telle activité chez le genre Methylophaga (Labbé et al., 2007).



Incubation pour X heures

Figure 2.4 Mode d'opération continu au Biodôme de Montréal (A) et mode d'opération cuvée en laboratoire (B). Ces représentations simplifiées ne sont pas à l'échelle.
Pour cibler plus exhaustivement les méthylotrophes dénitrifiants présents dans le biofilm, une étude de SIP a été effectuée, pendant laquelle le biofilm a été exposé à l'isotope ¹³C du méthanol. Des trappes à CO₂ ont également été ajoutées au milieu de culture. Après trois jours d'incubation, l'ADN du biofilm a été extrait et séparé par centrifugation via un gradient de densité selon le principe que l'ADN des méthylotrophes dénitrifiants ayant incorporé l'isotope ¹³C du méthanol est plus lourd (Auclair *et al.*, 2010). Ensuite, des approches moléculaires (analyses PCR-DGGE, clonage, séquençage et affiliation bioinformatique) ont permis d'associer majoritairement le genre *Methylophaga* aux méthylotrophes dénitrifiants (Auclair *et al.*, 2010).

Comme le genre *Methylophaga* était majoritaire dans le biofilm via les expériences de FISH et de la génothèque, des essais plus poussés pour en identifier précisément les espèces ont été effectués par des méthodes de culture d'isolement en étalant des dilutions du biofilm sur des milieux sélectifs (milieux marins contenant du méthanol et de la vitamine B12) et non sélectifs (Auclair *et al.*, 2010). La majorité des isolats sélectionnés ont été associés avec 96 % d'identité à *M. alcalita* (isolat JAM1). Ces isolats ont ensuite été associés à une nouvelle espèce bactérienne : *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 (Villeneuve *et al.*, 2013). Cette souche qui a été cultivée dans plusieurs conditions s'est avérée être en mesure de croître et de réduire le nitrate en nitrite en présence ou en absence d'oxygène (Auclair *et al.*, 2010). Quelques isolats ont également été associés avec 96 % d'identité à *M. murata* (isolat JAM7) et ont ensuite été associés à la nouvelle espèce *M. frappieri* JAM7 qui ne possède aucune capacité dénitrifiante (Auclair *et al.*, 2010) et Villeneuve *et al.*, 2013).

Pour évaluer la diversité fonctionnelle du biofilm, l'identification de gènes codant pour des réductases impliquées dans la dénitrification a été effectuée via la création d'amorces dégénérées ciblant plusieurs réductases. Un total de 25 séquences a été trouvé (Auclair *et al.*, 2012). Parmi elles, deux nitrate réductases (*narG1* et *narG2*) ont été associées à *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et les quatre types d'enzymes nécessaires à la dénitrification complète ont été trouvées chez *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. Des amorces spécifiques à ces 25 séquences ont été générées pour les quantifier au sein du biofilm. Des analyses de qPCR ont démontré que les gènes *narG1* et *narG2* associés à la souche JAM1 représentaient chacun plus de 10^4 copies de gène/ng ADN. Les gènes *napA*, *nirK* et *nosZ* associés à la souche NL23 ont été également trouvés dans des proportions similaires. Les enzymes correspondant aux souches

JAM1 et NL23 abondaient au sein du biofilm; elles étaient présentes en proportions 10 à 10 000 fois plus élevées que celles des autres espèces bactériennes (Auclair *et al.*, 2012).

2.5.3 Les espèces dominantes Hyphomicrobium nitrativorans NL23 et Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1

Comme mentionné précédemment, parmi la quinzaine d'espèces bactérienne qui composaient le biofilm du système de dénitrification du Biodôme, deux espèces méthylotrophes, *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 et *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 ont été isolées. Ces deux souches, présentes en proportions équivalentes, représentaient plus de 80 % du biofilm et ont été associées à la majeure partie de l'activité dénitrifiante. Les génomes des deux souches ont été séquencés et nous ont révélé les composantes géniques de la dénitrification (Martineau *et al.*, 2014 et Villeneuve *et al.*, 2012).

La souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 est une alpha-protéobactérie capable de réduire le nitrate jusqu'en azote gazeux (dénitrificateur complet). En monoculture, elle se développe dans un milieu contenant entre 0,0 et 1,0 % NaCl. Sa température optimale est de 30 ^oC et son pH optimal est de 8,0 (Martineau *et al.*, 2013). Elle possède la nitrate réductase périplasmique Nap et tous les autres opérons (*nir, cnor, nos*) impliqués dans la dénitrification. Sa présence dans un environnement marin typique (près de 2,75 % NaCl) reste un phénomène curieux et intéressant qui est étudié dans le laboratoire du Prof. Villemur.

La souche *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 est une gamma-protéobactérie qui possède deux nitrate réductases de type Nar (*narG1* et *narG2*) et tous les autres gènes impliqués dans la dénitrification, à l'exception de celui codant pour une nitrite réductase pour lequel la souche possède une version tronquée et non fonctionnelle (Villeneuve *et al.*, 2012). Ainsi, elle est impliquée au niveau de la réduction du nitrate en nitrite (respirateur de nitrate) et potentiellement au niveau de la réduction de l'oxyde nitrique jusqu'en azote gazeux. Son incapacité à réduire le nitrite engendre chez cette souche une sensibilité envers cet ion lorsqu'il est présent en haute concentration dans son milieu de culture. Elle croît de façon optimale à 30 $^{\circ}$ C et à pH 8,0. Également, la souche JAM1 est bien adaptée à la vie marine et peut tolérer des

expositions de 0,5 à 8,0 % NaCl. Elle est autotrophe pour la vitamine B12 (Villeneuve *et al.*, 2013).

Ces deux souches sont des anaérobies facultatives qui peuvent utiliser le méthanol comme source de carbone. À cette fin, selon des analyses génomiques, la souche JAM1 emploie le cycle RuMP (une variante de la voie d'Entner–Doudoroff) qui produit du CO₂ et la souche NL23 utilise la voie de la Sérine (Serine pathway) qui consomme du CO₂ (Martineau *et al.*, 2013 et Villeneuve *et al.*, 2012).

Des analyses de RT-PCR ont permis de démontrer que la nitrate réductase *napA* de la souche NL23 n'était pas exprimée dans le biofilm, contrairement à une culture pure. Par contre, ses trois autres types de réductases (*nirK*, *cnorB*, *nosZ*) permettant la dénitrification complète étaient exprimés autant dans le biofilm que dans une culture pure. Seule la nitrate réductase *narG1* de la souche JAM1 était exprimée dans le biofilm; *narG1*et *narG2* l'étaient en culture pure (Auclair *et al.*, 2012).

Ainsi, dans le biofilm opéré en mode continu, une relation mutualiste répondant aux hypothèses suivantes semble s'être installée entre les deux souches (Fig. 2.5). D'un côté, *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 qui produit de l'ectoine, un osmo-protectant prédit par son génome, et du CO₂, rendrait ces substances accessibles à *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 tout en réduisant le nitrate en nitrite. En retour, cette dernière souche détoxifierait le milieu en réduisant le nitrite en azote gazeux et en fournissant de la vitamine B12 (prédit par le génome) à la souche JAM1.



Figure 2.5 Interactions possibles entre les souches JAM1 et NL23. Modèle hypothétique expliquant les interactions entre *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 au sein d'une filière de dénitrification opérée en mode continu et employée pour traiter l'eau contaminée en nitrate d'un mésocosme marin retrouvé au Biodôme de Montréal.

2.6 Le mode d'opération cuvée

Le mode d'opération cuvée implique des entrées cycliques du milieu à traiter (Fig. 2.4). Son efficacité a été démontrée dans plusieurs systèmes de traitement d'eau usée ou de plan d'eau naturel, pour la bioremédiatisation de plusieurs contaminants, dont le nitrate (Obaja et *al.*, 2005 et Rakesh *et al.*, 2009). Appliqué à la problématique du Biodôme de Montréal, ce mode d'opération implique que l'eau de mer à traiter est amenée à entrer en contact en une fois avec le biofilm et est incubée jusqu'à la disparition complète du nitrate et du nitrite, avant d'être relâchée puis remplacée par un nouveau volume d'eau à traiter.

Le mode d'opération cuvée a été priorisé pour l'étude du biofilm cultivé en laboratoire pour plusieurs raisons. Premièrement, il y est plus facilement recréable, opérable et utilisable. En effet, le mode continu implique l'ajout constant de volumes d'eau de mer désoxygénée favorisant l'encrassement des tubulures du système d'apport et d'export et d'autres problèmes de nettoyage, difficultés qui ne sont pas rencontrées en mode cuvée. Deuxièmement, le faible coût, l'accessibilité et la simplicité d'opération du mode cuvée permettent une production à grande échelle et l'étude de l'influence de plusieurs facteurs physicochimiques en triplicata et de manière simultanée. Finalement, les études des souches *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 en laboratoire sont effectuées en mode cuvée et l'étude du biofilm dans cette condition est plus adaptée pour comparer leurs comportements en monoculture et en communauté.

Des bancs d'essai opérés en mode cuvée en laboratoire ont déjà été étudiés en employant les supports colonisés en mode continu au Biodôme de Montréal et avaient démontré un potentiel de dénitrification intéressant. Cependant, un approfondissement de cette étude était nécessaire, car les conditions de culture et d'incubation associées aux deux modes diffèrent sur de nombreux points et mènent ainsi à l'acclimatation de communautés bactériennes différentes (Artan *et al.*, 2005). En effet, le mode continu offre des conditions stables où le pH, la température, la concentration en oxygène, la concentration en nitrate présente dans le milieu de culture et le ratio C/N ne varient pratiquement pas. À l'opposé, le mode cuvée offre une dynamique instable. Dès le début de l'incubation, les concentrations en nitrate et le ratio C/N chutent et le pH augmente suite à l'activité bactérienne. Entre chaque ajout de milieu frais à traiter, le biofilm est exposé à des entrées séquentielles en oxygène. Ainsi, les conditions d'opérations différentes sélectionnent des communautés microbiennes différentes dont la nature et la composition reflètent les caractéristiques de chaque mode d'opération (Artan *et al.*, 2005). Donc, une communauté développée en mode cuvée peut être complètement différente de celle opérée dans le même milieu en mode continu, et être ainsi plus adaptée.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Culture du biofilm en mode cuvée

3.1.1 Milieux de culture et conditions de croissance

Le biofilm a été cultivé en triplicata dans des fioles de 120 mL contenant chacune 60 mL d'Eau de Mer Synthétique (EMS) (Atlas, 2004). Chaque litre de ce milieu de culture contient : 27,5 g de NaCl, 10,68 g de MgCl₂*6H₂O, 2 g de MgSO₄*7H₂O, 1 g de KCl, 0,5 g de CaCl₂, 456 μ L d'une solution de FeSO₄*7H₂O 4 g L⁻¹, 5 mL d'une solution de KH₂PO₄ 51,2 g L⁻¹, 5 mL d'une solution de Na₂HPO₄ 34 g L⁻¹ et 1 mL d'éléments traces (FeSO₄*7H₂O 0,9 g L⁻¹, CuSO₄*5H₂O 0,03 g L⁻¹ et MnSO₄*H₂O 0,2 g L⁻¹) (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U). En fonction de la croissance du biofilm, le milieu de culture a été supplémenté de 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃ (Fisher Scientific). Une quantité de 100 mg-N L⁻¹ de NaNO₃ correspondent à 607 mg L⁻¹ de NaNO₃ ou 7,14 mM. Le pH a été ajusté à 8,0 à l'aide d'un pH-mètre (Mettler Toledo, Greifensee, Suisse) et de NaOH (Fisher Scientific). Le tout a été stérilisé à l'autoclave à 121 °C pour 20 min puis refroidi à température pièce. Le méthanol (Fisher Scientific) a ensuite été ajouté à titre de source de carbone selon un ratio C/N de 1,5, soit 450 mg-C L⁻¹ de CH₃OH (37,5 mM de méthanol) pour 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃. Le ratio C/N de 1,5 correspond au rapport entre les quantités de méthanol et de nitrate de sodium exprimées en mg-C L⁻¹ et mg-N L⁻¹ (l'équation stoechiométrique est présentée dans la section 5.2.2). Le méthanol a été stérilisé avec un filtre de 0,22 µm (Fisher Scientific). Pour recréer des conditions dénitrifiantes, les fioles ont été fermées avec des bouchons septums stériles et pour y enlever l'oxygène, les milieux ont été barbotés à 1 PSI pour 10 minutes avec de l'azote gazeux (Praxair, Québec, Qc, Canada). L'incubation a été effectuée à température pièce (movenne de 23 °C au cours de l'année) et sous agitation orbitale à 100 RPM.

Le milieu « Instant Ocean® salt mix » (IO) (Aquarium systems, Mentor, OH, É-U) a également été employé pour une nouvelle série d'adaptation de la biomasse congelée. Il se présente sous forme d'une poudre contenant plusieurs sels et minéraux. Une quantité de 30 g a été mélangée à 1 litre d'eau contenant 1 mL d'éléments traces (section 3.1.1). Le pH a également été ajusté à 8,0 avec du NaOH et le milieu a été stérilisé à l'autoclave (20 min à 121 $^{\circ}$ C) et supplémenté à 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃ et en méthanol (C/N = 1,5) (Fisher Scientific). Puis, le tout a été incubé à température pièce, en conditions dénitrifiantes et sous agitation.

3.1.2 Acclimatation au mode cuvée : inoculation et repiquages

Depuis environ sept ans, le biofilm opéré en mode continu s'étant formé sur des supports retrouvés dans le dénitrificateur du Biodôme de Montréal a été conservé à -20 °C dans une solution de glycérol 20 % (v/v) (Fisher Scientific). Plusieurs de ces supports ont été grattés et la biomasse obtenue a été homogénéisée dans le milieu de culture d'EMS dans un seul bécher stérile de 50 mL. Cette biomasse en suspension a été pesée et ajoutée avec une aiguille de type $18_{G}1\frac{1}{2}$ (Becton, Dickinson and Company, Rutherford, NJ, É-U) dans chaque fiole à raison de 5 mL de milieu pour 0,4 g de biomasse par fiole contenant 60 mL de milieu de culture. Ainsi, les suspensions cellulaires injectées dans les fioles réalisées en triplicata provenaient de la même source. Chaque fiole contenait 20 supports en plastique de type « Bioflow 9 mm » (Rauschert, Steinwiessen, Allemagne) pour permettre le développement d'un biofilm. Ces supports ont été préalablement lavés dans une solution d'HCl 10 % (v/v) (Fisher Scientific) pendant trois heures avant d'être rincés trois fois à l'eau milliQ. Ils ont ensuite été séchés et autoclavés. Environ chaque semaine, les 20 supports ont été repiqués (transférés) en milieu frais pour un total de cinq semaines. La concentration en nitrate et en méthanol (C/N = 1,5) au sein d'une fiole a été renouvelée selon le rythme de consommation par la biomasse, lorsque la quantité de nitrite frôlait les 60 mg-N L⁻¹, afin d'assurer un développement et une activité de réduction maximale et ascendante. Au fil des repiguages, la biomasse sur les supports s'est développée et l'activité dénitrifiante s'est intensifiée (Fig. 3.1 et Fig. 3.2).

La méthodologie décrite jusqu'à présent dans le milieu EMS constitue les *conditions* standards de culture et d'incubation ou plus simplement la culture de référence. Les supports

colonisés à partir de la biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal ont été définis comme étant les *supports de première génération*.



Figure 3.1 Système d'adaptation de la biomasse en provenance du Biodôme de Montréal au mode cuvée jusqu'à cinq repiquages. La fiole de gauche constitue un contrôle négatif exempt de biomasse (au pH de 8,0, le milieu de culture précipite). La fiole du centre représente le système de culture et d'adaptation suite à l'injection de la biomasse en provenance du Biodôme de Montréal homogénéisé dans le milieu de culture (5 mL de milieu pour 0,4 g de biomasse). La fiole de droite démontre l'état de colonisation de cette biomasse sur les supports après cinq repiquages en milieu frais.

3.1.3 Culture du biofilm pour l'étude de l'influence de la variation de paramètres physicochimiques

Lors de l'étude préliminaire concernant l'influence de la variation de paramètres physicochimiques (section 4.3), pour augmenter le nombre de supports colonisés en mode cuvée, plutôt que de réadapter le biofilm à ce mode de culture en repartant de la quantité limitée de supports congelés provenant du Biodôme de Montréal, les supports de première génération obtenus au 5^{ème} repiquage ont été divisés en plusieurs fioles (6^{ème} repiquage) contenant des supports de plastique vides, lavés et stérilisés comme mentionné ci-haut (Fig. 3.2). Ainsi, une partie de la biomasse contenue dans ces supports colonisés s'est détachée pour s'accrocher aux

supports vides. Les fioles ont été cultivées selon les conditions standards de culture et d'incubation et les supports ont été transférés en milieu frais hebdomadairement. Au 10^{ème} repiquage, la croissance du biofilm sur les nouveaux supports, dits *supports de deuxième génération*, s'est avérée comparable à celle des supports de première génération datant du 5^{ème} repiquage (selon une analyse visuelle et la méthode de Bradford (section 3.4.2)). Cette méthodologie a été répétée à quatre reprises pour augmenter le nombre de supports de deuxième génération colonisés en mode cuvée et permettre l'étude de plusieurs paramètres physicochimiques au moment de l'atteinte des 10^{ème}, 15^{ème}, 20^{ème} et 25^{ème} repiquages avec ces nouveaux supports de deuxième génération fraîchement colonisés.



Figure 3.2 Développement et adaptation du biofilm au mode cuvée sur les supports de première et de deuxième génération. Les flèches bleues indiquent le nombre de repiquages hebdomadaires en milieu frais que les supports ont subis. À l'atteinte du dixième repiquage, les supports de deuxième génération pourront être employés pour l'analyse de paramètres physicochimiques. BC : ensemencement de la première fiole avec de la biomasse en suspension grattée sur le biofilm congelé anciennement opéré en mode continu au Biodôme de Montréal.

Suite à l'étude préliminaire, des paramètres physicochimiques jugés comme potentiellement optimaux pour l'activité dénitrifiante ont été sélectionnés. De nouveaux milieux de culture ont été faits sur la base de ces paramètres et une nouvelle série d'adaptation de la biomasse congelée a été faite telle que décrite auparavant pour un total de cinq repiquages (sections 4.4 à 4.6).

3.2 Suivi de l'évolution de la population bactérienne présente au sein du biofilm

L'évolution de la diversité bactérienne du biofilm en fonction des repiquages a été évaluée par des profils de diversité bactérienne réalisés par une amplification PCR d'une partie du gène de l'ARN 16S ribosomal des échantillons prélevés suivi d'une électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE). Cette technique permet d'obtenir une « empreinte digitale » de la communauté bactérienne au temps donné de l'échantillonnage par un profil migratoire de bandes d'ADN où chaque bande est associée, en théorie, à une seule espèce. Le DGGE permet la ségrégation d'ADNs amplifiés par PCR de longueurs similaires, mais de séquences différentes et repose sur le principe que des séquences d'acides nucléiques de même taille migrent et son séparées selon leur contenu nucléotidique en « A », « T », « C », « G » qui est relié à leur dénaturant, ce qui ralentit, voire cesse, sa migration pendant l'électrophorèse. La confection d'une échelle de migration a été réalisée à partir des monocultures de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, deux souches bactériennes isolées du biofilm. Cette échelle a permis de suivre ces deux souches dans les essais durant l'évolution des repiquages.

3.2.1 Extraction de l'ADN total du biofilm

L'extraction d'ADN a été effectuée sur la biomasse qui s'est détachée des supports colonisés et qui s'est retrouvée en suspension dans les fioles, ou sur la biomasse directement grattée sur un support colonisé. Dans le premier cas, une quantité variable de biomasse a été homogénéisée dans le milieu de culture (en fonction de la quantité de biomasse en suspension présente). Dans le deuxième cas, un support a totalement été gratté et homogénéisé dans 1 mL de milieu de culture. Pour les monocultures de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, de l'ADN de celles-ci était disponible dans le laboratoire. Il a été extrait selon Labbé *et al.*, 2006.

Selon sa densité, une quantité adéquate (1 à 5 mL) de biomasse a été centrifugée 1 min à 16 000 g. À trois reprises, les culots ont été dispersés dans 1 mL de tampon TEN (Tris-HCL 1 M pH 8,0; EDTA.2Na*2H₂O 0,5 M pH 8,0 et NaCl 5 M) (Fisher Scientific) et centrifugés 1 min à 16 000 g. Ensuite, ils ont été dispersés dans 500 µl de lysozymes dissous dans du tampon TEN 5 mg/mL (Fisher Scientific). Le tout a été incubé à 37 °C pour 30 minutes. Puis, un ajout de 50 µl de SDS 20 % (p/v) (Fisher Scientific) et de 5 µl de 6-mercaptoéthanol (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, É-U) a été effectué dans les tubes avant d'effectuer trois cycles de congélationdécongélation (10 min dans la glace sèche et 5 min à 65 °C avec une plaque chauffante). Ensuite, 50 µl de protéinase K (Fisher Scientific) dissoute dans du tampon TEN à 1000 µg/mL ont été ajoutés et les tubes ont été incubés 2 heures à 45 °C. Suivant l'incubation, le surnageant a été extrait deux fois en y ajoutant un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamyl (Fisher Scientific et A et C Produits Chimiques Américains, Saint-Laurent, Qc, Canada) (25:24:1) et une fois en y ajoutant un volume égal chloroforme/alcool isoamyl (Fisher Scientific et A et C Produits Chimiques Américains) (24:1). Pour ce faire, après l'ajout, les tubes ont été vortexés et centrifugés 10 min à 16 000 g, puis la phase supérieure a été réextraite. Après la dernière extraction, la phase supérieure a été transférée dans un tube contenant 0,25 fois son volume en acétate d'ammonium 10 M (A et C Produits Chimiques Américains) et 2 fois son volume en éthanol 95 % (Fisher Scientific). Le tout a été mélangé et conservé à -20 °C pour une vingtaine de minutes afin d'assurer la précipitation de l'ADN. Après, les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 16 000 g. Les culots ont été lavés avec de l'éthanol 70 % (v/v) (Fisher Scientific) et centrifugés 1 minute à 16 000 g. Le surnageant a été éliminé et les culots ont été séchés 30 minutes sous une hotte chimique avant d'être dissous dans 50 μ l de RNase A 10 μ g/mL (USB Co, Cleveland, Ohio, É-U.). L'ADN ainsi extrait a été aliquoté et conservé à -20 °C.

Pour évaluer la qualité de l'ADN extrait, celui-ci a été migré par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1 % (p/v) (Invitrogen, Grand Island, NY, É-U) réalisé avec le tampon de migration TAE 1 X (TAE 50 X: Tris 242 g L⁻¹, EDTA.2Na 0,5 M pH 8,0 100 mL L⁻¹ et acide acétique glaciale 57,1 mL L⁻¹) (Fisher Scientific). Pour chaque échantillon à tester, 5 μ L d'ADN ont été mélangés à 2 μ L de tampon de chargement à 6 X (glycérol 30 % (v/v) (Fisher Scientific), xylène cyanol 0,25 % (p/v) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É-U) et bleu de bromophénol 0,25 % (p/v) (Sigma-Aldrich)) et ont été déposés sur gel. Le marqueur de poids moléculaire λ *Sty*1 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, É-U), qui couvre de 421 à 19 329 paires de bases, a été ajouté sur chaque gel à raison de 5 μ L. La migration des échantillons dans le gel a été effectuée à 100 V pour environ 60 minutes. Ensuite, le gel a été imbibé dans une solution de bromure d'éthidium 0,5 μ g/mL (Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes sous agitation, avant d'être décoloré dans l'eau milliQ pour le même temps. L'ADN présent sur le gel a été visualisé suite à une exposition d'une à trois secondes aux rayons UV émis par l'appareil AlphaImagerTM3400 (Alpha Innotech Corporation).

La quantification des échantillons d'ADN extrait par spectrophotométrie s'est avérée nécessaire pour les diluer aux concentrations suivantes requises pour l'amplification des gènes de l'ARNr 16S par PCR : 25 ng/ μ L pour une culture mixte comme le biofilm et 5 ng/ μ L pour une monoculture de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 ou *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. L'appareil « NanoDrop-1000 Spectrophotometer » (Thermo Scientific, Waltham, MA, É-U) a été utilisé conjointement avec le logiciel « ND-1000 V3.8.0 » (Thermo Scientific) dans le mode Nucleic Acid (DNA). Un volume de 2 μ L de RNase A 10 ug/mL (USB Co.) a été appliqué sur l'appareil à titre de blanc. Puis, tour à tour, le même volume de chaque échantillon d'ADN à doser a été appliqué.

3.2.2 Réaction en chaine par polymérase (PCR)

Le gène codant pour l'ARNr 16S est ubiquitaire chez les bactéries, propre à chaque espèce et bien conservé au travers de l'évolution. Il contient des régions hypervariables, dont la région V3 d'environ 300 nucléotides qui a été ici amplifiée par PCR avec les amorces présentées au tableau 3.1 qui ont été synthétisées par la compagnie AlphaDNA inc. (Montréal, QC, Canada).

Chaque réaction de PCR totalisait 50 µL et a été effectuée dans un tube de 0,2 mL contenant : 36,5 µL d'eau milliQ stérile, 5 µL de tampon Taq 10X ThermoPolTM Reaction Buffer (Biolabs, Ipswich, MA, É-U), 1 µL de désoxynucléotides triphosphates 10 mM (Amersham Biosciences), 1 µL d'albumine sérine bovine 20 µg/µL (Sigma-Aldrich), 1 µL de chacune des amorces à 10 pmoles/µL, 0,5 µL d'enzyme Taq polymérase 2,5 U/µL (Amersham Biosciences) et 4 µL d'ADN (100 ng pour l'ADN du biofilm et 20 ng pour l'ADN des souches NL23 et JAM1). Pour chacune des réactions PCR, un contrôle négatif comprenant tous les éléments nécessaires à la PCR sauf l'ADN a été effectué. L'amplification fut effectuée dans l'appareil Tgradient PCR cycler (Biometra, Goettingen, Allemagne) selon le programme suivant : 94 ^oC pour 5 minutes, 55 ^oC pour 5 minutes, 30 cycles où les températures de 94 ^oC, 55 ^oC et 72 ^oC alternent toutes les 45 secondes et finalement 72 ^oC pour 10 minutes. À la fin de la réaction, les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1,5 % (section 3.2.1) avec l'utilisation du marqueur de poids moléculaire exACTGene (Fisher Scientific) qui couvre de 100 à 5 000 paires de bases.

Tableau 3.1 Amorces utilisées pour l'amplification PCR de la région V3 du gène de l'ARN ribosomal 16S

Nom	Séquence 5'-3'	Température d'hybridation (⁰ C)
341f-GC ^{1,2}	CCTACGGGAGGCAGCAG	55
534r ²	ATTACCGCGGCTGCTGG	55

¹ porte une pince G-C à l'extrémité 5[']. ² : Muyzer *et al.*, 1993.

3.2.3 Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)

Deux solutions à 0 et 80 % (v/v) d'urée (Bio-Rad Laboratories) et de formamide (Fisher Scientific), les agents dénaturants, contenant 8 % (v/v) d'acrylamide: bis (37,5:1) (Bio-Rad Laboratories) ont été utilisées pour créer le gel en gradient dénaturant. La première solution à 0 % était composée de 4 mL d'acrylamide: bis (37,5:1) 40 % (v/v) et de 0,4 mL de TAE 50 X. La deuxième solution à 80 % était constituée de 10,08 g d'urée, 9,6 mL de formamide déionisé, 6 mL d'acrylamide: bis (37,5:1) 40 % (v/v) et 0,6 mL de TAE 50 X. Les deux solutions ont respectivement été complétées à 20 mL et à 30 mL avec de l'eau milliQ avant d'être filtrées à 0,22 µm (Fisher Scientific). À partir de ces solutions, deux solutions de 20 mL à 30 et 70 % (v/v) d'agents dénaturants ont été créées, respectivement. La première en mélangeant 12,5 mL de la solution à 0 % à 7,5 mL de celle à 80 %. La deuxième en mélangeant 2,5 mL de la solution à 0 % à 17,5 mL de celle à 80 %. Les solutions de 30 et 70 % d'agents dénaturants ainsi créées ont été dégazées avec agitation dans une jarre anaérobie (Quelab, Montréal, QC, Canada) pour 15 minutes avant d'être refroidies dans la glace pour 30 minutes.

Le gel a pris forme dans un montage de type sandwich (Bio-Rad Laboratories) placé à la verticale (Fig. 3.3). Le montage était connecté à une chambre formatrice de gradient modèle 385 (Bio-Rad Laboratories) par un cylindre de plastique. Cette chambre est composée de deux compartiments. Le compartiment A est directement lié au montage sandwich et reçoit la totalité de la solution avec le pourcentage d'agents dénaturants le plus élevé. Une valve contrôle l'écoulement du liquide contenu dans ce compartiment vers le montage sandwich. Le compartiment B peut connecter avec la chambre A et reçoit l'intégralité de la solution avec le pourcentage d'agents dénaturants le plus faible. Au départ, les deux compartiments étaient fermés et pour initier la polymérisation 10 µL de TEMED (Fisher Scientific) ainsi que 100 µL d'ammonium persulfate 10 % (p/v) (Bio-Rad Laboratories) ont été ajoutés à chaque compartiment. Après ces ajouts, les deux compartiments ont été ouverts. Le liquide présent dans la chambre B s'écoulait doucement dans le compartiment A qui lui s'écoulait dans le montage sandwich (Bio-Rad Laboratories) pour y former le gel. C'est ainsi qu'un gradient s'est établi au sein du gel, passant de 70 % (bas du gel) à 30 % (haut du gel). Une fois le gel entièrement coulé, un peigne y a été inséré et le gel a polymérisé pendant deux heures. Pendant ce temps, le tampon de migration TAE 1 X, formé de 140 mL de TAE 50 X et complété à 7 litres avec de l'eau milliQ, a été chauffé à 60 $^{\circ}$ C dans la cuve de migration « DCodeTM universal mutation detection system » (Bio-Rad Laboratories) pour environ 1 heure 30. Une fois la polymérisation du gel terminée, le peigne a été retiré et les puits ont été rincés avec du tampon TAE 1 X. Ensuite, le gel a été positionné adéquatement sur un support placé dans la cuve de migration pour une équilibration pendant 1 heure dans le tampon à 60 $^{\circ}$ C.



Montage de type sandwich

Figure 3.3 Appareillage nécessaire à la réalisation du gel en gradient dénaturant.

Généralement, 10 μ L d'un produit PCR ciblant la région V3 du gène codant pour l'ARNr 16S ont été mélangés à un volume égal de tampon de chargement (glycérol 100 % (v/v) (Fisher Scientific), xylène cyanol 0,25 % (p/v) (Sigma-Aldrich) et bleu de bromophénol 0,25 % (p/v) (Sigma-Aldrich)). Chaque échantillon et l'échelle (présentant les souches JAM1 et NL23) ont été introduits dans leur puits respectif. Par l'entremise d'un bloc d'alimentation modèle 250/2,5 (Bio-Rad Laboratories), le gel a été exposé à 100 V pendant 16 heures. La visualisation de l'ADN sur le gel a été possible en le colorant et en le décolorant tel qu'indiqué dans la section 3.2.1. Selon l'intensité et la répartition des bandes à chaque repiquage, l'évolution de la population bactérienne a pu être suivie.

3.3 Quantification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23

Les essais de PCR-DGGE donnant des informations qualitatives au sujet de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 et Hyphomicrobium nitrativorans NL23, une analyse par PCR quantitative (qPCR) effectuée sur l'ADN extrait tel qu'indiqué dans la section 3.2.1 a permis de déterminer avec précision les concentrations de ces deux souches à chaque repiquage. Contrairement à la PCR qui ne peut donner une quantification précise, la PCR quantitative utilise un rapporteur fluorescent qui lie l'ADN et peut détecter l'intensité du signal de fluorescence dans la phase exponentielle de la réaction, qui est la plus reproductible, car les réactifs sont en excès. La quantification s'effectue en fonction d'un cycle seuil qui représente le nombre de cycles minimal à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition du cycle seuil dépend de la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon à amplifier : plus cette quantité est grande, moins de cycles sont nécessaires à son atteinte. Pour quantifier l'ADN de chaque échantillon en fonction du nombre de cycles d'amplification nécessaires à la détection du cycle seuil, une courbe standard de calibration, dont les concentrations en ADN constituant chaque point sont connues, a été effectuée. Aussi, suite aux cycles d'amplification, une courbe de fusion, où la température augmente progressivement pendant que la fluorescence émise des produits PCR est mesurée, a été réalisée pour assurer la spécificité des amplicons et l'absence de dimères d'amorces.

3.3.1 PCR quantitative (qPCR)

Courbe standard et efficacité de la réaction :

Les gènes de la nitrate réductase des deux espèces, soit narGl pour Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 et napA pour Hyphomicrobium nitrativorans NL23, ont été ciblés pour leur quantification par qPCR, puisqu'une seule copie de ceux-ci est présente dans leur génome respectif. Un fragment d'environ 700 pb (Tableau 3.2) a été produit pour chaque gène. Ces produits de PCR ont servi comme ADN cible pour dériver la courbe standard. Chaque tube de 0,2 mL contenait 38,5 µL d'H₂O, 5 µL de tampon Taq 10 X ThermoPolTM Buffer (Biolabs), 1 µL de BSA 20 µg/µL (Sigma-Aldrich), 1 µL de désoxynucléotides triphosphates 10 mM (Amersham Biosciences), 1µL de chacune des amorces à 10 pmoles/µL (Alpha DNA), 0,5 µL d'enzyme Taq polymérase 5 U/µL (Amersham Biosciences) et 10 ng d'ADN génomique de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 ou d'Hyphomicrobium nitrativorans NL23. Le déroulement de l'amplification a été réalisé comme indiqué dans la section 3.2.2, mais avec une température d'hybridation de 57 ou 61 °C selon la paire d'amorces (Tableau 3.2). Les produits de PCR ont été concentrés par vacuum avec le « Savant SpeedVac Concentrator » (Savant Instrument Inc., Farmingdale, NY, É-U) avant d'être mélangés, dosés et migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % (p/v) pour une migration à 100 V (section 3.2.1). Les bandes correspondant aux produits de PCR ont été découpées et purifiées avec la trousse Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, É-U).

L'ADN résultant a été dosé par la trousse Quant-itTM PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen). Pour ce faire, quatre dilutions séquentielles 1:2 totalisant 50 μ L ont été effectuées avec du TE 1 X (Invitrogen) et le standard λ -DNA (Invitrogen), dont la concentration en ADN était connue (10 ng/ μ L), pour créer une courbe standard. Un blanc ne contenant que du TE 1 X a été effectué pour éliminer le bruit de fond. En fonction de la quantité d'ADN dosée (section 3.2.1), une dilution appropriée dans 50 μ L des échantillons d'ADN a également été effectuée avec du TE 1 X afin que la quantité d'ADN totale dans le tube soit inférieure à 100 ng et se situe ainsi à l'intérieur de la courbe standard. Ensuite, 50 μ L de PicoGreen® 1 X (Invitrogen) ont été ajoutés à tous les tubes. Après un repos de 5 min, l'ADN a été quantifié dans le mode « Nucleic Acid Measurement » du logiciel « Rotor-Gene 6000 Series Software» (Corbett Life Science, Sydney, Australie), pour une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et d'émission de 520 nm, en utilisant le « Corbett Rotor-Gene 6000 real-time rotary analyzer » (Corbett Life Science). Cette valeur a été convertie en nombre de copies de *narG1* ou de *napA*/ μ L. À partir de cette concentration, la courbe standard, qui représente une série de dilutions séquentielles s'étalant de 10⁸ à 10⁰ copies/5 μ L, a été effectuée avec de l'eau milliQ.

Tableau 3.2Paires d'amorces utilisées pour créer la courbe standard de qPCR chezMethylophaga nitratireducenticrescens JAM1 et Hyphomicrobium nitrativorans NL23

Nitrate réductase	Nom	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (⁰ C)
narG1	narG-JAM1_G	ATGACAAGATCGTGCGTTCT	57
	narG-JAM1_D	GGTGTACGGGTCATTGGTAAG	57
napA	napA1171f-NL23	TACAACGTCCACCTGCTGAC	
	napA1846r-NL23	TCCGCTTCGTGGTTTTCGTA	61

narG1 réfère à Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 et napA à Hyphomicrobium nitrativorans NL23

Quantification des échantillons:

Après avoir réalisé la courbe standard, la quantification des gènes *narG1* et *napA* dans les échantillons venant du biofilm a pu être effectuée. Pour ce faire, une paire d'amorces spécifiques (Alpha DNA) à chaque nitrate réductase a été créée (Tableau 3.3). L'amplification générée par ces amorces est d'environ 100 pb. L'agent fluorescent liant l'ADN qui a été employé est le SYBR® Green (Life Technologies, Carlsbad, CA, É-U). Le volume de chaque réaction de qPCR totalisait 20 μ L et contenait : 10 μ L de PerfeCTa SYBR® Green Fast Mix (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, É-U), 4,2 μ L d'H₂O milliQ, 0,4 μ L de chacune des amorces à 10 pmoles/ μ L (Alpha DNA) et 5 μ L d'ADN 10 ng/ μ L provenant du biofilm ou 5 μ L de chaque point composant la courbe standard. Chaque réaction de qPCR du biofilm contenait 50 ng d'ADN. Les résultats se présentant en copies de gène/ng ADN, la valeur détectée par qPCR a été divisée par 50 après chaque analyse. Cependant, la valeur détectée lors de la réaction a toujours été 50 fois plus élevée, de manière à ne jamais s'approcher de la limite de détection de la méthode. Un blanc est également effectué avec 5 μ L d'eau milliQ en lieu d'ADN. Les échantillons composant la courbe

standard et le blanc ont été effectués en triplicatas techniques et les échantillons à doser en triplicatas biologiques. L'ADN a été quantifié par qPCR dans le mode « Three Steps with Melt » du logiciel « Rotor-Gene 6000 Series Software » (Corbett Life Science), pour une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et d'émission de 525 nm, en utilisant le « Rotor-Gene 6000 realtime rotary analyzer » (Corbett Life Science). L'amplification a débuté par une étape de dénaturation initiale à 95 °C pour 10 minutes. Ensuite des étapes de dénaturation à 95 °C, d'hybridation des amorces à 61 °C et d'élongation à 72 °C, toutes de 30 secondes, ont été répétées pendant 40 cycles.

L'efficacité de la qPCR a été calculée à partir de la pente de la courbe standard selon la formule suivante : $E=(10^{-1/pente})-1$. Afin d'assurer une réaction et une quantification efficace, cette valeur doit se situer entre 0,9 et 1,1 lors de chaque réaction. Également, pour évaluer la spécificité des amplicons, une courbe de fusion couvrant 65 à 99 °C a été réalisée en augmentant graduellement la température de 0,4 °C toutes les cinq secondes. Une amplification spécifique a été observée pour l'ADN extrait du biofilm, ainsi qu'une absence de dimères d'amorces pour chaque paire d'amorces.

Tableau 3.3Paires d'amorces spécifiques utilisées pour la quantification de Methylophaganitratireducenticrescens JAM1 et Hyphomicrobium nitrativorans NL23, dans les échantillonsd'ADN provenant du biofilm, par qPCR

Nitrate réductase	Nom	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (⁰ C)
narG1	narG1313f-JAM1	AGCCCACATCGTATCAAGCA	
	narG1461r-JAM1	CCACGCACCGCAGTATATTG	61
napA	napA1415f-NL23	AGGACGGGCGGATCAATTTT	
	napA1526r-NL23	CGGATATGCATCGGACACGA	61

narG1 réfère à Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 et napA à Hyphomicrobium nitrativorans NL23

3.4 Activité dénitrifiante du biofilm

Lors de l'adaptation du biofilm au mode cuvée, des suivis journaliers de son activité dénitrifiante ont été réalisés afin d'assurer une quantité de nitrate et de méthanol adéquate dans son milieu de culture et ainsi favoriser son développement et maximiser son activité dénitrifiante (section 3.1.2). Au cinquième repiquage, la colonisation des supports par le biofilm de même que son activité dénitrifiante s'étant grandement intensifiées, cette dernière a été évaluée. Pour ce faire, 15 des 20 supports colonisés ont été transférés en milieu frais supplémenté en nitrate et en méthanol. Ces 15 supports ont été préalablement lavés dans 30 mL de milieu frais non supplémenté dans lequel ils se sont développés pour enlever toutes traces de résidus de nitrate et de méthanol. Des analyses de chromatographie ionique et de Bradford ont été réalisées pour évaluer l'activité dénitrifiante à plusieurs niveaux. La même méthodologie a été appliquée concernant les supports de deuxième génération.

3.4.1 Suivi de la réduction du nitrate et du nitrite par chromatographie ionique

Des prélèvements ont été effectués dans le milieu de culture du biofilm afin d'y déterminer la quantité de nitrate (mg-N L^{-1} de NO₃⁻) et de nitrite (mg-N L^{-1} de NO₂⁻) par chromatographie ionique. Lors des suivis journaliers, un seul prélèvement était effectué, mais lors de la réalisation de cinétiques de dénitrification au cinquième repiquage (supports de première génération ou adaptation) ou aux 10^{ème}, 15^{ème}, 20^{ème} et 25^{ème} repiquages (supports de deuxième génération), ils étaient réalisés à intervalle régulier jusqu'à la disparition complète du nitrite.

Ce sont des échantillons d'environ 500 μ L qui ont été prélevés à la seringue dans le milieu de culture de chaque fiole. Ils ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur analyse dans le chromatographe ionique « 850 Professional IC » (Metrohm, Riverview, FL, É-U) où ils ont préalablement été décongelés à température pièce et centrifugés pour 2 min à 16 000 g. Pour chaque échantillon, un volume de 300 μ L de surnageant a été prélevé et introduit dans un récipient à échantillon (Metrohm). Ces derniers ont été ordonnés sur un carrousel de type « 858 Professional Sample Processor » (Metrohm). Pour chaque échantillon, 80 μ L ont été dilués dans

8 mL d'eau par le chromatographe ionique (Metrohm) qui permet de séparer les deux ions d'intérêts de l'échantillon grâce à une colonne cationique. La colonne utilisée est de type « METROSTEP A Supp 5 250/4.0 » (Metrohm) et mesure 250 mm x 4 mm. Elle contient des particules de 5 μm composées de groupements d'ammonium et d'alcool polyvinyle. Ainsi, les anions de nitrite et nitrate entraient à un débit de 0,7 mL/min moyennant une pression de 11 MPA et s'associaient aux cations de la colonne, ce qui ralentissait leur passage. Au même moment, de l'éluant composé de Na₂CO₃ 3,2 mM et NaHCO₃ 1 mM traversait la colonne au même débit pour faire compétition aux anions d'intérêts et les faire sortir de la colonne respectivement 11 et 15 minutes après leur entré. À leur sortie, les deux ions ont été détectés et quantifiés par le « 887 Professional UV/VIS detector » (Metrohm) utilisé avec le logiciel « MagIC Net 2.3 » (Metrohm) qui a permis l'interprétation des données en ppm.

Concernant la cinétique de dénitrification, des courbes de réduction de nitrate et de nitrite ont été réalisées en calculant la moyenne et l'écart type des prélèvements pris chez les réplicats à différents temps. Avec ces données, la réduction de l'azote provenant du nitrate et du nitrite, dit *azote total* (NO_x-N), pour chacun des réplicats pris individuellement, a pu être visualisée en additionnant les valeurs de ces deux ions au niveau de l'azote pour un même temps. La pente de la portion linéaire de cette droite de régression, où les enzymes sont pleinement actives et saturées en substrats, a été calculée en valeur absolue dans Excel (Microsoft, Redmond, WA, É-U) et a permis l'obtention, pour chaque réplicat, d'un *taux de dénitrification* en mg-N L⁻¹ h⁻¹. Dépendamment de la dynamique de l'activité dénitrifiante, la portion linéaire peut inclure toute la droite ou seulement une portion lorsqu'un ralentissement de l'azote total en fonction du temps est représentée graphiquement en calculant la moyenne des valeurs d'azote total pour un temps donné chez les trois réplicats.

3.4.2 Méthode de Bradford

Comme l'activité dénitrifiante du biofilm est influencée par sa quantité en biomasse, cette dernière a été déterminée au niveau de la concentration en protéines totale trouvée dans une fiole par la méthode de Bradford, pour chacun des réplicats. La collecte de la biomasse a toujours

immédiatement précédé les analyses de chromatographie ionique visant à établir la cinétique de dénitrification effectuée par le biofilm.

De 3 à 15 supports ont été grattés pour enlever le plus possible de biomasse, et dispersés dans 3 à 15 mL de milieu selon la quantité de biomasse grattée (1 mL par support). La biomasse grattée a été centrifugée et le culot a ainsi été isolé. Ensuite, la biomasse en suspension proportionnelle à la quantité de supports à doser a été ajoutée. Pour ce faire, la biomasse en suspension totale a été collectée, centrifugée (5 540 g pour 30 min) et dispersée dans 15 mL de milieu. De 3 à 15 mL de cette biomasse en suspension ont été ajoutés au culot de supports grattés (1 mL par support). Un volume de 1 mL de biomasse totale (support et suspension) a été pris, centrifugé (2 min à 16 000 g) et dispersé dans 1 mL de NaOH 0,1 M. Les tubes ont été vortexés pour 30 secondes et ont été chauffés sur une plaque chauffante à 70 °C pour une heure en les vortexant encore pour 30 secondes à la mi-temps et au temps final. Les homogénats ont ensuite été dilués 20, 50 et 100 fois dans du NaOH 0,1 M (Fisher Scientific) pour un volume total de 1 mL. Une courbe standard dont la concentration en protéines est connue a été réalisée avec de l'albumine sérine bovine 1 mg/mL (Sigma-Aldrich) et du NaOH 0,1 M (Fisher Scientific). La courbe standard s'étalait de 8 à 50 µg. Un blanc ne contenant que du NaOH a également été réalisé pour éliminer le bruit de fond. Un volume de 160 µL de chaque échantillon dilué a été déposé en triplicata sur une plaque de 96 puits (Fisher Scientific). Ce volume a été mélangé à 40 µL de réactif de Bradford « Quick StartTM Bradford 1x Dye Reagent » (Bio-Rad Laboratories). Les protéines présentes dans un échantillon dilué se lient au réactif de Bradford, ce qui change son absorbance de façon proportionnelle à la quantité de protéines liées. L'absorbance de chaque échantillon dilué a ensuite été lue à 595 nm par l'appareil « Infinite® M1000 PRO » (Tecan, Maennedorf, Suisse). Il est possible d'y déterminer la quantité en protéines en placant les valeurs d'absorbances associées aux échantillons biologiques dilués sur la courbe standard, dont la concentration en protéines et l'absorbance associée sont connues. Si l'absorbance d'un échantillon dilué n'est pas incluse dans la courbe standard, il n'est pas considéré, d'où l'importance de réaliser plusieurs dilutions différentes pour un même échantillon (1:20, 1:50 et 1 :100). La concentration en protéines pour un échantillon donné est une moyenne qui inclut les réplicats techniques et les échantillons dilués dont l'absorbance est incluse dans la courbe standard.

La valeur obtenue de l'échantillon de 1 mL dosé par la méthode représente la concentration en protéines trouvée dans 1 support ainsi que la biomasse en suspension associée. Comme chaque fiole contenait toujours 15 supports lors de l'établissement de la cinétique de dénitrification, cette concentration a été extrapolée à l'ensemble de la fiole en multipliant par 15.

3.4.3 Calcul du taux de dénitrification spécifique

Le taux de dénitrification spécifique a été calculé en mg-N $L^{-1} h^{-1}$ mg-protéines⁻¹ pour chaque réplicat pris individuellement en divisant le taux de dénitrification (section 3.4.1) par la quantité en protéine retrouvée dans la fiole correspondante (section 3.4.2). Pour une condition donnée réalisée en triplicata, le taux de dénitrification spécifique moyen intègre les trois valeurs obtenues. Un écart type est également associé à cette moyenne en considérant les mêmes valeurs.

3.4.4 Test statistique ANOVA sur le taux de dénitrification spécifique

Pour étudier la présence ou l'absence de différences significatives entre les taux de dénitrification spécifiques obtenus du biofilm opéré en conditions potentiellement optimales pour une durée de cinq repiquages (sections 4.4 à 4.6), des analyses de la variance (ANOVA) selon une procédure « General Linear Model » (GLM) ont été réalisées sur les données propres à chacune des études via l'utilisation du logiciel statistique SAS (SAS Institute Inc., Cary, CN, É-U).

Pour démontrer si le modèle à l'étude explique ou non la variance observée au niveau du taux de dénitrification spécifique, il a été vérifié pour un seuil alpha de 5 % (la limite supérieure significative). Ensuite, le niveau de signification de chacune des sources de variation potentielles présentes au sein du modèle a été vérifié suite au calcul d'un test de Fischer pour un seuil alpha de 5 %. Ce test permet de démontrer si une source de variation, par exemple la concentration en NaCl, influence significativement le taux de dénitrification spécifique. Cependant, il ne permet pas de cibler laquelle ou lesquelles des concentrations testées engendrent cette différence

significative. C'est pourquoi ensuite, un test de comparaisons multiples de Duncan est effectué pour un seuil alpha de 5 %. Ce dernier compare mathématiquement toutes les données présentes au sein d'une source de variation les unes avec les autres et permet de cibler celles engendrant des différences significatives en les classant en diverses catégories représentées par des lettres. Les valeurs associées à des lettres similaires appartiennent au même groupe et ne présentent pas de différence significative les unes avec les autres quant à leur effet sur le taux de dénitrification spécifique. Cependant, celles associées à des lettres différentes appartiennent à des groupes différents et confèrent des différences significatives (voir les annexes C, D et F pour une représentation du test statistique ANOVA).

3.5 Analyse du métagénome 16 S

Chaque condition étant effectuée en triplicata, l'ADN a été extrait individuellement chez chacun des réplicats, après cinq repiquages de culture sur la biomasse grattée sur un support, comme indiqué dans la section 3.2.1. Puis, 10 μ L de chacun des 3 réplicats ont été mélangés ensemble dans un tube de 1,5 mL. L'ADN a été quantifié par la trousse de « Quant-iTTM PicoGreen® dsDNA Assay Kit » (Life Technologies) (section 3.3.1) et 25 μ L ont été envoyés au Research and Testing Labatory (Lubbock, Texas, É-U) pour une analyse de pyroséquençage des gènes de l'ARNr 16S sur les régions variables V1 à V3. La technologie 454 a été utilisée.

La technologie 454 implique que l'ADN de l'échantillon a été fragmenté et que des adaptateurs « A » et « B » ont été joints aux extrémités. Des billes ont été ajoutées à l'ADN et chaque brin possédant l'adaptateur « B » s'est lié avec une seule bille possédant une région complémentaire en sa surface (Peyretaillade, n.d.). Ces billes ont ensuite été émulsifiées dans une huile possédant tous les réactifs et autres éléments nécessaires à la réaction de PCR et l'adaptateur « A » a permis la fixation de l'ADN polymérase au brin à amplifier (Peyretaillade, n.d.). Une fois la réaction terminée, les billes ont été déposées sur une plaque en fibre optique picotitré où les pores ne laissaient pénétrer qu'une seule bille. Dans chaque puits, la réaction de pyroséquençage a débuté sur les brins dénaturés après l'ajout de désoxynucléotides triphosphates, d'ADN polymérase, d'ATP sulfurylase, de luciférine, de luciférase et d'apyrase. Les désoxynucléotides triphosphates complémentaires au brin dénaturé ont été ajoutés les uns à la

suite des autres et entre chaque appariement, ceux non appariés ont été éliminés par l'apyrase. Un bon appariement a permis la libération d'un pyrophosphate qui a été converti en ATP par l'ATP sulfurylase. L'oxyluciférine a ensuite été produite par le couplage de l'ATP à la luciférine par la luciférase, résultant en une production d'un signal lumineux détectable par un capteur CCD (Charge-couppled device). Ce signal a été traduit sous forme de pyrogramme (Peyretaillade, n.d.). La diversité des séquences obtenues a ensuite été analysée par appariement de séquences complémentaires dans une banque de données génomiques.

Une fois la réaction de séquençage terminée, pour chaque échantillon d'ADN, près de 10 000 séquences d'environ 450 pb ont été obtenues. Elles ont été analysées par des techniques de bioinformatique quant à leur qualité (absence de chimères (UCHIIME) et correction des mauvais appariements de nucléotides dans la séquence (denoising)). L'affiliation au genre le plus probable a été faite par un regroupement des séquences ayant une divergence de moins de 3 % et leurs analyses avec le programme BLAST dans les banques de données.

3.6 Isolats provenant du biofilm cultivé en mode cuvée pour 5 repiquages

Dans le but d'obtenir des isolats bactériens provenant du biofilm cultivé en mode cuvée et d'y identifier ceux possédant une activité dénitrifiante, le biofilm obtenu après cinq repiquages en milieu dénitrifiant EMS avec 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃ à 23 ^oC (culture de référence) a été inoculé sur différents milieux solides.

3.6.1 Milieux de culture choisis

<u>A. Milieu Marin 2216 (MM) pour la culture d'hétérotrophes (DifcoTM Marine Broth 2216 (Becton, Dickinson and Company))</u>

Milieu liquide : Ce milieu se présente sous forme d'une poudre contenant tous les éléments nécessaires à la culture de bactéries hétérotrophes marines. Il possède une salinité de 1,95 % NaCl et contient des peptones et des extraits de levure (sources de carbone). Une quantité

de 37,4 g a été mélangée à 1 litre d'eau milliQ, pour créer un milieu à concentration 1 X, et le tout a été stérilisé à l'autoclave (121 ^oC pour 20 min). Le pH du milieu était de 7,6 \pm 0,2. La température d'incubation était de 27 ^oC.

<u>B. Milieu R2A (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, É-U) pour la culture d'hétérotrophes à</u> croissance lente tolérant moins bien le NaCl

Ce milieu se présente sous forme d'une poudre contenant tous les éléments nécessaires à la culture de bactéries hétérotrophes non marines. Les sources de carbone qu'il contient sont les suivantes : protéose peptone, acide casaminique, dextrose, amidon soluble et extrait de levure. Une quantité de 15,2 g a été mélangée à 1 litre d'eau milliQ et le tout a été stérilisé à l'autoclave (121 °C pour 20 min). Le pH du milieu était de 7,0 \pm 0,2. La température d'incubation était de 30 °C.

C. Milieu 1403 (ATCC, Manassas, VA, É-U) pour la culture de Methylophaga

La base minérale de ce milieu comprend, par litre : 24 g NaCl, 3 g MgCl₂*6H₂O, 2 g de MgSO₄*7H₂O, 0,5 g de KCl, 1 g de CaCl₂ et 0,5 g de Bis-Tris (Fisher Scientific). Une fois les poudres dissoutes, le pH a été ajusté à 8,0 et le milieu a été autoclavé (121 ^oC pour 20 min). Puis, lorsqu'il a atteint la température pièce, les solutions stériles suivantes ont été ajoutées : 3 mL de méthanol (seule source de carbone) (Fisher Scientific), 20 mL de solution T à pH 8,0 (KH₂PO₄ 7 g L⁻¹, NH₄Cl 100 g L⁻¹, Bis-Tris 100 g L⁻¹, Ferric ammonium citrate 3 g L⁻¹) (Fisher Scientific), 10 mL de solution Wolf à pH 8,0 (ATCC) et 1 mL de vitamine B₁₂ 0,1 mg/mL (Bio-Rad Laboratories). La température d'incubation était de 30 ^oC.

D. Milieu EMS (Atlas, 2004) pour favoriser la croissance d'un maximum d'espèces.

Comme indiqué dans la section 3.1.1. Après l'autoclavage, le milieu a été supplémenté de 300 mg-N L^{-1} de NaNO₃ (Fisher Scientific), la seule source d'azote, et 3 mL de méthanol (Fisher Scientific), la seule source de carbone. La température d'incubation était de 30 ^oC.

La description des milieux indiqués ci-dessus s'applique à une incubation en conditions aérobies. Pour chacun des milieux de culture présentés, une incubation en conditions dénitrifiantes (anaérobies) a également été effectuée. Pour ce faire, chaque milieu a été supplémenté de 300 mg-N L^{-1} de NaNO₃ (Fisher Scientific), à l'exception du milieu EMS.

Les mêmes milieux ont été utilisés pour produire des géloses avec 1,5 % de Bacto[™] Agar (Becton, Dickinson and Company). Pour éviter que le milieu précipite lors de la stérilisation, un milieu liquide à concentration 2X des constituants a été généré en plus d'une solution d'agar de 3 %. Les deux solutions ont été autoclavées séparément avant d'être mélangé dans un ratio de 1:1. Si applicables, les autres éléments ont été ensuite ajoutés stérilement, avant que la solution ne soit coulée (25 mL) dans des boîtes de Pétri (géloses).

3.6.2 Méthodologie de culture et d'incubation pour l'obtention d'isolats

Étape 1 (Fig. 3.4) : La biomasse de trois supports a été grattée et homogénéisée dans 2 mL de saline 3 % (p/v) (Fisher Scientific). Pour laver les cellules, une centrifugation de 2 min à 16 000 g a été effectuée avant que le surnageant ait été retiré et que le culot ait été dispersé dans 1,5 mL de saline 3 % (p/v) (Fisher Scientific). Un volume X (environ 1 mL) de cette suspension cellulaire a été mélangés à un volume Y (environ 9 mL) de saline 3 % (p/v) (Fisher Scientific) dans des tubes coniques de 15 mL, de manière à obtenir un volume total de 10 mL possédant une densité optique de 0,75 suite à une lecture au spectrophotomètre ($\lambda = 600$ nm) (Milton Roy, Ivyland, PA, É-U). Puis, une série de dilutions séquentielles de 10⁻² à 10⁻¹⁰ totalisant 10 mL a été effectuée avec de la saline 3 % (p/v). La détermination de la biomasse a été effectuée au spectrophotomètre, car la méthodologie découlant de l'utilisation de cet appareil est très rapide. Le but était d'effectuer la série de dilutions séquentielles et la mise en culture subséquente rapidement pour favoriser le maintien et l'activité d'un maximum d'espèces dans l'inoculum de départ (la biomasse de l'inoculum se trouve en présence d'oxygène, dans la saline 3 % dépourvue de nitrate de sodium et de méthanol).

Étape 2 (Fig. 3.4) : Une quantité de 100 μ L des dilutions a été étalée sur chacun des quatre milieux de culture solides présentés ci-haut. Le tout a été incubé sous conditions aérobies

ou en conditions dénitrifiantes. Les géloses ont été fermées avec du Parafilm (Sigma-Aldrich) et incubées à leur température respective jusqu'à l'apparition de colonies (maximum 1 semaine), avant d'être conservés à 4 °C. Les incubations en conditions aérobies ont été effectuées dans des incubateurs standards et les incubations en conditions dénitrifiantes ont été effectuées en jarres étanches (Quelab) placées dans ces mêmes incubateurs. Dans la jarre, les conditions anaérobies ont été créées en ajoutant une pochette de type « BBLTM GasPakTM Plus Anaerobic System » et ont été surveillées par l'ajout de l'indicateur d'oxygène Anaerotest® (Merck Millopore, Darmstadt, Allemagne).

Étape 3 (Fig. 3.4) : Après culture sur géloses, celles contenant des colonies isolées $(10^{-3} \text{ à } 10^{-7} \text{ selon le milieu})$ ont été sélectionnées. En fonction de leur phénotype différent, une cinquantaine de colonies ont été piquées avec un cure-dent stérile dans 3 mL de leur milieu liquide respectif. Pour les milieux MM, R2A et EMS incubés en conditions aérobie et dénitrifiante, toutes les colonies à phénotypes différents ont été sélectionnées en duplicata (deux colonies différentes présentant le même phénotype ont été sélectionnées pour chacun des différents phénotypes observés). Pour le milieu 1403, seul un phénotype semblait prôner et 10 colonies ont été sélectionnées au hasard après incubation en conditions aérobie et dénitrifiante. Les bouillons ont ensuite été incubés jusqu'à ce qu'ils deviennent opaques (maximum 1 semaine) et ont été conservés à 4 °C. Les incubations en conditions aérobies se sont faites dans des incubateurs standards sous agitation de 250 RPM et les incubations en conditions dénitrifiantes en jarre et sans agitation, comme indiqué plus haut.

Étape 4 (Fig. 3.4) : Après la culture en milieu liquide, un ensemencement en milieu solide selon la technique des stries en épuisement à trois cadrans a été effectué au manche de Koch sur le milieu respectif correspondant à chaque bouillon. Le but de cette procédure était d'obtenir des colonies isolées et d'assurer la pureté de l'isolat. Les milieux ont été incubés jusqu'à l'apparition de colonies (maximum 1 semaine) et ont ensuite été conservés à 4 $^{\circ}$ C.

Étape 5 (Fig. 3.4) : Finalement, des colonies isolées ont été sélectionnées sur chaque gélose déjà identifiée d'un chiffre auquel la lettre « A » a été ajoutée à l'identification. Si sur la gélose il y avait des colonies avec une autre morphologie, la lettre B a été ajoutée à l'identification de celle-ci. Ces colonies isolées ont été piquées dans le bouillon liquide correspondant, comme décrit dans l'étape 3. Les bouillons ont été incubés jusqu'à l'atteinte de

l'opacité. Pour les cultures incubées en conditions dénitrifiantes depuis l'étape 2, l'analyse de la réduction du nitrate et du nitrite par chromatographie ionique a été réalisée après 4 jours d'incubation.

Étape 6 (Fig. 3.4) : Concernant les cultures ayant été cultivées en conditions aérobies lors des 4 étapes de purification précédentes, des tests en fioles dénitrifiantes ont été réalisés pour évaluer leur potentiel. Une quantité de 30 mL de chaque milieu dans lequel un candidat à tester a été cultivé préalablement a été introduite dans une fiole de 60 mL où des conditions dénitrifiantes ont été obtenues (section 3.1.1) et où tous les milieux ont été supplémentés de 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃ (Fisher Scientific). Ensuite, ces fioles ont été autoclavées et la biomasse provenant du dernier bouillon liquide (paragraphe ci-haut) a été ensemencée dans la fiole correspondante avec une aiguille $18_G1\frac{1}{2}$ (Becton, Dickinson and Company) de manière à obtenir une densité optique de 0,1 dans chaque fiole. Après 4 jours d'incubation, l'analyse de la réduction de nitrate et de nitrite par chromatographie ionique a été réalisée. Des contrôles négatifs exempts de biomasse ont été réalisés lors de chaque étape.



Figure 3.4 Méthodologie de culture et d'incubation pour l'obtention d'isolats purs et l'analyse de leur potentiel dénitrifiant. L'image représente le milieu MM (section 3.6.1 A) incubé à 27 ^oC en conditions aérobies ou dénitrifiantes, à l'état liquide ou solide. Une colonie ayant poussée sur le milieu solide en conditions aérobies à l'étape 2 est cultivée et purifiée dans ce même milieu (liquide ou solide) en conditions aérobies jusqu'à l'analyse de son potentiel dénitrifiant à l'étape 6.

3.6.3 Analyse de l'activité dénitrifiante

Des prélèvements de 500 μ L ont été réalisés à la seringue sur le contrôle négatif associé à chaque type de milieu de culture et sur chacun des isolats au début d'incubation (temps 0) et

après les quatre jours d'incubation (temps final). Les prélèvements ont été analysés par le chromatographe ionique (section 3.4.1) qui a relevé la présence ou l'absence de nitrate et de nitrite en fin d'incubation en comparaison avec le temps 0.

3.6.4 Identification et conservation des isolats

L'identification des isolats récoltés après les étapes de culture et de purification a d'abord passé par une étape d'extraction d'ADN (section 3.2.1). Pour ce faire, à partir de boîtes de Pétri contenant des colonies isolées pour chacun des isolats (section 3.6.2 étape 4), la même colonie qui avait été piquée pour effectuer le test en conditions dénitrifiantes a été repiquée dans 5 mL du bouillon liquide correspondant, qui a été incubé selon la méthodologie appropriée en fonction de l'isolat (Fig. 3.5). À l'atteinte d'une densité optique correspondant à la phase exponentielle de culture, 1 mL de culture a été mélangé à 1 mL de glycérol 50 % (p/v) (Fisher Scientific) stérile. Le tout a été congelé à -80 °C dans deux tubes stériles à congélation (Thermo Scientific) bien identifiés. Des supports colonisés pendant cinq repiquages en mode cuvée, semblables à ceux représentant l'inoculum initial (section 3.6.2 étape 1), ont également été conservés à -20 °C dans le glycérol 20 %.

Une extraction d'ADN a été effectuée sur les 4 mL de culture restant, pour chaque isolat. Le gène de l'ARNr 16S a ensuite été amplifié par PCR (section 3.2.2) avec les amorces appropriées (Tableau 3.4). Puis, les échantillons ont été envoyés au Centre d'innovation Génome Québec (Université McGill) pour un séquençage Sanger des deux extrémités du produit de PCR. Par chevauchement de deux séquences, le gène 16S a pu être obtenu. Cette séquence a été ensuite comparée aux banques de données avec le programme BLAST pour une affiliation la plus probable.

Incubation en condition aérobie à 27 °C et culture dans le milieu MM (liquide et solide)



Figure 3.5 Méthodologie de culture pour la conservation et l'extraction d'ADN pour le séquençage des isolats dont l'activité dénitrifiante avait été testée préalablement. La colonie 1A qui a été piquée en milieu liquide sur cette image est la même que celle qui avait été piquée lors de l'analyse de l'activité dénitrifiante (Fig. 3.4).

Tableau 3.4Amorces utilisées pour l'amplification de gène codant pour l'ARNr 168 parPCR.

Nom	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (⁰ C)
PA ¹	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
PH^{1}	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	55

Légende : ¹ : Bruce *et al.*, 1992.

4 RÉSULTATS

4.1 Culture du biofilm en mode cuvée: culture de référence

L'objectif général de ce projet de recherche était d'évaluer l'incidence du mode d'opération cuvée sur l'activité dénitrifiante et la composition de la population bactérienne du biofilm. Comme le biofilm était congelé depuis plus de 7 ans lors du début du projet, nous avons voulu savoir si celui-ci pouvait être remis en activité dans le milieu EMS. De plus, ce milieu a été utilisé précédemment dans le laboratoire pour étudier le biofilm (Auclair *et al.*, 2010 et Labbé *et al.*, 2007). Ce milieu de culture est facile à faire en laboratoire et sa composition bien définie a permis une modification des composantes chimiques qu'il contient (par exemple la concentration en NaCl). Le milieu IO utilisé par le Biodôme de Montréal où le biofilm original s'est développé est plus complexe et se vend sous forme de poudre contenant un mélange de tous les éléments chimiques nécessaires à simuler l'eau de mer naturelle. Il était donc plus difficile d'y faire varier des paramètres chimiques.

Le biofilm congelé a été cultivé en mode cuvée sous conditions dénitrifiantes en présence de supports permettant l'attachement du biofilm. Le milieu contenait initialement 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃, du méthanol 0,15 %, 2,75 % NaCl, et avait un pH de 8,0. Les fioles ont été incubées à 23 °C sous agitation de 100 RPM. Ces conditions de cultures ont été définies comme la *culture de référence* tout au long de l'étude. Les supports ont été transférés à chaque semaine dans un milieu frais. Cinq transferts ont été faits. La réduction du nitrate et du nitrite a été suivie sporadiquement lors des cinq premiers transferts. La biomasse en suspension a été recueillie à la fin de chaque transfert et l'ADN a été extrait pour permettre l'amplification par PCR d'une partie des gènes de l'ARNr 16S. Les amplicons issus de ces PCR ont été résolus suite à une migration par électrophorèse de type DGGE pour suivre l'évolution de la flore bactérienne. L'ADN total a aussi servi pour quantifier les concentrations de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et de *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. Une biomasse plus abondante sur les supports au cinquième passage a permis d'extraire l'ADN du biofilm. Une cinétique de la réduction du nitrate et du nitrite a été ensuite faite à ce moment dans du milieu frais.

Le profil de la diversité bactérienne déterminé par PCR-DGGE sur les cinq transferts (Fig. 4.1) montre que la population bactérienne opérée en mode cuvée était fortement différente de celle congelée et qu'une stabilisation de la population bactérienne s'est opérée à partir du quatrième repiquage. Aussi, l'intensité des bandes suggère qu'il y a eu une augmentation de l'abondance de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 au fil des repiquages et une diminution d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 puisque la bande correspondante n'était plus visible sur gel à partir du deuxième repiquage. Finalement, les profils obtenus de la biomasse en suspension étaient similaires à ceux obtenus de la biomasse grattée sur un support. Cette similitude de même que la stabilisation de la population vers le quatrième repiquage est observée dans tous les profils de diversité bactérienne et ne sera plus mentionnée dans les études suivantes.



Figure 4.1 Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne lors de l'adaptation du biofilm pour la culture de référence. Des profils réalisés préalablement en triplicatas ont donné des résultats similaires. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1 à 5a). BC : biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal, 1 à 5b : repiquages 1 à 5.

Avec l'ADN extrait des cinq transferts, les concentrations de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 et d'Hyphomicrobium nitrativorans NL23 ont été déterminées par qPCR. La qPCR ciblait la nitrate réductase de chaque espèce, soit *narG1* pour la souche JAM1 et *napA* pour la souche NL23. Comme chacune de ces réductases n'est présente qu'en une seule copie dans le génome de l'espèce concernée, la quantification de chaque gène a permis une quantification de chaque espèce. Les résultats obtenus ont corroboré avec les tendances présentées par le profil de PCR-DGGE (Fig. 4.2). En effet, Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 est passé de 1,1 x 10³ copies de narG1/ng d'ADN dans le biofilm congelé à 8,7 x 10⁴ copies au cinquième repiquage (5b). Quant à *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, celui-ci est passé de 3,3 x 10^4 à 1,6 x 10^1 copies de *napA*/ng ADN au cinquième repiquage (5b). Il a donc été retrouvé en proportion 1 000 fois moindre que la souche JAM1. La quantification obtenue du cinquième repiquage à partir de la biomasse grattée sur un support et à partir de biomasse en suspension indique qu'une quantité légèrement inférieure de la souche NL23 a été détectée dans la biomasse en suspension.



Figure 4.2 Quantification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 par qPCR sur la culture de référence. Données issues de triplicatas. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1 à 5a). La qPCR a ciblé le gène *narG1* de la souche JAM1 et *napA* de la souche NL23. BC : biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal, 1 à 5b : repiquages 1 à 5.

La cinétique de l'activité dénitrifiante du biofilm a été réalisée après la fin du cinquième repiquage (Fig. 4.3). Une réduction complète du nitrate et du nitrite a été observée en 12 heures. Le nitrate a été entièrement consommé en 6 heures et le nitrite a été réduit environ deux fois plus lentement, résultant en une accumulation maximale dans le milieu de 138 mg-N L⁻¹. Les taux de dénitrification variaient de 29,5 à 33,1 mg-N L⁻¹ h⁻¹ selon le réplicat (Tableau 4.1). Cependant, comme l'activité dénitrifiante du biofilm aurait pu être influencée par la quantité en biomasse présente lors des analyses, un taux de dénitrification spécifique a été calculé en divisant le taux de dénitrification par quantité de protéines extraite de la biomasse totale dans les fioles, pour une valeur moyenne de 1,31 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹.



Figure 4.3 Réduction de nitrate, de nitrite et de l'azote total (NO_x) réalisée par la culture de référence. Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.
Tableau 4.1 Taux de dénitrification spécifique moyen de la culture de référence. Ce taux a été calculé à partir du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ¹	Écart type ¹
33,1	25,4	1,30		
30,5	24,1	1,26	1,31	0,05
29,4	21,6	1,37		

¹Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

4.2 Influence du milieu de culture

Nous avons comparé les deux milieux d'eau de mer artificielle, EMS vs IO, sur la communauté bactérienne et l'activité de dénitrification du biofilm. Les profils migratoires des PCR-DGGE ont montré certaines similitudes dans la diversité bactérienne entre les deux milieux de culture, à l'exemple de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 qui augmente en termes d'abondance au fil des repiquages (Fig. 4.4). La différence majeure observée entre ces deux milieux est la persistance d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 après cinq repiquages dans le milieu IO, alors que cette dernière souche disparait dans le milieu EMS. Aussi, dans le milieu IO, une bande apparaissant dans le haut du gel au premier repiquage est conservée jusqu'au cinquième, et la diversité bactérienne de même que sa distribution semble plus importante.



Figure 4.4 Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne lors de l'adaptation du biofilm dans le milieu EMS (A) et IO (B). Profils réalisés préalablement en triplicatas avec des résultats similaires. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1, 3 et 5a). BC : biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal, 1, 3, 5a et 5b : repiquages 1, 3, 5 et 5.

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 a augmenté dans l'EMS au fil des repiquages pour atteindre 3,80 x 10^5 copies de *narG1*/ng ADN au cinquième repiquage (5b) alors qu'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 a diminué jusqu'à l'atteinte de 1,99 x 10^2 copies de *napA*/ng ADN (Fig. 4.5). Dans le milieu IO, la souche JAM1 a atteint 5,29 x 10^4 copies de *narG1*/ng ADN au cinquième repiquage (5b) et la souche NL23 n'a diminué qu'à 6,61 x 10^4 copies de *napA*/ng ADN. Les deux souches d'intérêt y étaient donc retrouvées au même niveau, comme observé lorsque le biofilm était opéré en mode continu (Auclair *et al.*, 2012).



Figure 4.5 Quantification par qPCR de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 (A) et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 (B) dans le biofilm adapté aux milieux EMS et IO. La ligne pointillée représente la concentration retrouvée dans la biomasse congelée (BC) en provenance du Biodôme de Montréal. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1, 3 et 5a). 1, 3, 5a et 5b : repiquages 1, 3, 5 et 5.

Le nitrate a été réduit en 6-8 heures et le nitrite en 14 heures par le biofilm cultivé dans l'EMS, contrairement à plus de 25 et 30 heures pour la réduction respective de nitrate et de nitrite en milieu IO (Fig. 4.6). Le taux de dénitrification avec le milieu EMS était d'environ 26 mg-N $L^{-1} h^{-1}$ et d'environ 10,5 mg-N $L^{-1} h^{-1}$ dans le milieu IO (Tableau 4.2). Cependant, la concentration en protéines mesurée sur le biofilm s'étant développé dans le milieu EMS était également près de 2,5 fois supérieure à celle du biofilm s'étant développé dans l'IO, avec pour résultats des taux de dénitrification spécifiques similaires pour le biofilm dans ces deux milieux de culture.



Figure 4.6 Activités dénitrifiantes du biofilm adapté aux milieux EMS et IO. Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

Tableau 4.2 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm adapté aux milieux EMS et IO. Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

Milieu de culture	Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ¹	Écart type ¹
	28,0	29,1	0,96		
EMS	26,1	27,4	0,95	0,96	0,01
	25,3	26,1	0,97		
Ю	10,2	12,3	0,83		
	10,8	11,5	0,94	0,93	0,09
	10,8	10,8	1,00		

¹Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

4.3 Influence de paramètres physicochimiques sur l'activité dénitrifiante du biofilm

À partir des supports de première génération obtenus au 5^{ème} repiquage et <u>issus de la</u> <u>culture de référence</u>, de nouveaux supports ont pu être colonisés jusqu'au 10^{ème} repiquage (Fig. 3.2). Cette procédure a été répétée à quatre reprises, portant le nombre total de repiquages à 10, 15, 20 et 25. Ces nouvelles séries de repiquage ont permis d'estimer l'influence de plusieurs paramètres physicochimiques sur la performance de dénitrification du biofilm. L'étude est caractérisée de préliminaire puisque le biofilm (supports de deuxième génération) s'est développé dans les conditions standards de culture et d'incubation (semblables à celles employées pour la culture de référence) avant d'être exposé à divers paramètres physicochimiques au moment de l'atteinte des 10^{ème}, 15^{ème}, 20^{ème} et 25^{ème} repiquages. Cette approche visait à cibler des conditions de culture et d'incubation qui seraient en mesure d'optimiser subséquemment l'activité dénitrifiante du biofilm pour qu'ensuite une autre étude où le biofilm serait cultivé dans ces conditions dès son premier jour d'incubation soit effectuée.

4.3.1 Liste des paramètres physicochimiques testés sur les supports de deuxième génération en fonction des repiquages

La méthodologie pour augmenter le nombre de supports colonisés en mode cuvée a été répétée à quatre reprises. Lors des 10^{ème}, 15^{ème}, 20^{ème} et 25^{ème} repiquages, les supports de deuxième génération fraîchement colonisés dans les mêmes conditions que la culture de référence ont été utilisés pour tester l'influence des paramètres physicochimiques suivants :

10^{ème} repiquage : l'influence de la concentration en nitrate et en méthanol.

15^{ème} repiquage : l'influence de la concentration en méthanol seulement.

20^{ème} repiquage : l'influence de la quantité en nitrate seulement.

25^{ème} repiquage : l'influence du pH et de la salinité du milieu de culture ainsi que de la température d'incubation. Le biofilm a été incubé préalablement pendant 48 heures dans les mêmes conditions à tester. Cette période visait à permettre une certaine adaptation du biofilm envers les nouvelles conditions auxquelles il a été exposé. Après 48 heures, les supports ont été transférés en milieu frais et l'analyse de l'activité dénitrifiante, des profils de diversité bactérienne par PCR-DGGE et de la quantification des souches NL23 et JAM1 ont été réalisés.

4.3.2 Suivi de la population bactérienne des supports de deuxième génération

Des profils de la diversité bactérienne par PCR-DGGE sur les supports de deuxième génération ont été réalisés, pour examiner la diversité bactérienne qui s'y était implantée en comparaison avec celle issue des supports de première génération. Les extractions d'ADN ont toutes été réalisées sur la biomasse grattée sur un support.

Les profils de diversité bactérienne des supports de deuxième génération et ceux de première génération étaient très similaires (Fig. 4.7). La bande représentant la souche *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 était toujours présente sur les supports de deuxième génération contrairement à la souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. Des variations mineures au niveau de la population bactérienne correspondant à l'apparition de deux nouvelles bandes et à la disparition d'une bande ont toutefois été observées sur ces supports de

deuxième génération. Des résultats très similaires ont été observés sur les supports de deuxième génération obtenus aux 10^{ème}, 20^{ème} et 25^{ème} repiquages (annexe A).



Figure 4.7 Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne des supports de première génération (PG) et de deuxième génération (DG). Conditions de culture et d'incubation de la culture de référence. Profils réalisés préalablement en triplicatas avec des résultats similaires. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support. Le profil DG est associé à un support de deuxième génération obtenu au 15^{ème} repiquage.

Les concentrations des souches *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 ont montré que la souche JAM1 a été conservée dans le même ordre de grandeur (environ 10^5 copies de *narG1*/ng ADN) sur les supports de deuxième et de première génération (Fig. 4.8). Par contre, la souche NL23, retrouvée en très faible proportion dans les supports de première génération, n'a pas été détectée dans les supports de deuxième génération. Des résultats très similaires ont été observés sur les supports de deuxième génération obtenus aux $15^{\text{ème}}$, $20^{\text{ème}}$ et $25^{\text{ème}}$ repiquages (annexe B).



Figure 4.8 Quantification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 par qPCR sur les supports de première génération (PG) et de deuxième génération (DG). Conditions de culture et d'incubation de la culture de référence. Données issues de triplicatas. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support. La quantification DG est associée à un support de deuxième génération obtenu au 10^{ème} repiquage.

4.3.3 Influence de la concentration en nitrate et en méthanol (C/N = 1,5)

Le biofilm a été transféré dans le milieu EMS avec des concentrations de 300, 600, 900, 1 500 ou 3 000 mg-N L⁻¹ de nitrate tout en respectant un ratio C/N de 1,5 avec le méthanol. L'exposition à 300 mg-N L⁻¹ a constitué la culture de référence. Pour chacune des concentrations en nitrate testées, à l'exception de 3 000 mg-N L⁻¹, le taux de réduction était plutôt similaire (Fig. 4.9A). En effet pour une exposition à 300 mg-N L⁻¹, le nitrate a été réduit en 6 heures et ce temps de réduction a augmenté de façon approximativement proportionnelle à la quantité de nitrate à laquelle le biofilm a été exposé. Curieusement, pour chacune des concentrations en nitrate testées (Fig. 4.9B), l'accumulation de nitrite n'a pas augmenté de façon proportionnelle. En fait, elle n'a jamais dépassé les 200 mg-N L⁻¹, suggérant que cette concentration est un facteur limitant dans l'activité de dénitrification. Les taux de dénitrification spécifiques variaient de 0,95 à 1,64 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ et le plus élevé a été obtenu lorsque le biofilm a été exposé à 900 mg-N L⁻¹, il y a eu une inhibition complète de la réduction de nitrate.



Figure 4.9 Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à diverses concentrations de nitrate (C/N = 1,5). Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Données issues de triplicatas.



Figure 4.10 Activités dénitrifiantes du biofilm exposé 3 000 mg-N L^{-1} de nitrate (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

Tableau 4.3 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à diverses concentrations de nitrate (C/N = 1,5). Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Données issues de triplicatas.

Nitrate (mg-N L ⁻¹) ¹	Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ²	Écart type ²
	25,8	27,5	0,94		
300	25,9	29,3	0,89	0,95	0,07
	25,8	25,0	1,03		
	40,3	32,0	1,26		
600	40,4	23,3	1,73	1,46	0,24
	41,5	29,7	1,40		
	42,1	25,3	1,66		
900	39,3	22,3	1,77	1,64	0,14
	39,7	26,6	1,50		
1 500	32,2	19,1	1,69		
	36,4	30,2	1,21	1,36	0,29
	37,1	31,5	1,18		

¹ L'exposition à 3 000 mg-N L⁻¹ n'est pas présentée dans ce tableau étant donnée l'absence d'activité dénitrifiante.

² Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

4.3.4 Influence de la concentration en méthanol (C/N variable)

Le biofilm a été transféré dans le milieu EMS avec des concentrations de 0,0; 0,05; 0,15 ou 0,5 % de méthanol, tout en maintenant la concentration du nitrate à 300 mg-N L⁻¹ (C/N variable). L'exposition à 300 mg-N L⁻¹ et à 0,15 % de méthanol a constitué la culture de référence. Pour chacune des concentrations en méthanol (sauf à 0,0 %), la réduction du nitrate a été similaire et s'est effectuée en environ 10 heures (Fig. 4.11A). Le nitrite s'est accumulé pendant 8 heures dans tous les cas (sauf à 0,0 %), pour ensuite être complètement réduit en 16 heures à 0.15 et 0.5 % de méthanol (Fig. 4.11B). Par contre, la performance de réduction du nitrite était diminuée dans les cultures de 0,05 % de méthanol avec une accumulation plus élevée et une réduction totale après plus de 18 heures (Fig. 4.11C). Pour une exposition à 0,0 % de méthanol, la réduction de nitrate a été drastiquement diminuée et a semblé s'estomper graduellement avec le temps (Fig. 4.12). En 48 heures, 80 % du nitrate a été réduit et ce ralentissement a empêché une accumulation de nitrite dans le milieu, car celui-ci a été réduit simultanément. Les taux de dénitrification spécifiques de 0,77 et 0,78 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻ ¹ ont été calculés pour le biofilm exposé à 0,15 % et 0,5 % de méthanol, et de 0,51 mg-N $L^{-1} h^{-1}$ mg-protéines⁻¹ pour celui exposé à 0.05 % (Tableau 4.4). Donc, un rapport C/N d'au moins 1.5 pour une exposition à 300 mg-N L^{-1} de nitrate confère une activité dénitrifiante maximale.



Figure 4.11 Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à diverses concentrations de méthanol (C/N variable). Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} et à diverses concentrations en méthanol. Données issues de triplicatas.



Figure 4.12 Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à 0,0 % de méthanol (C/N = 0,0). Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} de nitrate. Données issues de triplicatas.

Tableau 4.4 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à diverses concentrations de méthanol (C/N variable). Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} . Données issues de triplicatas.

Méthanol (%)	C/N	Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ¹	Écart type ¹
		3,3	35,5	0,09		
0,0	0,0	3,2	29,3	0,11	0,11	0,01
		2,9	25,3	0,11		
	0,5	14,4	23,7	0,61	0,51	0,08
0,05		14,9	31,9	0,47		
		17,0	37,2	0,46		
		21,6	27,3	0,79		
0,15	1,5	21,1	25,2	0,84	0,77	0,08
		21,1	30,7	0,69		
		22,8	30,3	0,75		
0,5	5,0	21,4	29,2	0,73	0,78	0,07
		23,4	27,4	0,86		

¹Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

4.3.5 Influence de la concentration en nitrate (C/N variable)

Le biofilm a été transféré dans le milieu EMS avec des concentrations de 90, 300, 900 et 3 000 mg-N L^{-1} de nitrate tout en maintenant la concentration en méthanol à 0,15 % (C/N variable). L'exposition à 300 mg-N L^{-1} et à 0,15 % de méthanol a constitué la culture de référence. Le taux de réduction de nitrate a été similaire pour une exposition respective à 300 et 900 mg-N L^{-1} (Fig. 4.13A). Elle a été plus lente pour une exposition à 90 mg-N L^{-1} .

Concernant la réduction de nitrite, la concentration n'a pas excédé 220 mg-N L⁻¹ (Fig. 4.13 B). Cependant, la réduction de nitrite pour une exposition à 300 et à 900 mg-N L⁻¹ a suivi le même rythme d'accumulation pour les 6 premières heures. La figure 4.9B, où le biofilm a été exposé à ces mêmes concentrations de nitrate pour un ratio C/N de 1,5, avait démontré une accumulation moindre de nitrite pour un même temps lorsque le biofilm était exposé à 900 mg-N L⁻¹. Ce ralentissement observé au début de l'incubation pour une exposition à une quantité plus grande en nitrate de 900 mg-N L⁻¹ peut-être associé à son faible ratio C/N de 0,5 tel que suggéré par la figure 4.11B. Pour une exposition à 90 mg-N L⁻¹, la réduction de nitrite s'est terminée de façon synchronisée avec la réduction du nitrate, et il n'y a eu que très peu d'accumulation dans le milieu. Le meilleur taux de dénitrification spécifique de 0,94 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ a été encore obtenu avec une exposition à 900 mg-N L⁻¹ (Tableau 4.5).

Pour une exposition à 3 000 mg-N L⁻¹ (C/N = 0,15), seuls 48 % du nitrate a été réduit dans les 48 premières heures (Fig. 4.14). Ensuite, un arrêt de la réduction du nitrate s'est produit lorsque l'accumulation de nitrite dans le milieu a dépassé 200 mg-N L⁻¹. Nous avons émis l'hypothèse qu'un épuisement de méthanol dans le milieu, conséquemment à un rapport C/N trop faible, aurait été la cause du ralentissement. Un ajout de 0,15 % de méthanol a été effectué à la 118^{eme} heure d'incubation, après que la réduction de nitrate se soit mise à stagner. Cet ajout a permis une réduction supplémentaire de 20 % du nitrate. Au final, 70 % de l'azote total a été réduit au terme de l'incubation à un taux de dénitrification spécifique de 0,28 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ (Tableau 4.5).



Figure 4.13 Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à diverses concentrations en nitrate (C/N variable). Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Le biofilm a été exposé à 0,15 % de méthanol. Données issues de triplicatas.



Figure 4.14 Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à 3 000 mg-N L^{-1} de nitrate (C/N = 0,15). Le biofilm a été exposé à 0,15 % de méthanol. Données issues de triplicatas.

Tableau 4.5 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à diverses concentrations en nitrate (C/N variable). Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Le biofilm a été exposé à 0,15 % de méthanol. Données issues de triplicatas.

Nitrate (mg-N L ⁻¹)	C/N	Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ¹	Écart type ¹
		11,2	31,8	0,35		
90	5,0	11,3	31,7	0,36	0,36	0,00
		11,8	32,8	0,36		
		17,4	30,3	0,58		
300	1,5	17,4	32,3	0,54	0,55	0,02
		17,1	31,3	0,55		
		30,7	33,5	0,92		
900	0,5	29,9	31,4	0,96	0,94	0,02
		29,7	31,8	0,93		
		7,7	28,0	0,27		
3 000	0,15	8,1	27,3	0,30	0,28	0,02
		8,0	30,0	0,27		

¹: Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

4.3.6 Influence du pH du milieu de culture

Le biofilm a été transféré dans le milieu EMS avec 300 mg-N L⁻¹ de nitrate (C/N = 1,5), mais le milieu a été ajusté aux pH initiaux à environ 4,0; 6,0; 8,0 ou 10,0 (Tableau 4.7). L'exposition au pH de 8,0 a constitué la culture de référence. À l'exception du pH 10,0 qui n'a pratiquement pas permis la réduction de nitrate, cette dernière s'est effectuée de manière similaire aux autres pH en environ 6 heures (Fig. 4.15A). La réduction de nitrite s'est effectuée deux fois plus rapidement pour une exposition aux pH initiaux de 4,0 et de 6,0 en comparaison avec un pH de 8,0 (Fig. 4.15B). La réduction totale d'azote s'est effectuée de façon plus efficace pour une exposition aux pH initiaux de 4,0 et de 6,0 en comparaison avec un pH de 8,0 (Fig. 4.15C). Les taux de dénitrification spécifiques de 1,03 et de 0,84 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹, observés respectivement à pH 4,0 et à pH 6,0 en témoignent (Tableau 4.6). Cependant, le pH final de ces milieux n'est pas demeuré stable tout au long de la réduction de l'azote totale. En effet, l'activité dénitrifiante du biofilm a fait grimper le pH près de 8,0 en fin de réaction (Tableau 4.7). Une augmentation moins importante à 8,4 a été observée pour exposition à un pH initial de 8,0.



Figure 4.15 Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à différents pH. Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

Tableau 4.6 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à différents pH. Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

pH initial ¹	Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ²	Écart type ²
	30,0	30,2	0,99		
4,0	33,2	29,0	1,14	1,03	0,10
	30,4	31,9	0,95		
	32,9	37,2	0,89		
6,0	26,6	36,7	0,73	0,84	0,10
	28,3	31,4	0,90		
	11,7	31,2	0,38		
8,0	11,6	31,1	0,37	0,35	0,03
	10,7	34,1	0,31		

¹L'exposition à un pH de 10,0 n'est pas présentée dans ce tableau étant donnée la quasi-absence d'activité dénitrifiante.

²Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

Tableau 4.7	Mesure du	oH en	début et en	fin de	cinétique	de dénitrification.
I ubicuu iii	THUSULU GU		ucout et en	IIII uv	unuuque	ac achier meanons

pH initial ¹	pH final ²
4,0	7,8 (0,1)
6,1	8,0 (0,1)
7,9	8,4 (0,1)
10,2	9,9 (0,1)

¹Les données du pH initial ont été mesurées sur le stock de milieu de culture.

²Le pH final est issu de triplicatas où les valeurs inscrites entre parenthèses constituent les écarts types.

4.3.7 Influence de la température d'incubation

Le biofilm a été transféré dans le milieu EMS avec 300 mg-N L⁻¹ de nitrate (C/N = 1,5) et incubé aux températures suivantes : 5, 15, 23, 30 ou 36 °C. L'incubation à 23 °C a constitué la culture de référence. La réduction du nitrate était similaire à 23 et 30 °C, ainsi qu'à 15 et 36 °C. Dans ces deux dernières températures, la réduction du nitrate a été plus lente de 4 heures en comparaison avec les deux premières (Fig. 4.16A). Elle a été fortement ralentie pour une incubation à 5 °C où après 25 heures d'incubation la concentration en nitrate n'était réduite qu'à 73 %.

La réduction de nitrite a été plus rapide à 30 et 36 $^{\circ}$ C (Fig. 4.16B). Lorsque la température baissait, un retard progressif a été observé au niveau de la réduction de nitrite. Également, une accumulation plus importante de nitrite d'environ 190 mg-N L⁻¹ a été observée pour une incubation aux températures de 23 et 30 $^{\circ}$ C, températures qui avaient permis la réduction la plus rapide de nitrate. Cette accumulation a été moindre pour les températures de 15 et 36 $^{\circ}$ C. La réduction du nitrite a grandement été affectée à 5 $^{\circ}$ C, avec une accumulation de nitrite allant jusqu'à 166 mg-N L⁻¹ après 36 heures. La diminution du nitrite s'est opérée ensuite avec la fin de la réduction du nitrate.

L'azote total a été réduit plus rapidement à 30 et à 36 $^{\circ}$ C en 18 heures (Fig. 4.16C), conférant respectivement des taux de dénitrification spécifiques de 0,52 et 0,58 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ (Tableau 4.8). La réduction de l'azote total a subi un ralentissement de près de 25 et de 44 %, respectivement à 23 et à 15 $^{\circ}$ C. À 5 $^{\circ}$ C, ce phénomène s'est intensifié dramatiquement alors qu'après 32 heures d'incubation, seulement 30 % de l'azote total a été réduit.



Figure 4.16 Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à différentes températures. Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

Tableau 4.8 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à différentes températures. Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L⁻¹ (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

Température (⁰ C)	Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ²	Écart type ²
	3,1	39,4	0,08		
5	3,1	38,0	0,08	0,08	0,00
	3,1	37,1	0,08		
	9,2	34,3	0,27		
15	9,2	34,1	0,27	0,27	0,00
	8,9	32,5	0,28		
	11,7	31,2	0,38		
23 ¹	11,6	31,1	0,37	0,35	0,03
	10,7	34,1	0,31		
	19,1	32,2	0,59		
30	17,6	36,2	0,49	0,52	0,06
	15,5	32,5	0,48		
	18,3	31,9	0,57		
36	18,5	31,5	0,59	0,58	0,01
	18,4	30,9	0,59		

¹Emploi du même triplicata (culture de référence) qu'à la section 4.3.6, car l'étude a été effectuée au même moment. ²Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

4.3.8 Influence de la salinité du milieu de culture

Le biofilm a été transféré dans le milieu EMS aux concentrations de NaCl suivantes : 0,0; 1,0; 2,75 (culture de référence); 5,0 et 8,0 %. Pour toutes les concentrations testées, la même cadence de réduction du nitrate, du nitrite et de l'azote totale a été observée (Fig. 4.17). L'azote total a été réduit en totalité en environ 24 heures, avec des taux de dénitrification spécifiques similaires passant de 0,35 à 0,39 mg-N $L^{-1} h^{-1}$ mg-protéines⁻¹ (Tableau 4.9). Ainsi, la salinité n'a pas semblé affecter l'activité dénitrificante du biofilm à aucun de ces niveaux.



Figure 4.17 Activités dénitrifiantes du biofilm exposé à différentes concentrations de NaCl. Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

Tableau 4.9 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm exposé à différentes concentrations de NaCl. Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L⁻¹ (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

NaCl (%)	Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ²	Écart type ²
	11,9	30,1	0,40		
0,0	11,8	29,4	0,40	0,39	0,01
	12,1	31,2	0,39		
	12,7	36,4	0,35		
1,0	13,6	35,8	0,38	0,35	0,02
	12,4	37,2	0,33		
	11,7	31,2	0,38		
2,75 ¹	11,6	31,1	0,37	0,35	0,03
	10,7	34,1	0,31		
	12,9	35,5	0,36		
5,0	11,9	36,1	0,33	0,36	0,03
	12,8	33,5	0,38		
	13,9	38,3	0,36		
8,0	14,3	34,9	0,41	0,37	0,03
	13,9	40,2	0,35		

¹Emploi du même triplicata (culture de référence) qu'à la section 4.3.6, car l'étude a été effectuée au même moment. ²Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

4.3.9 Résumé de l'étude préliminaire portant sur l'influence des paramètres physicochimiques

Le tableau 4.10 résume les résultats de l'étude préliminaire, laquelle a confronté le biofilm dénitrifiant à une variation de plusieurs paramètres physicochimiques pour en mesurer l'influence sur l'activité dénitrifiante et cibler ceux pouvant potentiellement optimiser le processus de dénitrification. Concernant la culture de référence, le taux de dénitrification spécifique diminue avec l'augmentation des repiquages. Après analyse, nous pensons que cette diminution est une conséquence de la méthodologie employée pour la création de support de deuxième génération qui nuirait à l'implantation d'espèces mineures dans ces biofilms (section 5.2).

L'activité relative spécifique a été calculée en divisant le taux de dénitrification spécifique d'un paramètre X par celui de la culture de référence de l'essai associé. Cette valeur a permis de cibler plus facilement les hausses et les baisses d'activité dénitrifiante conférée par un paramètre donné.

Ainsi, la concentration de nitrate et la température ont été retenues comme éléments majeurs. Le rapport C/N de 1,5 a été conservé, car il a été jugé comme étant optimal à l'activité dénitrifiante. En effet, il a permis la génération d'un taux de dénitrification spécifique équivalent à celui généré par un apport C/N de 5,0. Bien que l'exposition aux pH de 4,0 et de 6,0 ait permis l'obtention de taux de dénitrification spécifiques élevés, la culture du biofilm dans ces conditions n'a pas été étudiée plus en détail puisqu'en fin d'incubation le pH est remonté près de 8.0. Le pH fixé à 8,0 a donc été choisi. Nous avons décidé de faire une étude un peu plus poussée de l'influence du NaCl à faibles et fortes concentrations puisque ce paramètre peut jouer grandement dans la composition de la flore bactérienne, principalement sur la persévérance d'Hyphomicrobium nitrativorans NL23 dans le biofilm à de faibles concentrations. Considérant le même principe, nous avons également choisi de tester l'adaptation du biofilm dans de hautes concentrations en NaCl pour voir si ce changement pourrait mener à l'implantation plus massive d'une ou de plusieurs espèces adaptées à cette salinité élevée. Ces dernières étant moins favorisées dans le biofilm cultivé à 2,75 % NaCl, leur essor pourrait peut-être améliorer les performances dénitrifiantes du biofilm. Également, nous voulions tester la polyvalence du biofilm dans la dénitrification de plusieurs types de milieux marins contaminés en nitrate.

Tableau 4.10 Sommaires des résultats préliminaires de l'influence des paramètresphysicochimiques. Tests effectués avec des supports de deuxième génération forméspréalablement dans les conditions standards de culture et d'incubation avant leur transfert dans lacondition testée.

Conditions de culture ¹		Taux de dénitrification	Concentration de protéines	Taux spécifique de dénitrification	Activité
	Nombre de repiquages atteint	mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ / fiole	mg/fiole	mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéine ⁻¹	relative spécifique
<u>300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-23°C</u>	10	<u>25.8 (0.1)</u>	<u>27.3 (2.1)</u>	0.95 (0.07)	<u>1.00</u>
600N-0.3%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-23°C	10	40.7 (0.7)	28.3 (4.5)	1.46 (0.24)	1.54
900N-0.45%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-23°C	10	40.4 (1.5)	24.7 (2.2)	1.64 (0.14)	1.73
1500N-0.75%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-23°C	10	35.2 (2.7)	26.9 (6.8)	1.36 (0.29)	1.43
3000N-1.5%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-23 ⁰ C	10	négligeable	nd	nd	nd
300N-0%-C/N:0.0%-NaCl2.75%-pH8.0-23°C	15	3.13 (0.24)	30.1 (5.2)	0.10 (0.01)	0.13
300N-0.05%-C/N:0.05%-NaCl2.75%-pH8.0-23°C	15	15.4 (1.4)	31.0 (6.8)	0.51 (0.08)	0.66
<u>300N-0.15%-C/N:1.5%-NaCl2.75%-pH8.0-23°C</u>	15	<u>21.3 (0.3)</u>	<u>27.7 (2.8)</u>	<u>0.77 (0.08)</u>	1.00
300N-0.5%-C/N:5.0-NaCl2.75%-pH8.0-23°C	15	22.5 (1.0)	28.9 (1.5)	0.78 (0.07)	1.01
90N-0.15%-C/N:5.0-NaCl2.75%-pH8.0-23°C	20	11.4 (0.3)	32.1 (0.6)	0.36 (0.01)	0.64
<u>300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-23⁰C</u>	20	<u>17.3 (0.2)</u>	<u>31.3 (1.0)</u>	<u>0.56 (0.02)</u>	1.00
900N-0.15%-C/N:0.5-NaCl2.75%-pH8.0-23 ⁰ C	20	30.1 (0.5)	32.2 (1.2)	0.94 (0.02)	1.68
3000N-0.15%-C/N:0.15-NaCl2.75%-pH8.0-23 ⁰ C	20	8.0 (0.2)	28.5 (1.4)	0.28 (0.02)	0.50
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH4.0-23 ^o C	25	31.2 (1.8)	30.4 (1.5)	1.03 (0.10)	2.94
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH6.1-23 ⁰ C	25	29.3 (3.2)	35.1 (3.2)	0.84 (0.10)	2.40
<u>300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH7.9-23⁰C</u>	25	11.3 (0.6)	<u>32.1 (1.7)</u>	0.35 (0.04)	1.00
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH10.2-23°C	25	négligeable	nd	nd	nd
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-5°C	25	3.11 (0.02)	38.2 (1.1)	0.080 (0)	0.23
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-15 ⁰ C	25	9.11 (0.11)	33.6 (1.0)	0.27 (0.01)	0.77
<u>300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-23°C</u>	25	<u>11.3 (0.6)</u>	<u>32.1 (1.7)</u>	0.35 (0.04)	<u>1.00</u>
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-30 ⁰ C	25	17.4 (1.8)	33.6 (2.2)	0.52 (0.06)	1.49
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-36 ⁰ C	25	18.4 (0.1)	31.5 (0.5)	0.58 (0.01)	1.66
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl0.0%-pH8.0-23°C	25	11.9 (0.1)	30.2 (0.9)	0.40 (0.01)	1.14
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl1.0%-pH8.0-23°C	25	12.9 (0.6)	36.5 (0.7)	0.35 (0.01)	1.00
<u>300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl2.75%-pH8.0-23°C</u>	25	<u>11.3 (0.6)</u>	<u>32.1 (1.7)</u>	0.35 (0.04)	<u>1.00</u>
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl5.0%-pH8.0-23°C	25	12.5 (0.5)	35.0 (1.3)	0.36 (0.03)	1.03
300N-0.15%-C/N:1.5-NaCl8.0%-pH8.0-23°C	25	14.1 (0.2)	37.8 (2.7)	0.37 (0.03)	1.10

¹Les conditions de culture se définissent de gauche à droite: NaNO₃ en mg-N L⁻¹; méthanol en %; rapport C/N; NaCl en %; pH; température. Pour chaque essai, la culture de référence est soulignée. Les meilleures activités relatives spécifiques sont surlignées (hormis l'essai de l'influence du pH, car ce dernier n'est pas demeuré stable).

4.4 Adaptation à de fortes concentrations en NaCl

Selon les résultats de l'étude préliminaire (section 4.3.8), il n'y a pas eu d'impact sur l'activité dénitrifiante du biofilm placé en conditions hautement salées. Toutefois, le biofilm avait été adapté préalablement à une concentration d'eau de mer (2,75 % NaCl). Nous avons voulu tester cette fois-ci l'adaptation du biofilm à ces conditions à partir de la biomasse congelée (section 4.3.9). Les conditions suivantes ont été testées pour une exposition à 300 mg-N L⁻¹ de nitrate (C/N = 1,5):

- 2,75 % NaCl (culture de référence) -
- 5,0 % NaCl
- 8,0 % NaCl

Les autres paramètres physicochimiques respectaient les conditions standards de culture et d'incubation de la culture de référence (pH 8,0; 23 ^oC, etc.).

Après cinq repiquages, la cinétique de dénitrification a été évaluée pour chaque condition. De plus, le biofilm développé dans 2,75 % NaCl a été cultivé à 5,0 % NaCl pour trois repiquages supplémentaires, portant le total à huit repiquages (nommé ici 5,0 % NaCl R8).

Les profils de diversité bactérienne ont montré une augmentation de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 à travers les repiquages et une perte d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, dans tous les cas (Fig. 4.18). Les profils issus des cultures de 5,0 et 8,0 % NaCl ont présenté une bande intense qui migre vers le milieu du gel et qui se présente dès le premier repiquage pour être maintenue jusqu'au cinquième. Également, ces conditions sont marquées par la perte d'un groupement de deux à trois bandes qui a migré vers le bas du gel dans la culture de référence. Cependant, le changement de salinité n'a pas engendré de grand changement dans la communauté bactérienne par rapport à la culture de référence. Également, la condition 5,0 % NaCl R8 présentait un profil similaire à la culture de référence.



Figure 4.18 Profils migratoires PCR-DGGE lors de l'adaptation du biofilm en conditions hautement salines. Le biofilm congelé a été adapté à 2,75 % NaCl (A); 5,0 % NaCl R8 (B); 5,0 % NaCl (C) et 8,0 % NaCl (D) pendant 5 repiquages, sauf contre-indication (B). Profils réalisés préalablement en triplicatas avec des résultats similaires. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC, 5b et 8b) ou à partir de biomasse en suspension (1, 3, 5a et 8a). BC : biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal, 1, 3, 5a, 5b, 8a et 8b : repiquages 1, 3, 5, 5, 8 et 8.

Les résultats de la qPCR ont confirmé les tendances observées des résultats du PCR-DGGE. Au cinquième repiquage (5b), *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 a augmenté de 7,79 x 10³ jusqu'à 4,97 x 10⁵ copies de *narG1*/ng ADN selon la concentration en NaCl du milieu de culture (Fig. 4.19A). Pour sa part, *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 a diminué de 1,24 x 10⁵ à 2,6 x 10¹ copies de *napA*/ng ADN pour la culture à 2,75 % NaCl (Fig. 4.19B). Bien que toujours présente en faible proportion, la souche NL23 a été retrouvée en concentration plus élevée au cinquième repiquage (5b) lorsque le biofilm a été cultivé à 5,0 et 8,0 % NaCl, soit à 1,0 x 10² copies *napA*/ng ADN. Le biofilm qui a été cultivé dans 2,75 % NaCl pour les cinq premiers repiquages et à 5,0 % pour trois repiquages supplémentaires (5,0 % NaCl R8) a conservé la souche JAM1 au même niveau et la souche NL23 a légèrement augmentée à 1,13 x 10² copies de *napA*/ng ADN (Fig. 4.20 8b).



Figure 4.19 Quantification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 (A) et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 (B) par qPCR dans le biofilm adapté à diverses concentrations fortes en NaCl. La ligne pointillée représente la concentration retrouvée dans la biomasse congelée (BC) en provenance du Biodôme de Montréal. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1, 3 et 5a). 1, 3, 5a et 5b : repiquages 1, 3, 5 et 5.



Figure 4.20 Quantification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 par qPCR dans le biofilm cultivé dans 5,0 % NaCl R8. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (8b) ou à partir de biomasse en suspension (8a). 8a et 8b : repiquage 8.

La réduction du nitrate a été affectée négativement lorsque le biofilm a été cultivé dans les hautes concentrations de NaCl (Fig. 4.21A). Elle s'est terminée en 24 heures pour une culture dans 8,0 % NaCl et a été ralentie davantage par la culture à 5,0 % NaCl, où après 32 heures, 77 % de la concentration initiale a été réduite. En comparaison, elle a été réalisée en 10 heures pour la culture de référence (2,75 % NaCl). Cette réduction a suivi la même cadence lorsque le biofilm a été cultivé dans 5,0 % NaCl R8. Ce maintien de l'activité indique que le passage pour trois repiquages de 2,75 % NaCl à 5,0 % NaCl n'a provoqué aucun ralentissement au niveau de cette activité de réduction.

La réduction du nitrite a été également très ralentie pour les cultures aux plus hautes concentrations en NaCl où celui-ci s'est accumulé dans le milieu de culture au-dessus de 200 mg-N L⁻¹ (Fig. 4.21B). Concernant une adaptation à 5,0 % NaCl R8, la culture supplémentaire de trois repiquages à 5,0 % NaCl a engendré une réduction de nitrite deux fois plus rapide en comparaison avec le biofilm cultivé dans 2,75 % NaCl. En effet, cette réduction s'est complétée en un temps record de 10 heures.

La réduction de l'azote total a été effectuée près de deux fois plus rapidement lorsque le biofilm a été cultivé à 5,0 % NaCl R8 en comparaison avec la culture de référence (Fig. 4.21C). Elle a été presque nulle à des concentrations de 5,0 et 8,0 % NaCl, où après 32 heures, seulement

15 % de l'azote total a été réduit. Cependant, le tableau 4.11 indique que le biofilm ne s'est pas développé au même rythme selon les concentrations en NaCl testées. Un biofilm minime (biomasse totale 0,38 et 0,84 mg) s'est développé dans les concentrations hautement salées de 5,0 et 8,0 % NaCl, respectivement. Cela représente un amoindrissement de plus de 30 fois en comparaison avec les 31 mg retrouvés lorsque le biofilm a été cultivé à 2,75 % NaCl. Le faible développement microbien peut donc être associé aux faibles taux de dénitrification obtenus dans ces conditions. Cependant, en considérant la faible quantité de protéines présente, des taux élevés de 2.32 et 1.19 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ ont été calculés pour la dénitrification spécifique à une adaptation respective de 5,0 et 8,0 % NaCl. La salinité n'a pas affecté négativement le biofilm développé dans 5,0 % NaCl R8. Au contraire, avec les trois repiquages supplémentaires au plus haut niveau de salinité, il a continué de se développer et sa concentration en protéines a doublé à environ 63 mg. Cet épaississement du biofilm explique son taux de dénitrification spécifique moindre à 0.55 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹. Selon une analyse ANOVA combinée à un test Duncan, ce taux de dénitrification spécifique ne diffère pas significativement du taux de 0,64 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ obtenu lorsque le biofilm a été cultivé dans 2,75 % NaCl (Tableau 4.11 et annexe C).



Figure 4.21 Activités dénitrifiantes du biofilm adapté à différentes concentrations fortes en NaCl. Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L⁻¹ (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas. Le biofilm congelé a été cultivé pendant cinq repiquages, à l'exception de la condition 5,0 % NaCl R8 où il s'est développé à 2,75 % NaCl pour cinq repiquages et à 5,0 % NaCl pour trois repiquages supplémentaires.

Tableau 4.11 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm adapté à diverses concentrations fortes en NaCl. Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L⁻¹ (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas. Le biofilm a été cultivé préalablement pendant cinq repiquages, excepté la condition 5,0 % NaCl R8 où il a été développé à 2,75 % NaCl pour cinq repiquages et à 5,0 % NaCl pour trois autres repiquages.

NaCl (%)	Taux de dénitrification (mg-N $L^{-1} h^{-1}$)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ¹	Écart type ¹
	19,8	29,1	0,68		
2,75	20,0	31,5	0,64	0,64 ^c	0,04
	19,7	32,5	0,61		
	34,9	59,5	0,59		
5,0 R8	35,4	62,1	0,57	0,55°	0,05
	33,3	66,4	0,50		
	0,8	0,3	2,77		
5,0	0,9	0,5	1,90	2,32 ^a	0,43
	0,8	0,3	2,29		
	0,9	0,8	1,11		
8,0	1,2	0,9	1,30	1,19 ^b	0,10
	0,9	0,8	1,16		

¹Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

^{a, b et c}Des lettres différentes indiquent une différence significative (p < 0,05) avec le test Duncan (voir l'annexe C pour l'intégralité de l'analyse statistique).

4.5 Adaptation à de faibles concentrations en NaCl

Lors de l'étude préliminaire, l'activité dénitrifiante du biofilm exposé à une concentration de NaCl variant de 0,0 à 8,0 % n'a pas résulté en la variation du taux de dénitrification spécifique. Nos résultats ont clairement indiqué que la concentration de la souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 diminuait fortement au fil des repiquages à 2,75 % NaCl. Or, en monoculture, cette souche tolère mal les concentrations en NaCl supérieures à 1,0 % (Martineau *et al.*, 2013). Dans l'optique d'intensifier l'activité dénitrifiante du biofilm, l'adaptation du biofilm en conditions faiblement salées s'est donc avérée une avenue intéressante pour potentiellement favoriser le maintien de ce dénitrificateur complet. Ainsi, les conditions suivantes ont été testées pour une exposition à 300 mg-N L⁻¹ (C/N = 1,5) :

- 0,0 % NaCl
- 0,5 % NaCl
- 1,0 % NaCl
- 2,75 % NaCl (culture de référence)

Les autres paramètres physicochimiques respectent les conditions standards de culture et d'incubation (pH 8,0; 23 ^oC, etc.).

Concernant la culture de référence, il s'agit de la même série de réplicats utilisée dans l'étude de l'adaptation à des températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées (section 4.6), car les deux études ont été effectuées au même moment. Se référer à cette section pour les profils de diversité PCR-DGGE.

Les profils migratoires de diversité bactérienne par PCR-DGGE montrent qu'il y a eu une augmentation de la souche *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 à travers les repiquages lorsque le biofilm a été cultivé dans toutes les concentrations en NaCl testées (Fig. 4.22). Par contre, la bande correspondant à la souche NL23 s'est maintenue à des concentrations de 0,0 et 0,5 %, suggérant la persistance de la souche dans le biofilm dans ces conditions. La bande était également visible, bien qu'en faible proportion, lorsque le biofilm a été cultivé à 1,0 % de NaCl.

Les quantifications effectuées par qPCR indiquent qu'il y a eu une augmentation de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 plus marquée à travers les repiquages lorsque la salinité du milieu de culture était plus élevée (Fig. 4.23A). Des concentrations de 1,95 x 10^5 et $1,63 \ge 10^5$ copies de *narG1*/ng ADN ont été détectées au cinquième repiquage (5b) lorsque le biofilm a été cultivé respectivement dans 2,75 % et 1,0 % NaCl, contrairement à 5,05 x 10⁴ et à 6,02x 10⁴ copies de *narG1*/ng ADN lorsqu'il a été cultivé respectivement dans 0,5 et 0,0 % NaCl. *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 s'est maintenu dans des conditions de salinité faible (Fig. 4.23B). Ainsi, des concentrations de 4,31 x 10⁴ et 2,18 x 10⁴ copies de *napA*/ng ADN ont été trouvées au cinquième repiquage (5b) lorsque le biofilm a été cultivé respectivement dans 0,0 et 0,5 % NaCl. Donc, les souches JAM1 et NL23 se sont retrouvées au même niveau lorsque le biofilm a été cultivé dans ces concentrations faiblement salées. À 1,0 % NaCl, une diminution à 5,76 x 10³ copies de *napA*/ng ADN a été observée, mais la diminution la plus drastique est apparue à 2,75 %, NaCl, où la souche NL23 a atteint 3,88 x 10¹ copies de *napA*/ng ADN.



Figure 4.22 Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne lors de l'adaptation du biofilm dans diverses concentrations faiblement salées. Le biofilm congelé a été adapté à 0,0 % NaCl (A); 0,5 % NaCl (B) et 1,0 % NaCl (C) pendant 5 repiquages. Profils réalisés préalablement en triplicatas avec des résultats similaires. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1 à 5a). BC : biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal, 1 à 5b : repiquages 1 à 5.



Figure 4.23 Quantification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 (A) et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 (B) par qPCR dans le biofilm adapté à diverses concentrations faibles en NaCl. La ligne pointillée représente la concentration retrouvée dans la biomasse congelée (BC). L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1,3 et 5a). 1, 3, 5a et 5b : repiquages 1, 3, 5 et 5.
La réduction du nitrate a été plus rapide à une adaptation à 0,5 % NaCl, et était similaire pour une adaptation à 0,0 et à 2,75 % NaCl. Celle-ci était ralentie pour une adaptation à 1,0 % NaCl (Fig. 4.24A). La réduction de nitrite était similaire pour toutes les concentrations testées, à l'exception d'une adaptation à 1,0 % NaCl où elle a été près de 2 fois plus lente (Fig. 4.24B). La réduction de l'azote total a été réalisée le plus rapidement en 14 heures pour une adaptation à 0,5 % NaCl (Fig. 4.24C). Des concentrations de 0,0 et 2,75 % NaCl ont permis une réduction légèrement plus lente en environ 16 heures. Finalement, une concentration de 1,0 % NaCl a engendré une réduction 2,5 plus lente, principalement causée par le ralentissement observé au niveau de la réduction du nitrite.

Les faibles concentrations en NaCl ont affecté négativement le développement du biofilm (Tableau 4.12). Ainsi, un développement maximal d'environ 28 mg et minimal d'environ 14 mg a été observé lorsque le biofilm a été respectivement cultivé dans 2,75 et 0,0 % NaCl. Concernant le taux de dénitrification spécifique, une analyse ANOVA combinée avec un test de Duncan a indiqué que chaque condition en NaCl testée a conféré une différence significative, et que les cultures du biofilm dans 0,0 et 0,5 % NaCl étaient les plus optimales pour l'activité dénitrifiante en engendrant des taux de dénitrification spécifiques de 1,28 et 1,00 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ respectivement (Tableau 4.12 et annexe D). Ces taux représentaient une hausse de 73 et 35 %. Pour sa part, le biofilm cultivé dans 1,0 % NaCl a été affecté le plus négativement dans son activité dénitrifiante, générant un taux de dénitrification spécifique de 0,50 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹.



Figure 4.24 Activités dénitrifiantes du biofilm adapté des concentrations faibles en NaCl. Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

Tableau 4.12 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm adapté à des concentrations faibles en NaCl. Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Le biofilm a été exposé à 300 mg-N L⁻¹ (C/N = 1,5). Données issues de triplicatas.

NaCl (%)	Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ¹	Écart type ¹
0,0	18,1	14,2	1,28		
	17,9	12,9	1,39	1,28 ^a	0,11
	17,7	15,2	1,16		
0,5	22,2	20,6	1,08		
	21,8	20,8	1,05	1,00 ^b	0,12
	21,8	25,2	0,86		
1,0	8,9	18,6	0,48		
	9,4	18,2	0,51	0,50 ^d	0,01
	9,3	18,6	0,50		
2,75	19,8	23,5	0,85		
	21,2	30,6	0,69	0,74 ^c	0,09
	20,7	30,1	0,69		

¹Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.

 a,b,c et ^dLes lettres indiquent une différence significative (p < 0,05) avec le test Duncan (voir l'annexe D pour l'intégralité de l'analyse statistique).

4.6 Adaptation à des températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées

La concentration en NaNO₃ à 900 mg-N L^{-1} et la température de 30 ^oC ont été retenues suite à l'étude préliminaire. Une expérience factorielle avec ces deux facteurs a été réalisée où le biofilm a été adapté dans les conditions suivantes:

- 300 mg-N $\rm L^{-1}$ de NaNO3 à 23 $^{0}\rm C$

(culture de référence)

- 300 mg-N L^{-1} de NaNO₃ à 30 °C

- 900 mg-N L^{-1} de NaNO₃ à 23 ^oC

- 900 mg-N L^{-1} de NaNO₃ à 30 °C ____

Les autres paramètres physicochimiques respectaient les conditions standards de culture et d'incubation (2,75 % NaCl, pH 8,0; etc.).

Les profils migratoires de diversité bactérienne obtenus par PCR-DGGE ont démontré des résultats similaires pour les quatre conditions testées (Fig. 4.25 et annexe E). Comme observé auparavant, *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 a augmenté au fil des repiquages et *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 diminue et n'était plus visible sur gel après le premier repiquage. Le reste de l'évolution de la diversité et du profil obtenu au cinquième repiquage sur la biomasse grattée (5b) respectait également les résultats obtenus préalablement.

La figure 4.26A indique que *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 a augmenté au fil des repiquages pour atteindre de 1,72 x 10^5 à 1,95 x 10^5 copies de *narG1*/ng ADN dans les quatre conditions testées (5b). Pour sa part, la souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 a diminué pour atteindre 3,88 x 10^1 et 2,45 x 10^1 copies de *napA*/ng ADN quand le biofilm a été respectivement exposé à 300 et 900 mg-N L⁻¹ et incubé à 23 °C lors de l'adaptation (Fig. 4.26B). Pour les cultures à 300 et 900 mg-N L⁻¹ à 30 °C, la température plus élevée a permis un maintien de cette souche à des concentrations légèrement plus élevées de 2,28 x 10^2 et 1,15 x 10^2 copies de *napA*/ng ADN.



Figure 4.25 Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne lors de l'adaptation du biofilm à 300 mg-N L⁻¹ (C/N = 1,5) et incubé à 30 °C. Profils réalisés préalablement en triplicatas avec des résultats similaires. Également, des résultats similaires ont été observés pour les autres conditions de culture présentées dans cette étude (annexe E). L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1 à 5a). BC : biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal, 1 à 5b : repiquages 1 à 5.



Figure 4.26 Quantification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 (A) et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 (B) par qPCR dans le biofilm adapté à des températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées. La ligne pointillée représente la concentration retrouvée dans la biomasse congelée (BC) en provenance du Biodôme de Montréal. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1,3 et 5a). 1, 3, 5a et 5b : repiquages 1, 3, 5 et 5.

La réduction du nitrate s'est effectuée légèrement plus rapidement à 30 °C où elle a été réalisée en 8 et 24 heures respectivement pour des adaptations à 300 et 900 mg-N L⁻¹, alors qu'elle est réalisée en 10 et 28 heures respectivement pour des adaptations aux mêmes concentrations de nitrate à 23 °C (Fig. 4.27A). Également, pour une même température d'incubation, le rythme de réduction du nitrate était similaire pour les deux concentrations de nitrate testées.

Encore une fois, la concentration du nitrite ne s'est jamais accumulée au-delà de 200-250 mg-N L⁻¹ (Fig. 4.27B) pour chacune des conditions testées, phénomène observé auparavant (Fig. 4.9B et 4.13B). Également, une température de 30 $^{\circ}$ C a permis une réduction du nitrite plus efficace qui a résulté en une accumulation maximale moindre de cet ion dans le milieu de culture pour une adaptation à 300 mg-N L⁻¹, en comparaison avec une incubation à 23 $^{\circ}$ C. Pour une adaptation à 900 mg-N L⁻¹, la réduction de nitrite a été également effectuée plus efficacement à 30 $^{\circ}$ C.

L'azote total a été complètement réduit en 12 heures pour une adaptation à 300 mg-N L⁻¹ à 30 $^{\circ}$ C au lieu de 16 avec son homologue à 23 $^{\circ}$ C (Fig. 4.27C). Une réduction plus rapide de 8 heures a été observée pour une adaptation à 900 mg-N L⁻¹ à 30 $^{\circ}$ C en comparaison avec son homologue de 23 $^{\circ}$ C. Cette activité dénitrifiante supérieure à 30 $^{\circ}$ C a été accompagnée par une concentration moyenne en protéines par fiole qui y était moindre, indiquant un développement plus faible du biofilm à cette température (Tableau 4.13). Ainsi, les taux de dénitrification spécifiques les plus élevés de 1,33 et 1,37 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ ont été observés lorsque le biofilm a été adapté à température de 30 $^{\circ}$ C lors d'une exposition respective de 300 et 900 mg-N. Ces taux étaient similaires, indiquant qu'une concentration plus élevée en nitrate n'influence pas significativement l'activité dénitrificante. Selon une analyse statistique ANOVA combinée avec un test de Duncan (Fig. 4.28 et annexe F), la température aurait influencé positivement et significativement le taux de dénitrification spécifique contrairement à la concentration en nitrate. En effet, une augmentation de plus de 80 % a été observée au niveau du taux de dénitrification spécifique pour une incubation à 30 $^{\circ}$ C.



Figure 4.27 Activités dénitrifiantes du biofilm adapté à des températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées. Réduction de nitrate (A), de nitrite (B) et d'azote total (C). Données issues de triplicatas.

Tableau 4.13 Taux de dénitrification spécifique moyen du biofilm adapté à des températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées. Ce taux a été calculé à partir des mesures du taux de dénitrification et de la concentration en protéines par fiole, associés à chacun des réplicats. Données issues de triplicatas.

Concentration en nitrate et température	Taux de dénitrification (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹)	Concentration en protéines par fiole (mg)	Taux de dénitrification spécifique (mg-N L ⁻¹ h ⁻¹ mg-protéines ⁻¹)	Moyenne des réplicats ²	Écart type ²
	19,8	23,5	0,85		
$300 \text{ mg-N } \text{L}^{-1} \text{ à}$	21,2	30,7	30,7 0,69		0,09
25 €	20,7	30,1 0,69			
	27,3	20,9	1,30		
$300 \text{ mg-N } \text{L}^{-1} \text{ à}$	27,6	21,2	1,31	1,33	0,04
50 C	26,6	19,5	1,37		
	27,6	28,3	0,98		
900 mg-N L^{-1} à	27,5	33,9	0,81	0,89	0,08
25 C	26,7	29,9	0,89		
	32,6	27,7	1,18		
900 mg-N L^{-1} à	34,7	22,5	1,54	1,37	0,18
50 C	32,5	23,2	1,40		

¹Emploi du même triplicata (culture de référence) qu'à la section 4.5, car l'étude a été effectuée au même moment.

²Relie la moyenne et l'écart type au taux de dénitrification spécifique.



Figure 4.28 Taux de dénitrification spécifique moyen réalisé par le biofilm adapté à des températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées. Données issues de triplicatas. Pour un graphique donné, des lettres différentes indiquent une différence significative (p < 0,05) selon le test de Duncan (voir l'annexe F pour l'intégralité de l'analyse statistique).

4.7 Étude du métagénome des gènes de l'ARNr 16S sur le biofilm adapté à des températures et à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées ainsi qu'à de faibles concentrations de NaCl

Les nouvelles techniques de séquençage de l'ADN nous ont permis de faire une étude très approfondie de la composition de la flore bactérienne dans le biofilm adapté à diverses conditions de nitrate et de température ainsi qu'à de faibles concentrations de NaCl. Étant donné la forte diminution de la souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 dans la plupart de conditions d'eau de mer (2,75 % NaCl), et que celle-ci serait responsable d'assister la souche *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 dans la réduction complète du nitrate en azote gazeux, nous avons émis l'hypothèse qu'au moins une autre espèce bactérienne capable de réduire le nitrite ait pris de l'ampleur dans le biofilm.

Les ADN totaux extraits du biofilm adapté pendant cinq repiquages à:

- (1) 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃, 23 ^oC; 2,75 % NaCl,
- (2) 900 mg-N L⁻¹ de NaNO₃, 23 ^oC; 2,75 % NaCl,
- (3) 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃, 30 °C; 2,75 % NaCl,
- (4) 900 mg-N L⁻¹ de NaNO₃, 30 °C; 2,75 % NaCl,

(5) 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃, 23 ^oC; 0,0 % NaCl,

- (6) 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃, 23 ^oC; 0,5 % NaCl,
- (7) 300 mg-N L⁻¹ de NaNO₃, 23 ^oC; 1,0 % NaCl,

À ce moment, les tests statistiques n'avaient pas été effectués et nous pensions qu'une différence significative était observée pour une concentration de 300 et 900 mg-N L⁻¹.

ont servi à l'amplification d'une partie des gènes de l'ARNr 16S contenus dans ces ADN. Les amplicons étaient composés d'une multitude de séquences correspondant à la diversité bactérienne du biofilm. Celles-ci ont été séquencées par la technique de pyroséquençage qui a produit en moyenne plus de 10 000 séquences de 450 pb.

Les résultats du séquençage démontrent que des espèces affiliées au genre Methylophaga dominaient dans toutes les conditions, où celles-ci représentaient de 85,4 à 97,7 % des séquences (Fig. 4.29A). Dans les quatre conditions analysées où le biofilm a été cultivé à 2,75 % NaCl, aucune séquence d'Hyphomicrobium n'a été détectée. Par contre, des séquences affiliées au genre Marinicella ont été obtenues dans une proportion de 1,5 à 5,0 % des séquences. Ces bactéries pourraient assumer une partie de la réduction du nitrite. Concernant le biofilm développé dans 0,0 et 0,5 % NaCl, des séquences affiliées au genre Hyphomicrobium ont été obtenues dans une proportion de 11,8 % et 7,4 % des séquences. Des séquences affiliées à Marinicella ont été également retrouvées en proportion non négligeables (0,2 % et 1,5 %). Chez le biofilm développé dans un milieu de culture à 1,0 % NaCl, Hyphomicrobium et Marinicella représentaient respectivement 0,3 et 0,9 % des séquences. Le reste des séquences obtenues dans toutes les conditions de culture analysées représentaient de 0,8 à 3,3 % de toutes les séquences. Celles-ci sont affiliées à plus d'une quinzaine de genres, appelés « genres mineurs » (annexe G). Ces genres mineurs retrouvés à au moins 0,08 % des séquences sont représentés à la figure 4.29B. Plusieurs de ces genres (p. ex. Pseudomonas, Paracoccus) ont déjà été impliqués directement ou indirectement dans le processus de dénitrification.



Figure 4.29 Affiliations les plus probables des séquences des gènes de l'ARNr 16S issues du biofilm adapté à des températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées et à des concentrations faibles en NaCl. Genres bactériens abondants (A) et mineurs (B) présents dans le biofilm cultivé dans diverses conditions. Les genres mineurs présents dans le deuxième graphique (B) sont associés à la catégorie « autres » du premier graphique (A). Les flèches rouges indiquent les genres associés à une activité dénitrifiante dans la littérature.

4.8 Isolement du biofilm d'isolats avec une activité dénitrifiante

L'obtention d'isolats provenant du biofilm a été réalisée par une série de cultures en milieux liquides et solides (section 3.6). La biomasse a été ensemencée sur quatre milieux de culture en conditions aérobies et dénitrifiantes. Le Milieu Marin 2216 (MM) et le milieu R2A ont été choisis pour permettre la culture d'un maximum d'hétérotrophes appartenant aux genres mineurs présents dans la population bactérienne du biofilm, ou au genre *Marinicella*. Le milieu EMS supplémenté avec du nitrate et méthanol et le milieu 1403 ont été utilisés pour l'isolement de bactéries méthylotrophes et de *Methylophaga*, respectivement. Nous avons émis l'hypothèse qu'une souche affiliée au genre *Methylophaga* capable de faire une dénitrification complète existait dans le biofilm.

Les isolats ont été identifiés selon leur séquence du gène ARNr 16S. Toutes les identifications des isolats ont été également relevées par les analyses du métagénome (section 4.7), à l'exception des genres Maritimibacter (4 isolats), Octadecabacter/ Thalassobius (1 isolat), Thalassobius/Thalassococcus (1 isolat) et Exiquobacterium (2 isolats) cultivés dans le MM (Tableau 4.14). Dans ce milieu de culture, une grande diversité d'espèces a été obtenue, dont des isolats associés aux genres Marinobacter (5 isolats). Paracoccus (6 isolats). Roseobacter/Maritimibacter/ Roseavarius (3 isolats), Rhodovulum (1 isolat) et Roseobacter (1 isolat). Ceux-ci ont démontré une réduction du nitrate et du nitrite (Tableau 4.14). Cependant, l'isolat 10A, également associé aux genres Roseobacter/Maritimibacter/Roseavarius, n'a pas démontré d'activité de réduction de nitrate. Aussi, les isolats associés aux genres Octadecabacter/Thalassobius (1 isolat), Aequorivita (1 isolat), Winogradskyella (3 isolats), Thalassobius/Thalassococcus (1 isolat) et Exiquobacterium (2 isolats) n'ont démontré aucune activité de réduction de nitrate.

Condition d'incubation	Isolat	Réduction de nitrate	Réduction de nitrite	Identification	% Identité
	1A	++	++	Marinobacter	99
	1B	++	++	Marinobacter	99
	2A	++	++	Marinobacter	99
	2B	++	++	Marinobacter	99
	3A	++	++	Paracoccus	98
	8A	++	++	Paracoccus	98
	9A	++	++	Roseobacter/Maritimibacter/Roseavarius	99
	10A	-	n/a	Roseobacter/Maritimibacter/Roseavarius	99
	11A	-	n/a	Octadecabacter ou Thalassobius	96
A / 1 ·	12A	++	++	Rhodovulum	99
Aerobie	13A	++	++	Roseobacter/Maritimibacter/Roseavarius	99
	14A	++	++	Roseobacter	100
	14B	++	++	Roseobacter/Maritimibacter/Roseavarius	99
	15A	-	n/a	Aequorivita	99
	16A	-	n/a	Winogradskyella	97
	17A	-	n/a	Winogradskyella	97
	18A	-	n/a	Winogradskyella	97
	19A	-	n/a	Thalassobius ou Thalassococcus.	94
	46A	-	n/a	Exiquobacterium	99
	47A	-	n/a	Exiquobacterium	99
	20A	++	++	Paracoccus	98
	20B	++	++	Paracoccus	98
Anaérobie	22A	++	++	Paracoccus	98
	23A	++	++	Paracoccus	98
	24A	++	++	Marinobacter	99

Tableau 4.14 Activités dénitrifiantes des isolats obtenus du biofilm sur le Milieu Marin 2216.

++ : Réduction complète. + : Réduction partielle d'environ 50 % de la quantité initiale. - : Aucune réduction. n/a : Non applicable. % Identité : En fonction de la séquence du gène de l'ARNr 16S de l'isolat associée au genre le plus proche.

Dans le milieu 1403, une faible diversité d'espèce s'est développée. Des 20 colonies criblées au départ dont la moitié a été incubée en conditions aérobies et l'autre moitié en conditions dénitrifiantes, seules 12 ont persisté jusqu'au test de l'activité dénitrifiante (les autres ont cessées de pousser au cours du processus de purification et d'isolation). Tous ces isolats ont été associés à la souche *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et onze d'entre eux ont démontré une réduction du nitrate, mais aucune réduction de nitrite (Tableau 4.15). Par contre, l'isolat 59A a démontré une réduction complète de nitrate et de nitrite. Ainsi, une souche fortement affiliée à la souche JAM1 possédant une activité dénitrifiante complète est bien implantée dans le biofilm. En culture pure en milieu solide, les colonies associées à cet isolat étaient très similaires à celles obtenues de la souche JAM1 ne réduisant pas le nitrite, mais avec une teinte légèrement jaunâtre au lieu de blanchâtre.

Finalement, sur les milieux EMS et R2A, une très faible diversité d'espèce a proliféré et perduré jusqu'à l'étape du test en conditions dénitrifiantes. L'unique isolat obtenu sur le milieu EMS a été associé à la souche JAM1. Celui-ci a été capable de réduire le nitrate, mais pas le nitrite (Tableau 4.15). L'unique isolat obtenu sur le milieu R2A a été associé au genre *Pseudomonas* et n'a démontré qu'une faible réduction de nitrate après 4 jours d'incubation, équivalant environ à la moitié de la concentration initiale, et aucune réduction de nitrite.

Tableau 4.15 Activités dénitrifiantes des isolats obtenus du biofilm sur les milieux 1403, EMS et R2A.

Milieu de culture	Condition d'incubation	Isolat	Réduction de nitrate	Réduction de nitrite	Identification	% Identité
1403	Aérobie	53A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		58A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		59A ¹	++	++	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
	Anaérobie	27A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		28A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		29A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		30A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		31A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		32A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		33A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		34A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
		35A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100
R2A	Aérobie	41A	+	-	Pseudomonas	99
EMS	Anaérobie	51A	++	-	Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1	100

++ : Réduction complète. + : Réduction partielle d'environ 50 % de la quantité initiale. - : Aucune réduction. % Identité : En fonction de la séquence du gène de l'ARNr 16S de l'isolat associée au genre le plus proche.

¹Le test dénitrifiant et l'identification ont été répétés respectivement à trois et deux reprises indépendantes avec des résultats similaires.

5 DISCUSSION

5.1 L'opération en mode cuvée selon le type de milieu de culture

L'analyse des profils de diversité a montré une évolution entre la biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal (BC), où le bioréacteur a été opéré en mode continu, et celle qui s'est adaptée au mode d'opération cuvée pendant cinq repiquages (Fig. 4.1).

D'abord, contrairement aux profils représentant les repiquages 1 à 5, le profil correspondant à la biomasse de départ (BC) n'offre aucune référence au niveau de la viabilité des espèces présentes. Il correspond au biote bactérien conservé après une congélation de plus de 7 ans dans le glycérol 20 % à -20 °C. Lorsque le bioréacteur était en fonction, l'analyse du profil de diversité bactérienne associé au biofilm développé en mode continu a été effectuée dans notre laboratoire (Laurin *et al.*, 2006). Cette analyse a été effectuée avec de la biomasse fraîche, non congelée. Une diversité d'espèces bactériennes assez similaire à celle présentée dans la figure 4.1 a été obtenue, où parmi la quinzaine d'espèces présentes, *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 a été représentée en proportion moindre qu'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 (annexe H). Donc, le profil de diversité bactérienne obtenu après congélation a reflété celui obtenu avant congélation, lorsque le bioréacteur était opérable.

Ensuite, en mode cuvée, du premier au cinquième repiquage, la diversité d'espèces visibles sur gel s'est appauvrie légèrement, passant d'environ 12 bandes au premier repiquage à 9 bandes à partir du quatrième repiquage, où la population s'est stabilisée. Cette diminution du nombre d'espèces lors de l'adaptation au mode d'opération cuvée en comparaison avec celle au mode continu peut être due à la variabilité causée par ce premier mode d'opération. En effet, le mode cuvée engendre des variations fréquentes, qui peuvent s'avérer stressantes et limitantes pour certaines espèces bactériennes, au niveau des paramètres suivants : pH, ratio C/N, éléments traces, composés azotés et oxygène. Ainsi, les populations microbiennes adaptées au mode d'opération cuvée peuvent différer de celles opérées en mode continu.

Également, le biofilm opéré en mode continu l'a été dans le milieu IO alors que le milieu EMS a été sélectionné pour la culture du biofilm en mode cuvée, pouvant certainement mener à la sélection d'une population dont la composition et l'abondance des espèces présentes étaient différentes. En effet, la figure 4.4 montre des populations quelque peu différentes lorsque le biofilm a été cultivé pendant cinq repiquages en mode cuvée dans le milieu EMS ou IO. Les profils issus du milieu IO au cinquième repiquage semblaient plus diversifiés et les bandes présentes étaient plus intenses. Ils comportaient une bande intense associée à *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et également une bande associée à *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. Dans le milieu EMS, cette dernière souche n'était pas visible dès le 2^{ème} repiquage (Fig. 4.1 et Fig. 4.4). Ce phénomène indique que le mode cuvée, malgré ses conditions variables, a permis le maintien de la souche NL23 avec un milieu de culture adapté comme le milieu IO.

Le milieu IO possède une salinité comparable au milieu EMS (2,75 % NaCl), mais, à la différence de ce dernier, il est plus riche et sa composition élaborée se rapproche davantage de l'eau de mer naturelle (annexe I ; Cappel, 1999). Il contient des quantités importantes des éléments suivant : brome, strontium, bicarbonate et borate et davantage d'éléments traces que le milieu EMS, à l'exemple de lithium, d'iode, d'aluminium, de zinc, de nickel et plusieurs autres (Cappel, 1999). Également, à la différence du milieu EMS, le milieu IO contient du molybdène, un élément chimique permettant le bon fonctionnement des enzymes impliquées dans la dénitrification, notamment au niveau des deux types de nitrate réductases qui en contiennent au site actif. À l'avenir, il pourrait donc s'avérer bénéfique d'ajouter du molybdène au milieu EMS.

Les quantités de sélénium contenues dans le milieu IO peuvent aussi augmenter l'activité des enzymes impliquées dans la dénitrification. À cet effet, Chakrabarti et Jones (1983) ont mesuré la réduction de nitrate dans un système biologique de traitement des eaux usées nourri en méthanol et opéré en mode continu. Ils ont obtenu une activité de réduction maximale lorsque le milieu a été supplémenté en molybdène et en sélénium. Également, Xuezheng *et al.* (2011) ont noté une augmentation significative de l'efficacité de réduction de nitrate lorsque leur système de boues activées opéré en mode cuvée a été supplémenté en molybdène. Finalement, Catalan-Sakairi *et al.* (1996) ont obtenu une amélioration de l'activité dénitrifiante effectuée en eau salée (30 g L⁻¹ de NaCl) après l'ajout d'éléments traces comprenant du molybdène. Le molybdène entre également dans la composition du milieu de culture 337a qui est utilisé pour la culture des bactéries du genre *Hyphomocrobium* (Atlas, 2010). Ainsi, le milieu IO, plus complet et riche en

éléments traces comme le molybdène, semble fournir de meilleures conditions de culture pour le développement, l'activité et le maintien d'espèces telle *Hyphomocrobium nitrativorans* NL23 dans le biofilm cultivé en mode cuvée.

L'adaptation au mode cuvée dans le milieu EMS a mené à l'accroissement de Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 dans la population bactérienne contrairement à Hyphomicrobium nitrativorans NL23 qui n'était plus visible sur gel à partir du deuxième repiquage. La qPCR a confirmé ces résultats et la souche JAM1 a atteint près de 10⁵ copies de *narG1*/ng ADN arrivée au cinquième repiquage, contre seulement environ 10^1 copies de *napA*/ng ADN pour la souche NL23 (Fig. 4.2). Auclair et al. (2012) ont démontré que la concentration des deux souches était au même niveau, supérieur à 10^4 copies de gène/ng ADN, dans le biofilm lorsqu'il était opéré en mode continu. Lorsque l'étude a été reprise pour comparer l'influence du milieu IO au milieu EMS en mode cuvée, au cinquième repiquage, les résultats de qPCR ont indiqué que, dans le milieu IO, la concentration des deux souches était au même niveau également supérieur à 10⁴ copies de gène/ng ADN (Fig. 4.5). Ces résultats appuient encore l'hypothèse que c'est la composition du milieu de culture choisi, et non le mode d'opération cuvée, qui a mené à la perte de la souche NL23 dans le biofilm au travers des repiquages. Également, la diminution de la souche NL23 dans le biofilm a semblé permettre à la souche JAM1 d'y prendre plus d'importance. Ainsi, la composition du milieu de culture est déterminante dans l'établissement de la population opérée en mode cuvée.

La comparaison des résultats issus des analyses de qPCR et de profils de diversité (PCR-DGGE) démontre au premier regard des irrégularités quant à l'abondance des souches JAM1 et NL23 dans le biofilm. En effet, alors que les analyses de qPCR indiquent que les deux souches se sont retrouvées au même niveau au cinquième repiquage dans le biofilm cultivé dans le milieu IO (Fig. 4.5), l'intensité des bandes associées à chacune des deux espèces sur les profils de diversité bactérienne n'est pas équivalente, indiquant que la souche JAM1 dominait davantage dans le biofilm (Fig. 4.4B). Les analyses de qPCR sont quantitatives et ont été effectuées sur la nitrate réductase de chacune des deux espèces, qui est présente uniquement en une copie par génome, permettant une quantification fiable et comparable entre les deux souches. Les résultats de PCR-DGGE sont quantitatifs en ce qui concerne la proportion de chacune des espèces présentes au sein du biofilm. Ils ont été effectués avec les gènes de l'ARNr 16S et leur interprétation doit prendre en considération que la souche JAM1 en possède trois copies alors que la souche NL23 n'en possède qu'une seule (Martineau *et al.*, 2014 et Villeneuve *et al.*, 2012). C'est pourquoi la souche JAM1 est apparue plus dominante dans les profils de diversité.

La dynamique de dénitrification observée au cinquième repiquage a démontré une réduction rapide du nitrate en 6 heures, menant à une accumulation de nitrite qui a atteint près de la moitié de la concentration initiale d'azote (Fig. 4.3). Le nitrite a été réduit environ deux fois plus lentement, donnant un taux de dénitrification spécifique de 1,33 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ (Tableau 4.1). Cette différence dans la dynamique de réduction du nitrate et nitrite peut résulter d'un débalancement entre les bactéries respiratrices de nitrate et les dénitrificateurs complets implantés dans le biofilm (Glass et Silverstein, 1997 et Wilderer *et al.*, 2003). En effet, dans les populations mixtes, les respirateurs de nitrate interviennent en premier dans le processus de dénitrification et peuvent s'y implanter plus rapidement. La souche *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 en fait partie. De plus, elle croît rapidement et est bien adaptée aux conditions salées (concentration en NaCl optimale de 3,0 %), pouvant mener à une colonisation importante de cette souche sur les supports et à une accumulation de nitrite dans le milieu, engendrant une toxicité pouvant limiter l'implantation de dénitrificateurs complets (Glass *et al.*, 1997 et Villeneuve *et al.*, 2012).

Le nitrite est considéré comme toxique, car il altère le fonctionnement cellulaire de plusieurs façons. Premièrement, il engendre l'inhibition du transport actif et le fonctionnement de certaines enzymes comme l'aldolase et l'hexokinase (Yarbrough *et al.*, 1980). En culture pure, cette accumulation serait causée par le caractère d'accepteur préférentiel d'électron qui est attribué au nitrate (Glass et Silverstein, 1997). Appuyant cet énoncé, Kornaros *et al.* (1996) ont démontré que le taux de réduction de nitrite chez *Pseudomonas denitrificans* diminue de 61 % lorsqu'un ajout de 30 mg-N L⁻¹ de NO₃ est effectué au milieu de culture pendant cette réduction, ce qui provoque une accumulation de nitrite. Également, en culture mixte, une accumulation de nitrite dans le milieu de culture est souvent observée conséquemment à un déséquilibre créé entre les respirateurs de nitrate et les dénitrificateurs complets. Les respirateurs de nitrate ont souvent un avantage sélectif en population mixte, car leur taux de croissance est près de trois fois supérieur à celui des dénitrificateurs complets, ce qui mène à une accumulation de nitrite dans le milieu qui doit être pris en charge par ces derniers (Glass et Silverstein, 1997). Deuxièmement, la toxicité du nitrite peut également être causée par une accumulation d'acide nitreux (HNO₂). Lorsque cet acide atteint 0,13 mg L⁻¹, la dénitrification peut être inhibée (Glass et Silverstein,

1997). Plus le pH est bas, plus haute sera la concentration d'acide nitreux formée. Cependant, même à pH neutre, si une grande accumulation de nitrite est observée dans le milieu de culture conséquemment à une grande concentration en nitrate initiale, les concentrations en acide nitreux présentes peuvent suffire à inhiber la dénitrification (Glass *et al.*, 1997).

Dans le biofilm, *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1, respirateur de nitrate, s'est implanté en proportion beaucoup plus élevée que *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, dénitrificateur complet (Fig. 4.2). Cette proportionnalité entre les deux souches peut être responsable de la dynamique de dénitrification non équilibrée entre la réduction de nitrate et de nitrite, menant à une accumulation de nitrite considérable. Pour appuyer cette hypothèse, Foglar et Briski (2002) ont démontré, dans leur étude menée sur le traitement des eaux usées par l'intermédiaire de boues activées opérées en mode cuvée et nourries en méthanol, une quasiabsence d'accumulation de nitrite conséquemment au caractère dominant des dénitrificateurs complets *Paracoccus* sp. et *Pseudomonas stutzeri* qui représentaient environ 80 % de la population.

Lorsque l'étude a été reprise pour comparer l'activité dénitrifiante du biofilm opéré en mode cuvée dans le milieu IO ou EMS, une accumulation de nitrite de l'ordre de 139 mg-N L⁻¹ a été observée pour la culture en milieu EMS, où un taux de dénitrification spécifique de 0,96 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ a été observé (Fig. 4.6 et Tableau 4.2). Reprenant les tendances énoncées concernant l'équilibre entre les respirateurs de nitrate et les dénitrificateurs complets, lorsque le biofilm a été cultivé dans le milieu IO, où la concentration des souches JAM1 et NL23 était semblable, la réduction du nitrate a été ralentie et mieux coordonnée avec la réduction de nitrite. Ainsi, l'accumulation du nitrite dans le milieu de culture a été plus basse et elle avait atteint maximalement 57 mg-N L^{-1} (Fig. 4.6). Un taux de dénitrification spécifique comparable de 0.93 mg-N L⁻¹ h⁻¹ mg-protéines⁻¹ a été observé (Tableau 4.2). Cependant, la réduction de nitrate et de nitrite (taux de dénitrification) s'est effectuée 2,5 fois plus rapidement dans le milieu EMS qui était associé à une biomasse également 2,5 fois plus grande (Tableau 4.2). Ainsi, le biofilm se développait davantage dans le milieu EMS, où une diversité moindre d'espèces semblait s'être établie (Fig. 4.4). Ce phénomène n'est pas en accord avec plusieurs articles issus de la littérature scientifique qui indiquent que, généralement, plus un biofilm est diversifié en terme d'espèces, plus sa densité est grande, car les interactions entre les différentes espèces contribuent au bon développement du biofilm et à sa diversité, notamment par l'exposition de nouveaux sites d'attachement obtenus sur les colonisateurs primaires (Dunne Jr., 2002 et Mclean *et al.*, 2005). Cependant, les profils de diversité n'ont montré que les espèces dominantes et la composition du milieu de culture est un facteur déterminant régissant le développement de ce dernier. McLean *et al.* (2005) l'ont démontré par l'exposition de *S. algae* à divers milieux de culture marins où la formation relative de biofilm pouvait différer d'un facteur 25 selon le milieu de culture.

5.2 Étude préliminaire sur la variation de paramètres physicochimiques

La population bactérienne obtenue sur les supports de deuxième génération était comparable en termes de profils PCR-DGGE et d'intensité des bandes à celle associée aux supports de première génération (Fig. 4.7). Les espèces dominantes qui étaient visibles sur gel PCR-DGGE y étaient conservées le plus souvent dans des proportions similaires. La souche JAM1 y était dominante dans le biofilm associé aux supports de première et de deuxième génération (10⁵ copies de *narG1*/ng ADN), à l'opposé de la souche NL23 qui y était peu abondante ou absente (Fig. 4.8). Cependant, le biofilm associé aux supports de deuxième génération présentait au moins deux bandes de plus. Ces bandes sont probablement associées à des espèces mineures, présentes dans le biofilm associé aux supports de première génération, mais imperceptibles sur gel PCR-DGGE, qui se seraient implantées davantage dans le biofilm associé aux supports de deuxième génération. Ce phénomène peut être associé au fait que le développement du biofilm présent sur les supports de première et deuxième génération n'a pas été effectué à partir du même inoculum microbien initial, affectant le développement du biofilm. En effet, le biofilm associé aux supports de première génération s'est développé à partir de biomasse congelée obtenue du bioréacteur opéré en mode continu (Fig. 4.1, BC) alors que celui associé aux supports de deuxième génération s'est développé à partir du biofilm présent sur les supports de première génération obtenus après cinq repiquages de culture en mode cuvée (Fig. 4.1 5b). Ainsi, durant les repiquages permettant l'adaptation, les relations entre les espèces présentes en diverses proportions ont pu permettre un développement différent du biofilm. Par exemple, dans le biofilm associé aux supports de première génération, la souche NL23 était présente en forte proportion dans la biomasse congelée et au premier repiquage, pour ensuite diminuer de plusieurs ordres de grandeur après le cinquième repiquage. Le biofilm associé aux supports de deuxième génération ayant été développés à partir de la biomasse issue du précédent biofilm (supports de première génération) n'a pas conservé la souche NL23 présente en proportion trop faible dans l'inoculum initial. La disparition de la souche NL23, entre autres, a pu mener à l'accroissement d'autres espèces, présentes en proportions mineures dans le biofilm associé aux supports de première génération, au sein du biofilm associé aux supports de deuxième génération. Ce phénomène peut également expliquer pourquoi le taux de dénitrification spécifique conféré par la culture de référence a baissé d'un essai à l'autre lors de l'étude préliminaire, où des supports de deuxième génération ont été créés à plusieurs reprises (Tableau 4.10). Cependant, comme aucun changement drastique dans les deux profils PCR-DGGE issus du biofilm associé aux supports de première et de deuxième génération n'était observable, les essais concernant l'impact des paramètres physicochimiques ont donc été effectués sur un biofilm avec une population similaire, et non avec une population en constante évolution. Dans le but de confirmer ce phénomène, des études ultérieures de pyroséquençage pourraient être effectuées pour permettre une analyse plus en profondeur de la diversité bactérienne lors des 5^{ème}, 10^{ème}, 15^{ème}, 20^{ème} et 25^{ème} repiquages.

5.2.1 Influence de la concentration en nitrate et en méthanol (C/N = 1,5)

Pour des concentrations de 300 à 1 500 mg-N L⁻¹ (C/N = 1,5), le tableau 4.3 indique un taux de dénitrification spécifique plus élevé lorsque le biofilm a été exposé à des concentrations variant de 600 à 1 500 mg-N L⁻¹, avec une activité optimale à 900 mg-N L⁻¹ supérieure de 73 % en comparaison à la culture de référence. Cette augmentation de la vitesse de la réaction de dénitrification peut correspondre à la saturation des enzymes impliquées dans la dénitrification. Ainsi, malgré une augmentation de la concentration en substrat à 1 500 mg-N L⁻¹, la réaction ne peut s'effectuer plus rapidement.

Également, la réduction de nitrate et de nitrite était complète pour une gamme s'étendant de 300 à 1 500 mg-N L⁻¹ (Fig. 4.9). Dans la littérature, il a été reporté que la dénitrification peut s'effectuer sur une large gamme de concentrations en nitrate. Cependant, comme présenté dans la section 5.1, de trop hautes concentrations en nitrate tendent à inhiber le processus conséquemment à une accumulation toxique de l'intermédiaire nitrite même si les bactéries

possèdent la machinerie enzymatique pour l'utiliser (Glass et Silverstein, 1997, Glass *et al.*, 1997). Une plus grande concentration en nitrate initiale provoquera une importante accumulation en nitrite. Certaines espèces plus sensibles comme *P. denitrificans* peuvent voir leur activité dénitrifiante inhibée à partir de 150 mg-N L^{-1} de nitrite (Glass *et al.*, 1997).

La figure 4.9 démontre que la concentration en nitrite maximale n'a pas dépassé les 200 mg-N L⁻¹ pour aucune des concentrations en nitrate testées, suggérant que cette concentration est un facteur pouvant limiter le processus dénitrifiant dans le biofilm. Les résultats suggèrent que le biofilm régule les deux processus de réduction pour maintenir les concentrations en nitrite sous un seuil probablement critique de toxicité d'environ 200 mg-N L⁻¹. Ce phénomène a bien été démontré pour une exposition à 1 500 mg-N L⁻¹, où l'accumulation de nitrite a atteint environ 200 mg-N L⁻¹ pendant une dizaine d'heures. Comme la réduction de nitrate est demeurée constante pour les concentrations testées, l'augmentation du taux de dénitrification spécifique pour les concentrations plus élevées en nitrate de 600 à 1 500 mg-N L⁻¹ était principalement due à une réduction du nitrite plus efficace et favorisée par ces concentrations plus élevées en nitrate.

Concernant l'exposition à 3 000 mg-N L^{-1} (C/N = 1,5; Fig. 4.10), une absence de réduction de nitrate a été observée. L'absence de réduction de nitrate ne semble pas avoir été associée à une concentration trop importante de nitrate, car la toxicité de hautes concentrations en nitrate est causée par l'accumulation subséquente d'importantes concentrations de nitrite. Comme il n'y a pas eu d'accumulation de nitrite dans cet essai, l'hypothèse pour expliquer l'absence de réduction repose plutôt sur une toxicité engendrée par l'importante concentration en méthanol (1,5 %) associée à cette concentration de nitrate, nécessaire à la conservation du ratio C/N de 1,5. La figure 4.14 où le biofilm a été exposé à la même concentration de nitrate initiale, pour une concentration moindre en méthanol de 0,15 % (C/N = 0,15), appuie également ce constat. En effet, malgré l'importante concentration de nitrate initiale, le biofilm a réduit rapidement près de la moitié du nitrate dans les 48 premières heures. Lors de cette réduction, une accumulation de nitrite maximale de 273 mg-N L⁻¹ a été observée. S'en est suivi un arrêt de la réduction de nitrate et une réduction complète du nitrite accumulé jusqu'à la 118^{ème} heure d'incubation. Lors de l'ajout de la même concentration initiale de méthanol à ce moment, 20 % supplémentaire de nitrate a été réduit, sans accumulation de nitrite, avant qu'un arrêt ait été observé. Cet arrêt a pu être causé par l'accumulation de nitrite dépassant les 200 mg-N L⁻¹ ou une baisse importante de l'activité dénitrifiante enregistrée pendant plus de 70 heures conséquemment à l'insuffisance en

méthanol, qui aurait engendré des dommages au niveau des interactions et du fonctionnement de la communauté bactérienne. Cependant, la comparaison avec les deux dynamiques de dénitrification pour une même concentration de 3 000 mg-N L⁻¹ démontre clairement que de fortes concentrations en méthanol inhibent l'activité du biofilm. En effet, une réduction totale de 70 % de la concentration initiale d'azote total a été enregistrée lorsque le biofilm a été exposé à une quantité moindre de méthanol (C/N = 0,15) en comparaison avec une réduction quasi nulle lorsque cette concentration a été élevée (C/N = 1,5).

La toxicité du méthanol est fréquemment causée par sa métabolisation en formate ou en formaldéhyde, des intermédiaires qui interagissent de manière létale avec les acides nucléiques, les protéines et d'autres constituants cellulaires (Barber, R. D. et Donohue, 1998 et Head, 2005). Pluschkell et Flickinger (2002), ont observé une accumulation toxique de formaldéhyde et de formate dans une culture du méthylotrophe *Bacillus methanolicus* MGA3 soumise sans acclimatation à des concentrations en méthanol élevées. L'incidence de la toxicité du méthanol sur la viabilité bactérienne aurait pu être examinée en regardant au microscope le biofilm exposé à de fortes et faibles concentrations en méthanol après une coloration avec un mélange spécifique de colorant contenu dans le « LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kit » (Life Technologies). Les bactéries vivantes seraient apparues en vert et les mortes en rouges.

5.2.2 Influence du ratio C/N

Un ratio C/N adéquat est crucial pour favoriser une activité dénitrifiante optimale et éviter l'accumulation, dans l'environnement dénitrifiant à traiter, de composés toxiques envers la faune et la flore marine ainsi que la communauté microbienne dénitrifiante. Généralement, le ratio C/N optimal à la dénitrification se situe entre 1,5 et 5,0 (Halling-Sorensen et Jorgensen, 1993). Pour une concentration initiale de composés azotés et une source de carbone donnée, un dosage adéquat peut être estimé selon l'équation stoechiométrique associée. Dans le cas du méthanol, l'équation stoechiométrique suivante confère un ratio C/N théorique de 0,71:

5 CH₃OH + 6 NO₃⁻ \rightarrow 3 N₂ + 5 CO₂ + 7 H₂O + 6 OH⁻ (Halling-Sorensen et Jorgensen, 1993).

En pratique, ce ratio est cependant plus élevé, car il ne considère ni l'assimilation nécessaire à la croissance microbienne, ni la présence résiduelle d'oxygène trouvée dans l'eau de plusieurs systèmes de traitement et rencontrée surtout en mode cuvée conséquemment aux entrées séquentielles d'oxygène (Liu *et al.*, 2009 et Shahabi et Naeimpoor, 2014). Ainsi, des essais où plusieurs ratios C/N sont testés pour trouver le ratio optimal à chaque système de traitement biologique doivent être effectués.

Lorsque le biofilm a été exposé à des concentrations variables de méthanol pour une concentration fixe de 300 mg-N L⁻¹, le taux de dénitrification spécifique le plus faible a été associé à la concentration de 0,0 % (C/N = 0,0; Tableau 4.4). Théoriquement, une exposition à 0,0 % de méthanol ne devrait pas engendrer de réduction de nitrate, puisqu'aucun donneur d'électrons n'était présent dans l'environnement bactérien. Cependant une réduction de 80 % de l'azote total a été observée en 48 heures (Fig. 4.12). Cette réduction a débuté en force pour s'estomper graduellement en fonction du temps. Comme le biofilm a été précédemment cultivé dans un milieu riche en méthanol, les bactéries le composant ont pu synthétiser les enzymes nécessaires à sa métabolisation. Lors du passage rapide du biofilm d'un milieu riche en méthanol à un milieu pauvre en méthanol, les enzymes synthétisées et les intermédiaires métaboliques du méthanol ont pu être conservés, permettant un certain apport d'électrons supportant la dénitrification. Cependant, en fonction du temps, ces composés ont été épuisés sans régénération dans le milieu exempt de méthanol, ce qui a probablement causé, petit à petit, une diminution de la réduction de nitrate et de nitrite, jusqu'à son arrêt. Également, l'utilisation d'exopolysaccharides (constituants des EPS) pour en tirer de l'énergie pourrait être probante et a déjà été observée dans la littérature. Cependant, les exopolysaccharides ne jouent généralement pas le rôle de source d'énergie et en monoculture, les souches les produisant ne sont pas en mesure de les consommer (Bergmaier, 2011).

Contrairement aux concentrations plus élevées en méthanol qui ont été testées, pour une concentration de 0,05 % de méthanol (C/N = 0,5), la figure 4.11 démontre un léger ralentissement au niveau de la réduction du nitrate et un important ralentissement au niveau de la réduction du nitrate et un important ralentissement au niveau de la réduction du nitrate. Cette dynamique peut être attribuée à l'insuffisance en méthanol qui diminue la vitesse d'activité enzymatique. En effet, conséquemment à une saturation en substrat, les concentrations en méthanol de 0,15 et 0,5 % (C/N respectivement de 1,5 et 5,0) semblaient conférer une vitesse enzymatique maximale de métabolisation du méthanol, fournissant une

concentration en électrons adéquate à une activité dénitrifiante optimale. Le ratio C/N de 0,5 semblait, au départ, suffisant au maintien d'une activité enzymatique comparable. Cependant, une légère diminution de la réduction de nitrate a été observée suite à la consommation de ce dernier, à partir de la sixième heure d'incubation. La réduction du nitrate est la première étape de la dénitrification et a été peu affectée par cette réduction graduelle en méthanol. Cependant, arrivé à la réduction en nitrite, encore moins de méthanol était disponible et de ce fait, la concentration disponible d'électrons était diminuée tout comme la réduction de nitrite, ayant ainsi engendré une accumulation plus grande de cet intermédiaire. La littérature reporte de nombreux exemples où un ratio C/N trop faible mène à une dénitrification incomplète ou ralentie suite à l'accumulation d'intermédiaires de la dénitrification comme le nitrite ou l'oxyde nitreux, des composés potentiellement toxiques (Shahabi et Naeimpoor, 2014). Oh et Silverstein (1999) ont obtenu des résultats en partie similaires à ceux présentés dans ce paragraphe, dans leur étude portant sur des boues activées dénitrifiantes. Pour une exposition à un ratio C/N de 2,0 ou de 3,0, le nitrate était entièrement consommé au même taux sans accumulation de nitrite. Lorsque ce ratio a été diminué à 1,0, pour une réduction de nitrate complète, une accumulation en nitrite de 50 % de la concentration initiale de nitrate a été observée. Cependant, contrairement à mes résultats, Oh et Silverstein ont observé, pour ce ratio C/N plus bas, un taux de réduction de nitrate 33 % plus élevé, qu'ils ont expliqué par la compétition entre la respiration sur le nitrate et la respiration sur le nitrite pour une source limitée d'électrons.

Les ratios C/N de 1,5 et 5,0 ont conféré des taux de dénitrification spécifiques similaires et les plus élevés (Tableau 4.4). En plus des raisons économiques, plusieurs facteurs favorisent l'emploi du ratio C/N le plus faible de 1,5. Premièrement, un ratio C/N trop élevé peut mener à la réduction dissimilatoire du nitrate en ammonium (DNRA) et les composés ammoniacaux générés par cette réaction anaérobie sont très toxiques pour les organismes aquatiques (INRS, 2007 et Shahabi et Naeimpoor, 2014). Deuxièmement, si tout le nitrate est consommé et qu'une source de carbone est encore présente dans l'eau de mer riche en sulfates, une réaction anaérobie de sulfatoréduction menant à une accumulation de sulfure d'hydrogène, un composé toxique, peut prendre place. En effet, le sulfate possède un moins grand potentiel de réduction que le nitrate et n'est généralement pas utilisé lorsque ce dernier ion est présent. Cependant, certaines bactéries possédant les gènes nécessaires à sa réduction peuvent se servir du sulfate comme accepteur final d'électrons lorsque le nitrate vient à manquer ou n'est pas accessible (Labelle *et al.*, 2005).

Troisièmement, dans le système opéré en mode cuvée, les supports ont été transférés hebdomadairement en milieu frais et, selon leur rythme de consommation de nitrate, des concentrations en nitrate et en méthanol (C/N = 1,5) ont été rajoutées régulièrement pour maintenir le développement et l'activité du biofilm. Cependant, le méthanol est consommé moins rapidement que le nitrate (données non présentées), et des ajouts trop importants en méthanol auraient pu engendrer une accumulation importante de cet alcool dans le milieu de culture, pouvant inhiber l'activité dénitrifiante.

L'étude a également été reprise pour une concentration fixe de 0,15 % méthanol et des concentrations variables en nitrate. Elle démontre l'importance de considérer la concentration initiale de nitrate (NaNO₃-N) dans la recherche d'une activité dénitrifiante optimale. En effet, le taux de dénitrification spécifique le plus faible a été associé à la plus faible exposition en nitrate, soit 90 mg-N L⁻¹ (C/N = 5,0) (Tableau 4.5). La concentration en méthanol a permis l'apport d'une source d'électrons non limitante. Cependant, la faible concentration en nitrate initiale a engendré une limite dans la vitesse de réduction des enzymes impliquées dans la dénitrification, ce qui a provoqué un ralentissement au niveau de la réduction du nitrate (Fig. 4.13). À l'opposé, reprenant les tendances décrites dans la section 5.2.1, une concentration de 900 mg-N L^{-1} (C/N = 0,5) a conféré le meilleur taux de dénitrification spécifique (Tableau 4.5). Cependant, la dynamique de réduction du nitrite indique que cette dernière a subi un ralentissement (Fig. 4.13). En effet, la figure 4.9 démontre une réduction similaire en nitrate, et donc une production similaire de nitrite, pour toutes les concentrations en nitrate testées (C/N = 1,5). En comparaison avec une exposition à 300 mg-N L⁻¹, une réduction plus rapide de nitrite a été observée pour une exposition à 900 mg-N L⁻¹, car en début de graphique, pour un même temps, une accumulation moindre de nitrite a été détectée. Ce phénomène n'a toutefois pas été observé à la figure 4.13, indiquant un ralentissement de la réduction de nitrite conséquemment à une concentration en méthanol trop basse. Ainsi, un ratio C/N adéquat de 1,5 doit être priorisé et aurait probablement conféré un meilleur taux de dénitrification spécifique pour une exposition à 900 mg-N L⁻¹.

5.2.3 Influence du pH

Le pH optimal supportant la dénitrification se situe entre 7,0 et 8,0 selon l'espèce ou la communauté microbienne (Shahabi et Naeimpoor, 2014). Napier et Bustamante (1988) ont démontré dans une étude portant sur le traitement d'un étang hautement contaminé en nitrate que la dénitrification par un système de boues activées qui est opéré en mode continu dans un bioréacteur est affectée négativement lorsque le pH descend sous 6,8. Les pH acides inhibent les réductases impliquées dans la dénitrification, ce qui diminue le taux de dénitrification et engendre l'accumulation d'intermédiaire, particulièrement l'oxyde nitreux, un gaz à effet de serre puissant, car l'oxyde nitreux réductase est l'enzyme la plus affectée par les pH faibles (Knowles, 1982 et Pan *et al.*, 2012).

Comme une variation importante du pH, tant acide qu'alcaline, influence négativement la fonctionnalité des enzymes en altérant leur activité, leur fonctionnalité et l'attachement de substrats, l'absence de réduction de nitrate qui a été observée pour une exposition à un pH de 10,0 (Fig. 4.15) n'est pas surprenante (Berg et al., 2007). Par contre, contrairement à la dynamique attendue en fonction de la littérature, les taux de dénitrification spécifiques les plus élevés avaient été obtenus pour une exposition aux pH initiaux de 4,0 et de 6,0 (Tableau 4.6). La figure 4.15 démontre que pour une exposition aux pH de 4,0; 6,0 et 8,0, la réduction du nitrate s'est effectuée à la même cadence. C'est la réduction de nitrite qui s'est effectuée plus rapidement et de façon plus synchronisée avec la réduction de nitrate, en générant moins d'accumulation de nitrite, et conférait une meilleure activité dénitrifiante aux pH acides. Le tableau 4.7 indique cependant que le pH acide n'est pas demeuré stable dans le milieu tout au long de la dénitrification. En effet, en fin de cinétique, les pH acides initiaux avaient atteint des valeurs près de 8,0 conséquemment à l'emploi de tampon KH₂PO₄ qui entre dans la composition du milieu EMS et qui n'est pas adapté au maintien des pH acides. En comparaison, seule une légère hausse a été observée pour l'incubation à pH 8,0. Cette hausse du pH résulte du relâchement d'ions hydroxyles pendant le processus de dénitrification (Shahabi et Naeimpoor, 2014). Comme le pH acide n'est pas demeuré stable lorsque le biofilm a été exposé aux pH de 4,0 et de 6,0, l'augmentation de l'activité dénitrifiante ne peut y être directement corrélée. Également, des essais d'adaptation du biofilm en mode cuvée à partir de la biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal ont été effectués ultérieurement à ces pH et se sont avérés infructueux en comparaison avec l'adaptation à un pH de 8,0 (données non présentées), respectant les tendances retrouvées dans la littérature. Un facteur peut potentiellement expliquer l'augmentation de l'activité dénitrifiante pour l'exposition aux pH acides présentés dans la figure. 4.15 et le tableau 4.6. À un pH de 7,0 et plus, le milieu EMS est trouble, résultant d'un certain niveau de précipitation de ses composés (Fig. 3.1 à gauche). L'importance de ce précipité a augmenté proportionnellement avec l'augmentation du pH du milieu de culture. Il n'a cependant pas été observé aux pH acides de 4,0 et de 6,0, impliquant que tous les constituants du milieu de culture étaient solubles et accessibles au biofilm. À la fin des cinétiques de dénitrification présentées dans cette section ayant été effectuées aux pH de 4,0 et de 6,0, malgré la remontée du pH près de 8,0, aucun précipité n'a été observé dans les fioles (données non présentées), indiquant une consommation ou une utilisation de ces éléments chimiques par le biofilm, pouvant probablement permettre l'augmentation de l'activité dénitrifiante. Dans le même ordre d'idée, à pH 10,0, un important précipité a été observé et pratiquement aucune activité n'a été détectée.

5.2.4 Influence de la température

Les résultats indiquent que l'activité dénitrifiante a diminué constamment à partir des températures plus élevées jusqu'aux plus basses (Fig. 4.16 et Tableau 4.8). Conséquemment à une augmentation de la réduction de nitrate ou de nitrite, les taux de dénitrification spécifiques les plus élevés ont été obtenus pour des températures de 30 et 36 °C où, en comparaison avec la culture de référence, une augmentation respective d'environ 48 et 65 % a été observée. Une température de 15 °C a conféré une légère diminution du taux de dénitrification spécifique par rapport à la culture de référence qui était principalement causée par une diminution de la réduction de nitrite. Une incubation à 5 °C a grandement affecté la réduction du nitrate et du nitrite, où seuls 30 % de l'azote total a été réduit après 32 heures d'incubation, ce qui a représenté une baisse de 77 % du taux de dénitrification spécifique en comparaison avec la culture de référence.

Plusieurs études ont démontré que des températures ambiantes ou subambiantes favorisent la dénitrification. Dans leur étude portant sur le traitement des eaux souterraines à l'aide de bioréacteurs dénitrifiants, Amatya *et al.* (2009) ont exposé une culture microbienne à des températures variant de 10 à 30 °C et ont démontré une augmentation graduelle du taux de

dénitrification à partir de 16 °C. Cette dernière a atteint son activité maximale à 30 °C. Une autre étude menée par Volokita *et al.* (1996) portant sur le traitement des eaux souterraines par une population microbienne dénitrifiante appuie ces résultats de même que ceux présentés dans cette section. L'étude a en effet démontré que la dénitrification était affectée négativement par de faibles températures lorsqu'une diminution d'environ 50 % de l'activité dénitrifiante a été observée pour une incubation à 14 °C plutôt qu'à 30 °C. En guise de comparaison, le tableau 4.8 démontre un taux de dénitrification spécifique qui a diminué d'environ 50 % pour une incubation à 15 °C plutôt qu'à 30 °C. Aussi, dans leur étude portant sur le traitement de lixiviats de décharge sanitaire contaminés en nitrate, Ilies *et al.* (2001) ont démontré qu'une baisse de 15 % de la dénitrification, effectuée par une population microbienne trouvée dans un procédé à boues activées supplémenté en méthanol, a été obtenue en abaissant la température d'incubation seulement de 20 °C à 17 °C. Cette baisse s'est graduellement intensifiée jusqu'à 10 °C, incubation à la température la plus faible qui a été testée. Le tableau 4.8 démontre les mêmes tendances avec une baisse de 23 % au niveau du taux de dénitrification spécifique lorsque la température d'incubation est passée de 23 à 15 °C.

Cette préférence pour les températures ambiantes et subambiantes est associée au caractère mésophile de la majorité des espèces dénitrifiantes (Casella *et al.*, 1996). L'étude menée par Saleh-Lakha *et al.* (2009) a démontré que des températures sous-ambiantes tendent à diminuer l'expression des gènes impliqués dans la dénitrification. En effet, un suivi chez l'espèce mésophile *P. mandelii* par RT-PCR a démontré une expression supérieure du gène *cnorB* de 9 et 94 fois pour des incubations respectives à 20 et 30 °C, en comparaison avec une incubation à 10 °C. Concernant l'expression de *nirS*, elle a augmenté de 17 fois pour les deux températures les plus élevées, en comparaison avec une exposition à 10 °C.

5.3 Influence de la concentration en NaCl

Dans l'étude préliminaire, la figure 4.17 et le tableau 4.9 démontrent qu'une variation de la salinité du milieu de culture passant de 0,0 à 8,0 % NaCl n'affectait en aucun point l'activité dénitrifiante du biofilm. La littérature rapporte pourtant que la salinité a un impact important sur

plusieurs processus microbiens. Les conséquences osmotiques de la variation de la salinité chez les microorganismes se font sentir lorsqu'ils sont placés dans un environnement à salinité plus élevée, conséquemment à la plasmolyse, à la déshydratation, à l'inhibition de plusieurs enzymes et à la perte d'activité cellulaire qui en résulte (Aminzadeh *et al.*, 2010 et Breisha, 2010). D'un autre côté, l'exposition à une concentration faible en NaCl chez les biotes adaptés à de hautes concentrations en NaCl peut également causer des dommages suite à l'éclatement cellulaire. Ainsi, les changements de salinité importants applicables à une culture développée à un certain niveau de salinité engendrent souvent une perte de son efficacité (Dincer et Kargi, 1999).

Les conséquences osmotiques de la variation de salinité chez les microorganismes se font cependant moins sentir dans l'environnement protecteur qu'est le biofilm (Qurashi et Sabri, 2012). En effet, l'osmotolérance peut être associée à la production d'exopolysaccharides et l'accumulation d'osmolytes, deux constituants pouvant être trouvés en grande concentration au sein d'un biofilm. L'excrétion de matrice agit comme une frontière entre les bactéries et l'environnement dans lequel elles se trouvent, les protégeant ainsi des stress osmotiques hostiles (Qurashi et Sabri, 2011). Concernant l'adaptation à de hautes concentrations en NaCl, *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 qui a été retrouvé abondamment dans le biofilm a pu produire des osmo-protectants comme l'ectoine, phénomène qui a pu protéger les espèces supportant moins bien le NaCl. Ces substances sont confinées au sein du biofilm par la matrice d'EPS et sont donc accessibles à toute la communauté (Plakunov *et al.*, 2008).

Suite à l'étude préliminaire, pour l'adaptation à de hautes concentrations en NaCl, le biofilm développé à partir de la biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal dans les conditions fortement salées de 5,0 et 8,0 % NaCl a montré une diversité bactérienne semblable à celle développée à 2,75 % NaCl (Fig. 4.18). La culture dans de hautes concentrations en NaCl avait permis l'augmentation et le maintient de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 à un niveau similaire, c'est-à-dire supérieur à 10⁵ copies de *narG1*/ng ADN, autant pour une culture à 2,75 qu'à 5,0 ou 8,0 % NaCl (Fig. 4.18 et 4.19). Cette souche est bien adaptée à la culture en condition salée et peut croitre en culture pure sur une gamme s'étendant de 0,5 à 8,0 % NaCl (Villeneuve *et al.*, 2012). La souche *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 qui ne tolère pas des concentrations en NaCl supérieur à 1,0 % en culture pure (Martineau *et al.*, 2013) a diminué graduellement en fonction des repiquages, pour les trois concentrations en NaCl mentionnées ci-

haut, jusqu'à l'atteinte d'une concentration minimale près de 10^2 copies de *napA*/ng ADN (Fig. 4.18 et 4.19).

L'effet de l'adaptation aux concentrations hautement salées est dramatiquement démontré dans le tableau 4.11 où une diminution respective de 99 et 97 % de la biomasse (mg-protéines par fioles) a été observée pour une culture à 5,0 et 8,0 % NaCl, en comparaison avec une culture à 2,75 % NaCl. Ce faible développement de la biomasse s'est fait également ressentir sur le taux et la dynamique de dénitrification (Fig. 4.21 et Tableau 4.11). Toutes les bactéries possèdent une concentration optimale en NaCl et peuvent tolérer une gamme de concentrations permettant leur croissance, dont l'étendue des limites dépend de chaque bactérie. Lorsqu'une population donnée est forcée d'opérer près des limites de cette gamme, sa croissance décline tout comme son activité biologique et l'utilisation de substrat (Pettersson, 2004). Les résultats du tableau 4.11 indiquent que les bactéries trouvées dans l'inoculum initial ne pouvaient s'adapter pour croitre de manière optimale à des concentrations élevées en NaCl. L'impact de l'exposition à de fortes concentrations en NaCl sur la croissance de bactéries halotolérantes a été étudié par Qurashi et Sabri (2011). Ils ont soumis O. profundus Pmt2 et S. saprophyticus ST1 à des concentrations en NaCl variant de 0,0 à 2,5 M et ont démontré, par la mesure de densité optique, que la croissance bactérienne des deux souches diminuait à l'atteinte des concentrations en NaCl les plus élevées. Les résultats présentés dans cette section indiquent que les mêmes tendances ont été rencontrées au sein du biofilm. Plusieurs études ont cependant démontré l'importance d'une acclimatation progressive d'une communauté bactérienne envers des concentrations en NaCl croissante pour l'obtention d'une croissance et d'une activité dénitrifiante soutenue et la plus optimale possible (Breisha, 2010). Li et al. (2009) recommandent à cet effet une acclimatation sur une période d'une vingtaine de jours avec des augmentations graduelles du niveau de salinité pour éviter un stress trop important. Cependant, le temps d'adaptation semble propre à la dynamique de chaque communauté bactérienne. Ainsi, une meilleure croissance et un meilleur taux de dénitrification auraient sans doute été obtenus par une adaptation graduelle de la biomasse à des concentrations croissantes en NaCl, évitant ainsi un choc osmotique direct trop important et néfaste au bon fonctionnement de la communauté.

Malgré une faible biomasse et un faible taux de dénitrification, les taux de dénitrification spécifiques ayant été obtenus de l'adaptation dans les concentrations hautement salées surpassaient d'au moins 75 % celui ayant été obtenu à 2,75 % NaCl, indiquant que la faible

quantité de biomasse qui s'y était développée était très active (Tableau 4.11). Toutefois, ce taux est plus représentatif de la réduction unique du nitrate, car la réduction du nitrite a été grandement sinon totalement inhibée (Fig. 4.21).

Finalement, la condition 5,0 % NaCl R8 où le biofilm a été développé pour cinq repiquages à 2,75 % NaCl et pour trois repiquages supplémentaires à 5,0 % NaCl indique que le biofilm pouvait être cultivé dans un milieu à 5,0 % NaCl sans perte d'activité dénitrifiante (Fig. 4.21 et Tableau 4.11). Cette tendance a également été démontrée dans l'étude préliminaire (section 5.2.5), mais sur une période plus courte de moins de trois jours. La figure 4.21 indique même que la réduction de nitrite y a été environ deux fois plus rapide, de manière à se synchroniser davantage avec la réduction de nitrate. Également, la biomasse a continué à se développer pendant les trois repiquages supplémentaires pour devenir environ 2 fois plus abondante. Le profil de diversité bactérienne dominante qui est visible sur gel PCR-DGGE est demeuré en tout point similaire avant et après les trois repiquages supplémentaires à 5,0 % NaCl (Fig. 4.18). Également, malgré le doublement de la biomasse, le taux de dénitrification spécifique significativement inchangé indique que la diffusion du substrat au travers du biofilm n'a pas été affectée négativement. Finalement, l'approche d'adaptation en premier aux conditions standards d'eau de mer suivie d'une adaptation en eaux plus salées permettrait une bioremédiation efficace de source d'eau salée hautement contaminée en nitrate.

Concernant l'adaptation à de faibles concentrations en NaCl, les profils de diversités ont indiqué que la population s'est également adaptée légèrement à ces conditions (Fig. 4.22). Le profil général de diversité dominante entre toutes les conditions testées différait peu. Le biofilm cultivé à 0,0 et 0,5 % NaCl possédait toutes les bandes présentent chez le biofilm cultivé à 2,75 % NaCl, en plus de quelques bandes supplémentaires. C'est principalement le maintien d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 pour une adaptation à 0,0 et à 0,5 % NaCl qui a constitué le plus grand changement en comparaison avec la culture de référence. Cette souche qui tolère mal les hautes concentrations en NaCl a pu donc se maintenir à de faibles concentrations en NaCl dans le milieu EMS. La souche JAM1 dominait toujours pour toutes les concentrations en NaCl testées. La figure 4.23 indique qu'à 0,0 et à 0,5 % NaCl, les deux souches étaient retrouvées au même niveau, supérieur à 10⁴ copies de gènes/ng ADN, dans le même ordre de grandeur qu'elles avaient été retrouvées au Biodôme de Montréal en mode continu (Auclair *et al.*, 2012). Pour une culture dans 1,0 % et 2,75 % NaCl, un débalancement créé par la salinité croissante a fait en sorte

que la souche NL23 a diminué respectivement à environ 10^3 et 10^1 copies de *napA*/ng ADN. Les résultats enregistrés à 0,0 et 0,5 % NaCl confirment le constat présenté dans la section 5.1 indiquant que ce n'est pas le mode cuvée qui était responsable de la perte de la souche NL23 dans le biofilm, mais bien le type de milieu de culture.

La dynamique de réduction de nitrate présentée à la figure 4.24 démontre qu'elle s'est réalisée plus rapidement pour une culture à 0,5; 0,0 et 2,75 % NaCl qu'à 1,0 % NaCl. À travailler avec une culture pure, ce résultat serait surprenant. Cependant, les espèces présentes au sein du consortium bactérien ont pu engendrer ce genre de dynamique, où, aux concentrations faiblement salées, une population X de bactéries serait amenée à réduire le nitrate et à de plus hautes concentrations en NaCl, une population Y serait amenée à faire de même. Ainsi la culture à 1,0 % NaCl représenterait un entre-deux qui ne serait ni optimal pour les populations stimulées par de faibles ou fortes concentrations en NaCl. Cette hypothèse est également appuyée par les courbes représentant la réduction du nitrite. En effet, cette dernière n'a été dramatiquement affectée que pour la condition de culture à 1,0 % NaCl où elle s'est opérée pratiquement en un temps deux fois plus lent en comparaison avec toutes les autres concentrations.

Le tableau 4.12 indique de le biofilm ne s'est pas développé au même rythme pour la culture dans les faibles concentrations en NaCl testées. En effet, la concentration en protéines la plus élevée a été trouvée pour une culture à 2,75 % NaCl, alors qu'à 0,0 % NaCl, elle y était la plus faible et était pratiquement diminuée de moitié. La différence concernant la concentration en protéines pour les concentrations en NaCl testées se voyait visuellement et peut être expliquée par deux phénomènes. Premièrement, l'inoculum initial était constitué de bactéries bien adaptées aux conditions salées qui étaient anciennement cultivées dans le milieu IO qui possède un niveau de salinité comparable à l'EMS régulier (2,75 % NaCl). Les bactéries présentes ont donc pu croitre plus efficacement à 2,75 % NaCl. Deuxièmement, il est mentionné dans la littérature que plus un biofilm est développé en condition salée, plus il produit de matrice pour se protéger de cet environnement (Jahn et Nielsen, 1998). La matrice est constituée de matériel extracellulaire, dont des protéines (Jiao et al., 2010). Malgré cette différence de concentration en protéines, en comparaison avec une culture à 2,75 % NaCl, des taux de dénitrification similaires ou légèrement plus faibles ont été mesurés respectivement pour une culture à 0,5 et 0,0 % NaCl. Les taux de dénitrification spécifiques associés à chacune des concentrations étaient toutefois significativement différents les uns des autres, et ils étaient les plus élevés et supérieurs d'environ 73 et 35 %, respectivement, pour une culture à 0,0 et 0,5 % NaCl en comparaison avec la culture de référence (Tableau 4.12). Les taux supérieurs de dénitrification spécifiques pouvaient être associés en partie à une meilleure diffusion du milieu de culture à traiter au travers du biofilm.

5.4 Adaptation à des températures et/ou à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées

Les profils de diversité étaient très semblables pour des températures de 23 et 30 °C et des concentrations en nitrate de 300 et 900 mg-N L⁻¹ (Fig. 4.25), impliquant que ces paramètres n'engendrent pas de pression sélective sur la communauté bactérienne dominante du biofilm. La littérature relève souvent que la température affecte la diversité des populations microbiennes aquatiques ou terrestres. Par exemple, Ranneklev et Baath (2000) ont vu leur communauté bactérienne issue de tourbières changer et s'adapter selon la température optimale de croissance de chaque bactérie lorsqu'elle a été incubée à 25 ou à 35 °C. Nos résultats de PCR quantitative ont été également très semblables, où *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 a augmenté au fil des repiquages pour atteindre une concentration supérieure à 10⁵ copies de *narG1*/ng ADN au cinquième repiquage et où *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 a diminué à chaque repiquage pour atteindre une concentration supérieure à 10¹ ng de *napA*/ng ADN (Fig. 4.26). La température optimale des deux souches est de 30 °C.

Le tableau 4.13 indique que le biofilm ne s'est pas développé au même rythme pour toutes les conditions testées. En effet, une quantité plus faible de biomasse a été associée aux cultures à 30 °C. Cependant cette mesure n'était pas un reflet de la dynamique de croissance réelle observée pendant les cinq repiquages de culture. En effet, la biomasse qui s'est établie à 30 °C tendait à se détacher facilement des supports, ce qui entraînait un grand dépôt au fond des fioles et une perte plus importante de biomasse au moment de chaque transfert des supports (données non présentées). Geier (2008) rapporte que la température optimale de croissance d'une espèce en culture planctonique est souvent plus élevée que sa température optimale pour la formation de biofilm et que les températures élevées corrèlent avec une dispersion (détachement) plus élevée du biofilm chez plusieurs souches. Également, selon le stress conféré par le milieu de culture (riche ou pauvre), des températures élevées ont été associées à une croissance plus rapide,
mais également à un détachement cellulaire plus important, lors d'une étude portant sur la formation de biofilm chez *P. putida* par Morimatsu *et al.* (2012). Dans une autre étude menée par Martín-Rodríguez (2014) portant sur l'impact du milieu de culture et de la température d'incubation sur la formation de biofilm chez *S. algae*, certains milieux de culture ont également engendré une diminution significative dans la densité optique du biofilm obtenu pour un même temps lors d'une incubation à 32 plutôt qu'à 26 °C. Cette perte continuelle de biomasse comporte des avantages et des inconvénients concernant une optique d'application dans un bioréacteur. D'un côté, elle permet une diffusion plus adéquate du milieu à traiter à travers l'ensemble du biofilm, pouvant engendrer une dénitrification plus efficace. De l'autre, elle peut entrainer le colmatage des tuyaux et des problèmes de nettoyage.

Le taux de dénitrification a été plus élevé pour des températures de 30 0 C et le taux de dénitrification spécifique l'a été d'autant plus, où, en comparaison avec la culture de référence, l'adaptation à 30 0 C pour 300 et 900 mg-N L⁻¹ équivalait à une hausse d'environ 80 % (Tableau 4.13). La hausse de l'activité dénitrifiante pour une adaptation à 900 mg-N L⁻¹ à 30 0 C a été uniquement causée par la température plus élevée comme le démontre la figure 4.28. Il n'y a donc pas eu d'effet synergique entre les deux facteurs. Comme la majorité des bactéries dénitrifiantes sont des mésophiles, la culture à une température sous-optimale tend à réduire leur activité (Casella *et al.*, 1996 et Ranneklev et Baath, 2000). Finalement, suivant l'adaptation, le biofilm n'a pas offert de performances dénitrifiantes supérieures pour une concentration de nitrate (C/N = 1,5) plus élevée. Cependant, le tableau 4.13 et la figure 4.28 indiquent qu'il peut réduire, au même taux de dénitrification spécifique que la culture de référence adaptée à 300 mg-N L⁻¹(C/N = 1,5), une quantité en nitrate trois fois supérieure.

5.5 Étude du métagénome des gènes de l'ARNr 16S sur le biofilm adapté à des températures et à des concentrations en nitrate (C/N = 1,5) élevées ainsi qu'à de faibles concentrations de NaCl

Une ou plusieurs espèces associées au genre *Methylophaga* dominaient dans toutes les conditions testées et représentaient de 85,4 à 97,7 % des séquences (Fig. 4.29A). Ce genre était

présent en plus grande proportion dans les milieux fortement salés (2,75 % NaCl) et en plus faible proportion dans les milieux faiblement salés (0,0 et 0,5 % NaCl), tendances ayant également été retrouvées dans les analyses de qPCR présentées précédemment. La présence du genre *Methylophaga* dans un environnement marin supplémenté en méthanol n'est pas surprenante puisque les espèces y appartenant sont des halophiles méthylotrophes souvent isolées dans l'eau de mer ou l'eau saumâtre (moins salée que l'eau de mer) (Janvier *et al.*, 1985 et Villeneuve *et al.*, 2012). La capacité à croitre en absence d'oxygène et en présence de nitrate (conditions dénitrifiantes) n'a cependant été associée jusqu'à présent qu'à *Methylophaga sont considérées comme des aérobies stricts dans la littérature (Villeneuve et al.*, 2012).

Les séquences associées au genre *Hyphomicrobium* n'ont été détectées que dans les milieux faiblement salés de 0,0; 0,5 et 1,0 % NaCl, dans les proportions respectives suivantes : 11,8; 7,4 et 0,3 % (Fig. 4.29A). La présence du genre *Hyphomicrobium* dans un environnement dénitrifiant supplémenté en méthanol n'est pas surprenante, puisque les espèces y appartenant sont des méthylotrophes facultatifs dont certaines sont reconnues pour leurs capacités dénitrifiantes et sont souvent retrouvées dans des systèmes dénitrifiants d'assainissement nourris en méthanol (Martineau *et al.*, 2014 et Neef *et al.*, 1996). La diminution des séquences affiliées au *Hyphomicrobium* corrèle bien avec la persistance de la souche NL23 aux conditions de cultures à faibles concentrations de NaCl et son élimination à de plus forte.

Les résultats de pyroséquençage associés à la souche NL23 ne concordent toutefois pas parfaitement avec ceux relevés par la qPCR. En effet, pour des expositions à 0,0 et 0,5 % NaCl, les souches JAM1 et NL23 se sont retrouvées au même niveau selon les analyses de qPCR. Cette tendance n'a pas été observée dans les résultats de pyroséquençage, où la souche JAM1 y était au moins 8 fois plus dominante (Fig. 4.29A). Ce phénomène est causé par les gènes cibles qui sont différents selon le pyroséquençage (gène de l'ARNr 16S) et la qPCR (gène *narG1* et *napA*). L'emploi des gènes de l'ARNr 16S ne peut être utilisé pour comparer quantitativement et précisément l'abondance d'espèces dans une population, puisque le nombre de copies des gènes 16S présents dans le génome d'une bactérie varie d'un à quinze (Klappenbach *et al.*, 2001). Ainsi, la souche JAM1 qui en possède trois copies en comparaison avec la souche NL23 qui n'en possède qu'une seule a paru plus dominante qu'elle ne l'est en réalité dans la population (Martineau *et al.*, 2014 et Villeneuve *et al.*, 2012). Ce phénomène n'a pas été observé dans les analyses de qPCR comme énoncé précédemment dans la section 5.1. Également, l'analyse de diversité par l'emploi des gènes 16S peut conduire à une sous-évaluation de cette dernière, notamment par l'utilisation d'amorces universelles qui n'ont pas la même capacité d'hybridation selon la séquence des gènes 16S d'un organisme donné et l'amplification préférentielle des gènes riche en acides nucléiques « A » et « T » pour lesquels la dénaturation est facilitée (Martin, 2011). Ce phénomène peut expliquer l'absence de détection du genre *Hyphomicrobium* (contenu en GC ~64 %; Martineau *et al.*, 2014) dans la communauté bactérienne cultivé à 2,75 % NaCl et sa faible détection par qPCR.

Le genre Marinicella a été affilié à 0.9 - 5.0 % des séquences issues de la communauté pour la quasi-totalité des conditions testées (Fig. 4.29A). Ce genre caractérisé par des organismes anaérobies facultatifs a été identifié pour la première fois en 2009 suite à l'analyse d'un échantillon prélevé dans l'eau de mer côtière au Japon (Romanenko et al., 2009). Il peut croitre sur un intervalle de 1,0 à 5,0 % NaCl et de manière optimale à environ 2,5 % NaCl, pouvant expliquer pourquoi à 0,0 % NaCl, le genre n'a été associé qu'à 0,2 % des séquences. Sa température optimale de croissance se situe entre 25 et 28 °C, pouvant expliquer pourquoi il a été trouvé dans les proportions les plus élevées pour des cultures à 30 °C. Même s'il a été trouvé en plus faible proportion en comparaison avec les genres Methylophaga ou Hyphomicrobium (lorsque présent), il arrivait au 2^{ème} ou 3^{ème} rang en termes d'espèces dominantes dans la communauté, selon les analyses de pyroséquençage. Cette abondance élevée en comparaison avec d'autres espèces catégorisées ici de mineures pourrait laisser croire qu'il est impliqué significativement directement ou indirectement dans le processus de dénitrification et/ou la structure du biofilm. Cependant, ce genre est caractérisé dans la littérature comme étant incapable de réduire le nitrate selon le test API 20 NE (Romanenko et al., 2009). Il est tout de même possible que certaines espèces associées au genre Marinicella possèdent des capacités dénitrifiantes, car d'autres espèces en possédant ont présenté ce même résultat négatif en galerie API, à l'exemple de Hyphomicrobium nitrativorans NL23 (données non publiées de Christine Martineau chez le laboratoire du Prof. Villemur). Également, plusieurs types de dénitrifications incomplètes sont retrouvés chez le grand ensemble de dénitrificateurs existants, comprenant certaines bactéries ne réduisant que le nitrite (Carlson et Ingraham, 1982).

Selon la condition analysée, le dénombrement de l'ensemble des genres détectés s'est situé entre 20 et 40 (annexe G). Mis à part les trois genres majoritaires discutés ci-haut, cette diversité constituait de 0,8 à 3,3 % des séquences (Fig. 4.29A). En fonction des diverses conditions de culture et d'incubation dans lesquelles le biofilm s'est développé, leur quantité, leur identité et leur abondance variaient (Fig. 4.29B et annexe G). Par exemple, l'abondance du genre Aequorivita a chuté de 0,6 à 0,1 % des séquences lorsque le biofilm a été cultivé respectivement à 30 °C et 23 °C (2,75 % NaCl et 900 mg-N L⁻¹). La même tendance a été observée pour Pseudomonas. Également, la plupart des genres qui ont été détectés ont été isolés initialement d'environnements marins comme Winogradskyella, Thalassobacter, Sulfitobacter et Rhodovulum (Ivanova et al., 2004 et 2010; Macian et al., 2005 et Srinivas et al., 2006). Des genres qui ont été uniquement détectés à 0,0 et/ou à 0,5 % NaCl, à l'exemple de Azorhizobium, Afipia, Dinoroseobacter, Desulfuromonas, etc., indiquent qu'une salinité supérieure engendre une pression sélective ne permettant pas leur croissance. Les résultats démontrent donc qu'en fonction d'un même inoculum initial, le milieu de culture à salinité variable et la température d'incubation permettent la sélection d'espèces pouvant s'y adapter, menant ici à l'obtention de populations uniques aux capacités dénitrifiantes variables. Aussi, certaines espèces mineures qui étaient présentes dans le biofilm sont en mesure de métaboliser le méthanol comme Pseudomonas, Rhodobacter et Paracoccus (Bellion et Tan, 1984; Doronina et Trotsenko, 2000 et Neef et al., 1996). Cependant, d'autres types d'organismes qui étaient présents au sein du biofilm nécessitent l'apport d'autres sources de carbone pour se développer, à l'exemple du formaldéhyde et du dioxyde de carbone produits par le métabolisme du méthanol, impliquant qu'ils doivent se servir de métabolites produits par le consortium microbien (cross-feeding). Par exemple, des espèces associées au genre Rhodobacter sont formaldéhydes facultatifs ou peuvent croitre sans source de carbone organique en utilisant le dioxyde de carbone (Schreier *et al.*, 2010; Wang et al., 1997 et Wilson et al., 2008). Également, les genres Stappia et Winogradskyella, entre autres, ne peuvent utiliser le méthanol pour croître (DSMZ, 2014). Ce phénomène d'échange permettant la colonisation de niches écologiques inaccessibles en culture pure témoigne d'une coopération présente entre les diverses espèces de population bactérienne et est souvent rencontré dans un biofilm (Renner et al., 2011).

Après analyse de la littérature, toutes les conditions de culture et d'incubation comportaient leur lot et leur diversité en genres mineurs associés à la dénitrification au niveau

d'au moins une espèce ou d'une souche. Parmi eux, les plus abondants (> 0,08 % des séquences; Fig. 4.29B) comprenaient : *Rhodobacter (alphaproteobacteria), Roseobacter (alphaproteobacteria), Azoarcus (betaproteobacteria), Flavobacterium (Bacteroidetes)* et plusieurs autres (Neef *et al.*, 1996; Nishizawa *et al.*, 2012; Pichinoty *et al.*, 1976 et Schreier *et al.*, 2010). D'autres possédant les mêmes similitudes dénitrifiantes ont été conservés en diverses proportions dans toutes les conditions testées : *Winogradskyella (Bacteroidetes), Pseudomonas (gammaproteobacteria), Stappia (alphaproteobacteria), Halomonas (gammaproteobacteria) et Paracoccus (alphaproteobacteria) (Baumann <i>et al.*, 1996; González-Domenech *et al.*, 2010; Ivanova *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2007 et Williams *et al.*, 1978).

Pour les quatre conditions où le biofilm a été cultivé à 2,75 % NaCl dans 300 ou 900 mg-N L⁻¹ pour une incubation à 23 ou 30 °C, une dénitrification complète a été effectuée comme présenté à la section 5.4. Cependant, hormis le genre *Marinicella* dont le potentiel d'activité dénitrifiante reste à caractériser, aucune espèce à laquelle une activité dénitrifiante complète aurait pu être associée ne s'était implantée en grande proportion dans le biofilm pour compenser la perte d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, selon les analyses de pyroséquençage. Donc, à la lueur de ces résultats et de la littérature, la réduction de nitrite semblait prise en charge par cette diversité d'espèces caractérisées de mineures qui composaient le biofilm. *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 pouvait également en assumer une partie.

5.6 Identification des isolats

La plus grande diversité d'isolats a été obtenue dans le milieu MM dépourvu de méthanol. Concordant avec la littérature, le tableau 4.14 indique que les isolats qui ont été associés aux genres *Marinobacter, Paracoccus* et *Roseobacter* ont démontré une réduction du nitrate et du nitrite complète (Doi et Shioi, 1991; Nakano *et al.*, 2010 et Neef *et al.*, 1996). Cependant, l'isolat 12A qui a été associé au genre *Rhodovulum* et qui a présenté une activité dénitrifiante n'a jusqu'à présent pas été associé à la dénitrification dans la littérature. Deux isolats (9A et 10A) qui possédaient une séquence similaire du gène codant pour l'ARNr 16S ont été associés avec le même pourcentage d'identité aux genres *Roseobacter* ou *Maritimibacter* ou *Roseavarius*, impliquant que ces derniers sont près phylogénétiquement. Les trois genres appartiennent en effet au clade *Roseobacter* (Boettcher *et al.*, 2005 et Lee *et al.*, 2007). Un seul des isolats a comporté cependant une activité dénitrifiante et parmi les trois genres possibles, seul *Roseobacter* est associé à un pouvoir dénitrifiant selon la littérature. Les genres *Aequorivita* et *Winogradskyella* n'ont pas démontré d'activité dénitrifiante (Tableau 4.14). Aucune activité dénitrifiante n'a été associée au genre *Aequorivita* et la dénitrification est rare dans le clade auquel il appartient (Bowman, 2006). Certaines espèces appartenant au genre *Winogradskyella* sont en mesure de dénitrifier dans les conditions appropriées, comme *W. exilis*, alors que d'autres non, comme *W. thalassocola W. epiphytica, W. eximia* (Ivanova *et al.*, 2010 et Nedashkovskaya *et al.*, 2005). Tous ces genres ont également été détectés par pyroséquençage. D'autres genres qui n'ont pas été détectés par le pyroséquençage ont toutefois été isolés sur géloses. Il est probable que des différences ont été rencontrées dans l'adaptation d'une population d'une fois à l'autre, surtout concernant les espèces présentent en proportions mineures. À cet effet, les genres *Octadecabacter/Thalassobius, Thalassobius/ Thalassococcus* et *Exiquobacterium* n'ont démontré aucune activité dénitrifiante en fioles et ne sont également pas associés à une telle activité dans la littérature.

Le tableau 4.15 indique que le milieu 1403 a permis l'isolement de 13 isolats qui avaient tous été associés à la souche *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1. Douze isolats ont démontré une dynamique typique de dénitrification de la souche où le nitrate a été réduit et où le nitrite s'est accumulé, sans réduction, conséquemment à l'absence de nitrite réductase fonctionnelle dans le génome de cette souche. Cependant, l'isolat 59A qui a été associé à cette même souche a toutefois démontré des capacités de réduction de nitrate et de nitrite, phénomène rencontré pour la première fois dans notre laboratoire et dans la littérature.

Une première hypothèse pour expliquer la présence d'une souche JAM1 parfaitement dénitrifiante dans le biofilm implique l'économie d'énergie associée à la vie en communauté au sein du biofilm. En effet, dans le biofilm cultivé en mode continu au Biodôme de Montréal, les souches JAM1 et NL23 ont été retrouvées dans les mêmes proportions et pouvaient donc présenter une relation mutualiste (Fig. 2.3). De plus, la souche JAM1 possède tous les gènes des réductases impliquées dans la dénitrification sauf une nitrite réductase. Une séquence associée à *nirK* a été trouvée, mais sous forme tronquée et produisant une nitrite réductase non fonctionnelle (Villeneuve *et al.*, 2013). Supposant la présence d'un *nirK* complet et fonctionnel chez la souche JAM1, si les deux souches avaient effectué la même activité de réduction de

nitrate jusqu'en azote gazeux, la souche JAM1 aurait pu muter sa nitrite réductase en vue d'une économie d'énergie. Une deuxième hypothèse implique que la souche détourne la nitrite réductase impliquée dans la voie d'assimilation de nitrate au profit de l'élimination de nitrite de son environnement, qui lui est toxique. En effet, lors de l'assimilation de nitrate qui est essentielle au renouvellement d'acides nucléiques et aminés, le nitrate est réduit en nitrite qui est converti en ammonium (Zumft, 1997). La mesure de ce cation par colorimétrie dans le milieu de culture après réduction de nitrite pourrait permettre d'en apprendre plus sur la présence ou non de cette activité qui n'est à ce jour pas répertoriée dans la littérature. Cette hypothèse est cependant plus ou moins probable, car du gaz a été détecté dans les fioles dénitrifiantes qui étaient associées à cet isolat (données non présentées). Finalement, comme troisième hypothèse, la souche JAM1 pourrait avoir acquis, au sein du biofilm facilitant ce phénomène, un plasmide par la conjugaison ou une portion de gène chromosomique par recombinaison homologue, en provenance d'une autre espèce qui comportait une nitrite réductase fonctionnelle. Cette hypothèse est la plus probable, car l'échange de matériel génétique est effectivement fréquent au sein des microcolonies constituant le biofilm qui offrent un environnement confiné (Donlan et al., 2002). Comme la souche JAM1 était dominante dans la population, les probabilités veulent que si quelques espèces avaient à acquérir du matériel génétique de cette manière, elle en fasse partie. Cet événement a pu survenir autant au Biodôme de Montréal que lors de l'adaptation pendant les cinq repiquages de culture en mode cuvée. Bien que la plupart du temps, les opérons de gènes codant pour les réductases impliquées dans la dénitrification sont groupés dans une même région chromosomique, certaines bactéries en possèdent quelques-uns sur des plasmides ou des mégaplasmides. C'est le cas de R. eutropha, P. denitrificans, R. meliloti et R. sphaeroides (Schwintner et al., 2006).

Le milieu R2A n'a supporté la croissance que d'une seule espèce bactérienne qui a été associée au genre *Pseudomonas* (Tableau 4.15, isolat 41A). C'est un milieu non salé et il n'a donc pas été surprenant d'y avoir retrouvé une faible diversité d'espèces, car l'inoculum provenait d'une population de bactéries majoritairement bien adaptées au sel. Cet isolat n'a démontré qu'une faible activité de réduction de nitrate. Plusieurs espèces associées au genre *Pseudomonas* sont en mesure de dénitrifier. Cependant, elles ne le font pas toutes à la même cadence. Ainsi, *P. stutzeri* réduit rapidement le nitrate en azote gazeux sans accumulation d'intermédiaire alors que *P. aeruginosa* possède une activité dénitrifiante beaucoup plus lente

avec l'accumulation d'intermédiaires (Carlson et Ingraham, 1983). De façon surprenante, le milieu de culture EMS utilisé pour l'adaptation du biofilm au mode cuvée n'a pas permis la croissance d'une grande diversité d'espèce (Tableau 4.15). Seule la souche JAM1 y a été retrouvée. L'inoculum comportant plusieurs espèces différentes venait pourtant d'y être cultivé en milieu liquide pendant cinq repiquages. L'isolement passant par la forme gélosée de ce milieu pourrait en être la cause. En effet, la culture en milieu gélosé n'apparait pas favorable aux relations d'échanges, d'associations et de diffusions (de métabolites par exemple) entre les microorganismes. Le milieu minimal EMS semble donc supporter la croissance de plusieurs espèces lorsque ces dernières peuvent facilement pleinement interagir entre elles, comme c'était le cas en milieu liquide, et semble défavorable à leur croissance hors du biofilm, comme c'était le cas en milieu solide.

6 CONCLUSION

En mode cuvée, dans la culture de référence, des profils de diversité bactérienne obtenus de PCR-DGGE ont représenté un biofilm comportant près d'une dizaine d'espèces dominantes qui ont été obtenues après cinq repiquages en milieu frais, auquel une réduction de nitrate et de nitrite complète a été associée. Au cours de cette adaptation, le respirateur de nitrate Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 a augmenté en terme d'abondance pour atteindre environ 10⁵ copies de narG1/ng ADN alors que le dénitrificateur complet Hyphomicrobium *nitrativorans* NL23 a diminué fortement pour atteindre environ 10^1 copies de *napA*/ng ADN. Pour l'adaptation à tous les paramètres physicochimiques testés dans cette étude (température, concentration en nitrate (C/N =1,5), % NaCl et type de milieu de culture), peu de variation au niveau des profils de diversité bactérienne a été observée. Il n'y a que dans le milieu IO et dans le milieu EMS à 0,0 et 0,5 % NaCl que les souches JAM1 et NL23 ont été retrouvées au même niveau dominant d'environ 10⁴ copies de gène/ng ADN. Cependant, dans le milieu IO, la réduction de nitrate a été ralentie et a permis ainsi une meilleure synchronisation des deux réactions de réduction. Ce phénomène n'a pas été retrouvé dans le milieu EMS à 0,0 et 0,5 % NaCl, témoignant ainsi de la grande influence du choix de milieu de culture sur l'activité conférée par la population bactérienne. Les conditions de culture (milieu) et d'incubation ont également influencé le développement du biofilm, où toutes les conditions testées ont mené à une maintenance ou à une diminution de la concentration en protéines de ce dernier, en comparaison avec la culture de référence.

Dans une certaine mesure, il est possible de comparer l'efficacité de l'activité dénitrifiante du biofilm opéré en mode continu et en mode cuvée dans le milieu IO pour des conditions relativement comparables (milieu IO supplémenté d'éléments traces, pH de 8,0, incubation à température pièce, etc.). Lors de tests réalisés en laboratoire par Labbée *et al.* (2003), le biofilm a été cultivé en mode continu dans un chémostat contenant 200 mL de milieu de culture. Le taux de dénitrification généré a été de 3,38 mg-N $L^{-1} h^{-1}$ pour une biomasse d'environ 0,6 mg/ml (ou 120 mg). En moyenne, après cinq repiquages d'adaptation au mode cuvée, le taux de dénitrification a

été de 10,6 mg-N L⁻¹ h⁻¹ pour une biomasse de 11,5 mg. Pour cette comparaison, le mode cuvée s'est donc avéré plus efficace.

Alors que le biofilm n'était pas en mesure de se développer et de performer à un taux de dénitrification considérable en conditions fortement salées (5,0 et 8,0 % NaCl), un biofilm qui s'est déjà développé à 2,75 % NaCl et qui pouvait complètement réduire le nitrate et le nitrite n'a pas vu son activité dénitrifiante spécifique ou sa population microbienne changer suite à une exposition à 5,0 % NaCl pendant une longue période de temps. Également, l'activité de dénitrification spécifique a été optimisée par une culture à 30 °C et dans de faibles concentrations en NaCl de l'ordre de 0,0 et 0,5 % NaCl. Le procédé dénitrifiant opéré en mode cuvée montre ainsi un potentiel intéressant d'application au traitement biologique d'eau saumâtre, d'eau de mer et d'eau de mer fortement salée étant contaminées en nitrate.

En mode cuvée, la dynamique de dénitrification parait initiée principalement par *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 qui réduisait le nitrate en nitrite tout en fournissant certains métabolites qui supportaient la croissance de certaines espèces mineures. Pour sa part, la réduction de nitrite jusqu'en azote gazeux a semblé être supportée par les espèces mineures. Parmi elles étaient retrouvés, entre autres, les genres *Rhodovulum*, *Marinobacter*, *Paracoccus* et *Roseobacter*, également isolés du biofilm cultivé selon la culture de référence. Ces espèces mineures comprenaient également *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 qui pouvait prendre des proportions importantes selon les conditions de culture (milieu), et également une souspopulation de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 qui a été en mesure de réduire le nitrite. Par sa présence en proportion supérieure aux espèces mineures dans les sept conditions de culture et d'incubation analysées, le genre *Marinicella* a également pu être impliqué dans le processus de dénitrification, au niveau d'une ou de plusieurs étapes de réduction, ou au niveau du support de la diversité d'espèces mineures. Finalement, cette étude a certainement témoigné des interactions multiespèces bénéfiques et des avantages conférés pour un microorganisme à la vie au sein d'un biofilm.

RÉFÉRENCES

Amatya, I. A., Kansakar, B. R., Tare, V. et Fiksdal, L. (2009). Impact of Temperature on Biological Denitrification Process. *Journal of the Institute of Engineering*, 7, 121-126.

Aminzadeh, B., Torabian, A., Azimi, A. A., Nabi Bidhendi, Gh. R. et Mehrdadi, N. (2010). Salt Inhibition Effects on Simultaneous Heterotrophic/Autotrophic Denitrification of High Nitrate Wastewater. *Int. J. Environ. Res.*, **4**, 255-262.

Artan, N. et Orhon, D. (2005). *Mechanism and Design of Sequencing Batch Reactors for Nutrient Removal*. Londre : IWA Publishing, p. 13.

Auclair, J., Lépine, F., Parent, S. et Villemur, R. (2010). Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a Methylophaga strain containing two highly divergent narG sequences. *ISME J.* 4, 1302-1313.

Auclair, J., Parent, S. et Villemur, R. (2012). Functional Diversity in the Denitrifying Biofilm of the Methanol-Fed Marine Denitrification System at the Montreal Biodome. *Microb. Ecol.*, 63, 726–735.

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

Atlas, R.M. (2004). *Handbook of Microbiological Media, Third Edition, Volume 1*. Éditeur : Floride: CRC Press, p. 989.

Atlas, R.M. (2010). *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition*. Éditeur : Floride: CRC Press, p. 842.

Barber, R. D. et Donohue, T. J. (1998). Pathways for transcriptional activation of a glutathionedependent formaldehyde dehydrogenase gene. *J. Mol. Biol.*, **31**, 775-784.

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

Bellion, E. et Tan, F. (1984). NADP-dependent glutamate dehydrogenase from a facultative methylotroph, Pseudomonas sp. strain AM1. *J. Bacteriol*, 157, 435-439.

Berg, J., Tymoczko, J. L. et Stryer, L. (2007). *Biochemistry*. Freeman and Company, chapitre 7.

Bergmaier, D. (2011). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de Lb. rhamnosus RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum (Thèse de doctorat). Université Laval.

Bodtker, G. et Throstenson, T. (2008). The effect of long-term nitrate treatment on SRB activity, corrosion rate and bacterial community composition in offshore water injection systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 1625-1636.

Boettcher, K. J., Geaghan, K. K., Maloy, A. P. et Barber, B. J. (2005). *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 1531-1537.

Bowman, J. P. (2006). The Marine Clade of the Family Flavobacteriaceae: The Genera Aequorivita, Arenibacter, Cellulophaga, Croceibacter, Formosa, Gelidibacter, Gillisia, Maribacter, Mesonia, Muricauda, Polaribacter, Psychroflexus, Psychroserpens, Robiginitalea, Salegentibacter, Tenacibaculum, Ulvibacter, Vitellibacter and Zobellia. *Prokaryotes*, **7**, 677–694.

Braker, G. et Tiedje, J. M. (2003). Nitric Oxide Reductase (*norB*) Genes from Pure Cultures and Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3476-3483.

Breisha, G. Z. (2010). Bio-removal of nitrogen from wastewaters—A review. *Nature and Science*, 8, 210-228.

Bruce, K.D., Hiorns, W.D., Hobman, J.L., Osborn, A.M., Strike, P.et Ritchie, D.A. (1992). Amplification of DNA from Native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Env. Microbiol.* **58**, 3413-3416.

Bryers, J. D. (2009). Medical Biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, 100, 1–18.

Camargo, J.A., Alonso, A. et Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals : a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, **58**,1255-1267.

Capel, B. (1999). *La composition de l'eau de mer naturelle et artificielle.* Repéré à : http://mars.reefkeepers.net/Articles/EauDeMer.html.

Carlson, C. A. et Ingraham, J. L. (1982). Comparison of Denitrification by Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas aeruginosa, and Paracoccus denitrificans. App. And *Environ. Microbiol.*, 45, 1247-1253.

Casella, S. et Payne, W. J. (1996). Potential of denitrifiers for soil environment protection. *FEMS Microbiology Letters*, 140, 1-8.

Catalan-Sakairi MA, Yasusa K et Matsumara M (1996). Nitrogen removal in seawater using nitrifying and denitrifying bacteria immobilized in porous cellulose carrier. *Water Sci. Techno.l*, 34, 267–274.

Chakrabarti, T. et Jones, P. H. (1983). Effect of molybdenum and selenium addition on the denitrification of waste water. *Water Research*, 17, 931-936.

Costerton, J. W., Stewart, P.S., et Greenberg, E.P (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**, 1318-22.

Darwin, A. J., Ziegelhoffer, E. C., Kiley, P. J. et. Stewart, V. (1998). Fnr, NarP, and NarL Regulation of *Escherichia coli*K-12 *napF* (Periplasmic Nitrate Reductase) Operon Transcription In Vitro. *J. Bacteriol.*, **180**, 4192-4198.

Dincer, A. R. et Kargi, F. K. (1999). Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline waste water. *Environ. Technol.*, **20**, 1147-1153.

Doi, M. et Shioi, Y. (1991). Enhancement of Denitrifying Activity in Cells of *Roseobacter* denitrificans Grown Aerobically in the Light. *Plant Cell Physiol.*, **32**, 365-370.

Dolan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surface. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-998.

Doronina, N. V. et Trotsenko, Y. A. (2000). A novel plant-associated thermotolerant alkaliphilic methylotroph of the genus *Paracoccus. Microbiology*, **69**, 593-598.

DSMZ (2014). German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Repéré à http://www.dsmz.de/.

Dunne Jr, W. M. (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? Clin. Microbiol.

Dupla, M., Comeau, Y., Parent, S. Villemur, R. et Jolicoeur, M. (2006). Design optimization of a self-cleaning moving-bed bioreactor for seawater denitrification. *Water Res.*, 40, 249-258.

Foglar, L. et Briski, F. (2002). Wastewater denitrification process- the influence of methanol and kinetic analysis. *Process Biochemistry*, **00**, 1-9.

Geier, H (2008). Environmental and Genetic Factors Leading to Mycobacterium Avium Biofilm Formation (thèse de doctorat). Montana State University.

Glass, C. et Silverstein, J. (1997). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Wat. Res.*, **32**, 831-839.

Glass, C., Silverstein, J. et Oh, J. (1997). Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environment Research*, **69**, 1086-1093.

González-Domenech C.M., Martínez-Checa, F., Béjar V., Quesada E. (2010). Denitrification as an important taxonomic marker within the genus Halomonas. *Syst. Appl. Microbiol.*, **33**, 85-93.

Halling-Sorensen, B. et Jorgensen, S. E. (1993). *The Removal of Nitrogen Compounds from Wastewater*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B. V., p. 127-135.

Head, M. L. (2005). How Bacteria Stopped Worrying and Learned to Love ... Formaldehyde. *PLoS Biol.*, **3**, 1-3.

Illes, P. et Mavinic, D. S. (2001). The effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of a high ammonia landfill leachate. *Wat. Res.*, **35**, 2065-2072.

INRS- Institut National de Recherche et de Sécurité (2007). *Ammoniac et solutions aqueuses.* Repéré à : http://www.projetnesting.fr/IMG/pdf/Fiche Ammoniac-INRS-4.pdf.

Ivanova, E.P., Gorshkova, N.M., Sawabe, T., Zhukova, N.V., Hayashi, K., Kurilenko, V.V., Alexeeva, Y., Buljan, V., Nicolau, D.V., Mikhailov, V.V. et Christen, R (2004). Sulfitobacter delicatus sp. nov. and Sulfitobacter dubius sp. nov., respectively from a starfish (Stellaster equestris) and sea grass (Zostera marina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 475-80.

Ivanova, E.P., Christen, R., Gorshkova N.M., Zhukova N.V., Kurilenko, V.V., Crawford R.J. et Mikhailov V.V. (2010). Winogradskyella exilis sp. nov., isolated from the starfish Stellaster equestris, and emended description of the genus Winogradskyella. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**, 1577–1580.

Jahn, A. et Nielsen, P. H. (1998). Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Science and Technology*, **37**,17–24.

Janvier, M., Frehel, C., Grimont, F., et Gasser, F. (1985). Methylophaga marina gen. nov. sp. nov. and Methylophaga thalassica sp. nov. Marine Methylotrophs. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **35**, 131-139.

Jiao, Y., Cody, G. D. Harding, A. K., Wilmes, P., Schrenk, M., Wheeler, K. E., Banfield, J. F. et Thelen1, M. P. (2010). Characterization of Extracellular Polymeric Substances from Acidophilic Microbial Biofilms. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **76**, 2916-2922.

Khan, I. Et Spalding, R.F. (2004). Enhanced in situ denitrification for a municipal well. *Water Res.*, **38**, 14-15.

Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., et Schmidt, T M. (2001) rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.*, 29, 181-184.

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

Koenig A., Zhang, T., Liu, L.-H. et Fang, H. H. P. (2004). Microbial community and biochemistry process in autosulfurotrophic denitrifying biofilm. *Chemosphere*, **58**, 1041–1047.

Kornaros, M., Zafiri, C. et Lyberatos, G. (1996). Kinetics of Denitrification by Pseudomonas denitrificans under Growth Conditions Limited by Carbon and/or Nitrate or Nitrite. *Water Environment Research*, 68, 934-945.

Kraft, B., Strous, M. et Tegetmeyer, H. E. (2011). Microbial nitrate respiration – Genes, enzymes and environmental distribution. *Journal of Biotechnology*, 155, 104-117. Labbé, N. Juteau, P., Parent, S. et Villemur, R. (2003). Bacterial Diversity in a Marine Methanol-Fed Denitrification Reactor at the Montreal Biodome, Canada. *Microb. Ecol.*, 46, 12-21.

Labbé, N., Parent, S. et Villemur, R. (2003). Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. *Water Research*, **37**, 914–920.

Labbé, N., Parent, S. et Villemur, R. (2004). Nitratireductor aquibiodomus gen. nov., sp. nov., a novel a-proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 269–273.

Labbé, N., Laurin, V., Juteau, P., Parent, S. et Villemur, R. (2007). Microbiological community structure of the biofilm of a methanol-fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms. *Microb. Ecol.* **53**, 621-630.

Labelle, M.-A., Juteau, P., Jolicoeur, M., Villemur, R., Parent, S. et Comeau, Y. (2005). Seawater denitrification in a closed mesocosm by a submerged moving bed biofilm reactor. *Water Res.*, **39**. 3409-3417.

Li, L., Yang, B. etBai, M. (2009). Impact of high salinity on specific oxygen uptake, nitrification and denitrification rates of activated sludge. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, ICBBE 2009 3rd International Conference*, 1-4.

Laurin, V. (2005). Caractérisation microbiologique et optimisation de la dénitrification en milieu marin au Biodôme de Montréal (Mémoire de maîtrise). Institut Armand-Frappier.

Laurin, V., Labbé, N., Juteau, P., Parent, S. et Villemur, R. (2006). Long-term storage conditions for carriers with denitrifying biomass of the fluidized, methanol-fed denitrification reactor of the Montreal Biodome, and the impact on denitrifying activity and bacterial population. *Water Research*, **40**, 1836-1840.

Lear, G. et Lewis, G. D. (2012). *Microbial Biofilms: Current Research and Applications*. Angleterre: Caister Academic Press, chapitres 5 et 6.

Lee, K., Choo, Y. J., Giovannoni, S. J. Et Cho, J. C. (2007). Maritimibacter alkaliphilus gen. nov., sp. nov., a genome-sequenced marine bacterium of the Roseobacter clade in the order Rhodobacterales. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*,**57**, 1653-1658.

Lens, P., O'Flaherty, V., Moran, A.P., Stoodley, P., et Mahony, T. (2003). *Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology*. Londre : IWA Publishing, p. xi, 81-82.

Macian, M. C., Arahal, D. R., Garay, E., Ludwig, W., Schleifer, K. H., et Pujalte, M. J. (2005). Thalassobacter stenotrophicus gen. nov., sp. nov., a novel marine [alpha] proteobacterium isolated from Mediterranean sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 105-110.

Mansell, O. M. et Schroeder, E. D. (1999). Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor. *Wat. Res.*, **8**, 1845-1850.

Mariángel, L., Aspé, E., Martí, M. C. et Roeckel, M. (2008). The effect of sodium chloride on the denitrification of saline fishery wastewaters. *Environ. Technol.*, 29, 871-879.

Martin, F. (2011). Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures : analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation (thèse de doctorat). Université de Grenoble.

Martineau, C., Villeneuve, C., Mauffrey, F. et Villemur, R. (2014). Complete Genome Sequence of Hyphomicrobium nitrativorans Strain NL23, a Denitrifying Bacterium Isolated from Biofilm of a Methanol-Fed Denitrification System Treating Seawater at the Montreal Biodome. *Genome Announc.*, **2**.

Martineau, C., Villeneuve, C., Mauffrey, F. et Villemur, R. (2013). Hyphomicrobium nitrativorans sp. nov., isolated from the biofilm of a methanol-fed denitrification system treating seawater at the Montreal. *Biodome. Int. J Syst. Evol. Microbiol.*, **63**, 3777-3781.

Martinez-Espinosa, R. M., Cole J. A., Richardson, D. J. et Watmough, N. J. (2011). Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochem. Soc. Trans.*, **39**, 175–178.

Martín-Rodríguez, A. J., González-Orive, A., Hernández-Creus, A., Morales, A., Dorta-Guerra, R., Norte, M., Martín, V. S. et Fernández, J. J. (2014). On the influence of the culture conditions in bacterial antifouling bioassays and biofilm properties: *Shewanella algae*, a case study. *Appl. Microbiol.*, 14, 102.

McAnulla, C., McDonald, I. R. et Murrel, J. C. (2006). Methyl chloride utilising bacteria are ubiquitous in the natural environment. *FEMS Microbiology Letters*, 201, 151-155.

McLean, R. J., Barnes, M. B., Windham, M. K., Merchant, M., Forstner, M. R., Fuqua, C. (2005). Cell-cell influences on bacterial community development in aquatic biofilms. *Appl Environ Microbiol.*, **71**, 8987-8990.

Milero, F.J. et Sohn, M.L. (1992). Chemical Oceanography. Floride: CRC Press, p. 531.

Mohseni-Bandpi, A., Elliott, D.J. et Zazouli, M. A. (2013). Biological nitrate removal processes from drinking water supply-a review. *Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*, 11, 35-46.

Molin, S. et Tolker-Nielsen (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14, 255-61.

Morimatsu, K., Uchino, T., Tanaka, F. et Hamanaka, D. (2012). *Effect oftemperature onbiofilm formation cellofPseudomonas putida*. Repéré à http://cigr.ageng2012.org/images/fotosg/tabla_137_C1147.pdf.

Muyzer, G., de Waal, E.C. et Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Env. Microbiol.*, **59**, 695-500.

Nakano, M., Inagaki, T., Okunishi, S., Tanaka, R. et Maeda, H (2010). Effect of salinity on denitrification under limited single carbon source by Marinobacter sp. isolated from marine sediment. J. Basic. Microbiol., **50**, 285-289.

Napier, J. M. et Bustamante, R. B. (1988). *In-Situ* Biodenitrification of the S-3 Ponds. *Environnemental Progress*, 7, 13-16.

Nedashkovskaya, O. I., Kim, S. B., Han, S. K., Snauwaert, C., Vancanneyt, M., Swings, S., Kim, K.-O. Lysenko, A. M., Rohde, M., Frolova, G. M., Mikhailov, V. V. et Bae, K. S. (2005). *Winogradskyella thalassocola* gen. nov., sp. nov., *Winogradskyella epiphytica* sp. nov. and *Winogradskyella eximia* sp. nov., marine bacteria of the family *Flavobacteriaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, 49-55.

Neef, A., Zaglauer A., Meier H., Amann R., Leemer H., et Schleifer K.-H. (1996). Population Analysis in a Denitrifying Sand Filter: Conventional and In Situ Identification of Paracoccus spp. in Methanol-Fed Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*,**62**, 4329–4339.

Nishizawa, T., Tago, K., Oshima, K., Hattori, M., Ishii, S., Otsuka, S., et Senoo, K (2012).Complete genome sequence of the denitrifying and N2O-reducing bacterium Azoarcus sp. strain KH32C. *J Bacteriol.*,194, 1255.

Nuhogl, Pekdemir, Yildiz, Keskinler et Akay (2002). Drinking water denitrification by a membrane bioreactor. *Wat. Res.*, **36**, 1155-1166.

Obaja,D., Mac, S. et Mata-Alvarez, J. (2005). Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater. *Bioresource Technology*, **96**, 7–14.

Oh, J. et Silverstein, J. (1999). Acetate limitation and nitrite accumulation during denitrification. *Journal of Environmental Engineering*, **125**, 234-243.

Pagni, M. (1998). Le cycle de l'azote. Repéré à http://mars.reefkeepers.net/ Articles/CycleAzote/CycleAzote.html.

Pan, Y., Ye, L., Ni, B.-J., Yuan, Z. (2012). Effect of pH on N₂O reduction and accumulation during denitrification by methanol utilizing denitrifiers. *Wat. Res.*, **46**, 4832-4840.

Parent, S. et Morin, A. (2000). N budget as water quality management tool in closed aquatic mesocosms. *Water Res.*, 34, 1846-1856.

Paustian, T. (2000). *Anaerobic Respiration*. Université de Wisconsin-Madison. Repéré à http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/Metabolism/RespAnaer.html.

Pettersson, M. (2004). *Factors Affecting Rates of Change in Soil Bacterial Communities* (these de doctorat). Université Lund (Suède).

Peyretaillade, E. (n.d.). *Qualité des séquences produites par 454 : exemple de traitement. Université d'Auvergne, CNRS.* Repéré à : http://www.cnrs.fr/inee/recherche /fichiers/EPEGE/Communications/Eric_PEYRETAILLADE.pdf

Pichinoty, F., Bigliardi-Rouvier, J., Mandel, M., Greenway, B., Méténier, G. et Garcia, J.L. (1976). The isolation and properties of a denitrifying bacterium of the genus Flavobacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 42, 349-54.

Plakunov, V. K., Zhurina, M. V. et Beliaev, S. S. (2008). Resistance of the petroleumoxidizing microorganism Dietzia sp. to hyperosmotic shock in reconstituted biofilms. *Mikrobiologiia*, 77, 581-589.

Pluschkell, S. B. Et Flickinger, M. C. (2002). Dissimilation of [13C]methanol by continuous cultures of Bacillus methanolicus MGA3 at 50 SC studied by 13C NMR and isotope-ratio mass spectrometry. *Microbiology*, **148**, 3223-3233.

Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (2003). *Microbiologie*. Royaume-Uni : De Boeck, chapitres 7 et 9.

Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C., Lejeune P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in Escherichia coli. *J Bacteriol.*, **181**,5993-6002.

Qurashi, A. W. et Sabri A. N. (2012). Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz. J. Microbiol.*, 43, 1183-1191.

Qurashi, A. W. et Sabri A. N. (2011). Osmoadaptation and plant growth promotion by salt tolerant bacteria under salt stress. *African Journal of Microbiology Research*, **5**, 3546-3554.

Rakesh, C.V., Ashish, S. et Ravindra, K.A. (2009). Prevention of Lake Eutrophication by Nitrate (NO3) Removal using Sequencing Batch Reactor. *Engineering & Technolog*, **51**,155.

Ranneklev, S. B. et Baath, E. (2000). Temperature-Driven Adaptation of the Bacterial Community in Peat Measured by Using Thymidine and Leucine Incorporation. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 67, 1116-1122.

Renner, L. D. et Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.*, **36**, 347-355.

Ricklefs, R. E. et Miller, G. L. (2005). Écologie, 4^{ème} édition. Belgique : De Boeck, p. 214 à 217.

Rousse, D.J., Bishop, C.A. et Struger, J. (1999). Nitrogen Pollution: An Assessment of Its Threat to Amphibian Survival. *Environmental Health Perspectives*, 107, 799-803.

Saleh-Lakha, S., Shannon, K. E., Henderson, S. L., Goyer, C, Trevors, J. T., Zebarth, B. J. et Burton, D. L. (2009). Effect of pH and Temperature on Denitrification Gene Expression and Activity in Pseudomonas mandelii. *App. And Environ. Microbiol.*, **75**, 3903-3911.

Schreier H. J., Mirzoyan, N., et Saito, K. (2010). Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 318–325.

Shahabi, Z. et Naeimpoor, F. (2014). Enhanced Heterotrophic Denitrification: Effect of Dairy Industry Sludge Acclimatization and Operating Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 741-752.

Siegert, W. (1999). *Biofilms – the unknown source of contamination*. Repéré à http://microsites.schuelke.com/wet-wipe-preservation/documents/Biofilm-GB-FarbeLack.pdf.

Srinivas, T.N., Kumar, P.A., Sasikala, C., Ramana, C.V., Süling, J. et Imhoff, J.F. (2006). Rhodovulum marinum sp. nov., a novel phototrophic purple non-sulfur alphaproteobacterium from marine tides of Visakhapatnam, India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 1651-1656.

Thamdrup, B. (2012). New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 43, 407-428.

Thörn, M. et Sörensson, F. (1996). Variation of nitrous oxide formation in the denitrification bassin in a wastewater treatment plant with nitrogen removal. *Wat. Res.*, **30**, 1543-1547.

Van Loosdrecht M. C. M. et Jetten, M. S. M. (1998). Microbiological conversions in nitrogen removal. *Wat. Sci. Technol.*, **38**, 1-17.

Villeneuve, C., Martineau, C., Mauffrey, F. et Villemur, R. (2012). Complete Genome Sequences of *Methylophaga* sp. Strain JAM1 and *Methylophaga* sp. Strain JAM7. *J. Bacteriol.*, 194, 4126-4127.

Villeneuve, C., Martineau, C., Mauffrey, F. et Villemur, R. (2013). Methylophaga nitratireducenticrescens sp. nov. and Methylophaga frappieri sp. nov., isolated from the biofilm of the methanol-fed denitrification system treating the seawater at the Montreal Biodome. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 63, 2216-2222.

Volokita, M., Abehovich, A. et Soares, M. I. M. (1996). Denitrification of groundwater using cotton as energy source. *Water Science and Technology*, **34**, 379-385.

Wang, X., Modak, H. V. et Tabita, F. R. (1993). Photolithoautotrophic growth and control of CO2 fixation in Rhodobacter sphaeroides and Rhodospirillum rubrum in the absence of ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase. *J. Bacteriol.*, **175**, 7109–7114.

Weber, C.F. et King, G.M. (2007). Physiological, Ecological, and Phylogenetic Characterization of *Stappia*, a Marine CO-Oxidizing Bacterial Genus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1266–1276.

Wilderer, P. A., Jones, W. L. et Dau, U. (2003). Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Research*, 21, 239-245.

Williams, D.R., Rowe, J.J., Romero, P. et Eagon R.J. (1978). Denitrifying Pseudomonas aeruginosa: Some Parameters of Growth and Active Transport. *Applied and environmental microbiology*, **36**, 257-263.

Wilson, S. M., Gleisten, M. P. Et Donohue, T. J. (2008). Identification of proteins involved in formaldehyde metabolism by Rhodobacter sphaeroides. *Microbiology*, 154, 296-305.

Xuezheng, M., Xiangsheng, C. et Jierui, L. (2011). Effects of Molybdenum (VI) on the Denitrification Performance of Activated Sludge Process. *Advanced Materials Research*, 183-185, 1400-1403.

Yarbrough, J. M., Rake, J. B., Eagon, R. G. (1980). Bacterial Inhibitory Effects of Nitrite: Inhibition of Active Transport, But Not of Group Translocation, and of Intracellular Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, **39**, 831-834.

Zhao, Y., Zhang, B., Feng, C., Huang, F., Zhang, P., Zhang, Z., Yang, Y., Sugiura, N. (2011). Behavior of autotrophic denitrification and heterotrophic denitrification in an intensified biofilm-electrode reactor for nitrate-contaminated drinking water treatment. *Bioresource Technology*, 107, 159–165.

Zumft, W. G. (1997). Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 533-616.

ANNEXES

Annexe A



Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne des supports de deuxième génération (DG), réalisés en triplicata. Conditions standards de culture et d'incubation (excepté l'ensemencement initial). L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support. A : $10^{\text{ème}}$ repiquage, B : $20^{\text{ème}}$ repiquage, C : $25^{\text{ème}}$ repiquage.

Annexe B



Quantification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 et d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 par qPCR sur les supports de première génération (5) et de deuxième génération (10 à 25). Données issues de triplicatas. Conditions standards de culture et d'incubation (excepté l'ensemencement initial pour les supports de deuxième génération). L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support. 5 à 25 : 5^{ème} au 25^{ème} repiquage atteint.

Annexe C

Procédure GLM (ANOVA) dans SAS et test de Duncan effectué sur les valeurs des réplicats associées au taux de dénitrification, à la concentration en protéines (Bradford) et au taux de dénitrification spécifique pour une adaptation à 2,75 % NaCl; 5,0 % NaCl R8; 5,0 % NaCl et 8,0 % NaCl. Pour chaque analyse statistique, p = 0,05.

Source	DF	Sum Squar	of es	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	2391.2445	17	478.248903	1860.23	<.0001
Error	6	1.5425	50	0.257092		
Corrected Total	11	2392.7870	67			
Source	DF	Туре І	SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NaClfort Replicat	3 2	2390.1994 1.0451	00 17	796.733133 0.522558	3099.02 2.03	<.0001 0.2118
Duncan G	rouping	Mean	N	Naclfort		
	А	34.5100	3	5.0 % NaCl R8		
	В	19.8600	3	2.75 % NaCl		
	C	0.9967	3	8.0 % NaCl		
	C	0.8600	3	5.0 % NaCl		

Taux de dénitrification (variable dépendante)

Concentration en protéines (variable dépendante)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	7926.935025	1585.387005	554.20	<.0001
Error	6	17.164067	2.860678		
Corrected Total	11	7944.099092			
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NaClfort Replicat	3 2	7913.464958 13.470067	2637.821653 6.735033	922.10 2.35	<.0001 0.1759

Duncan Grouping	Mean	Ν	NaClfort
А	62.663	3	5.0 % NaCl R8
В	31.010	3	2.75 % NaCl
C	0.840	3	8.0 % NaCl
C	0.383	3	5.0 % NaCl

Taux de dénitrification spécifique (variable dépendante)

Source	DF	Sum Squa	of res	Mean Square	F Value	Pr ≻ F
Model	5	5.99260	833	1.19852167	22.27	0.0008
Error	6	0.32288	333	0.05381389		
Corrected Total	11	6.31549	167			
Source	DF	Туре І	SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Naclfort Replicat	3 2	5.91829 0.07431	167 667	1.97276389 0.03715833	36.66 0.69	0.0003 0.5372
Duncan Grou	ping	Mean	Ν	Naclfort		
	А	2.3167	3	5.0 % NaCl		
	В	1.1900	3	8.0 % NaCl		
	C C	0.6433	3	2.75 % NaCl		
	C	0.5533	3	5.0 % NaCl R8		

Annexe D

Procédure GLM (ANOVA) dans SAS et test de Duncan effectué sur les valeurs des réplicats associées au taux de dénitrification, à la concentration en protéines (Bradford) et au taux de dénitrification spécifique pour une adaptation à 0,0; 0,5; 1,0 et 2,75 % NaCl. Pour chaque analyse statistique, p = 0,05.

Taux de dénitrification	(variable dépendante)
	• • •

Source	DF	Sc	Sum of quares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	293.43	865167	58.6873033	319.78	<.0001
Error	6	1.10	911500	0.1835250		
Corrected Total	11	294.53	376667			
Source	DF	Туре	e I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NaClfaible Replicat	3 2	293.24 0.19	124000 941167	97.7474667 0.0970583	532.61 0.53	<.0001 0.6144
Duncan Group	ing	Mean	Ν	NaClfaible		
	А	21.9300	3	0.5 % NaCl		
	В	20.5967	3	2.75 % NaCl		
	С	17.9100	3	0.0 % NaCl		
	D	9.2300	3	1.0 % NaCl		

Concentration en protéines (variable dépendante)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	333.8243417	66.7648683	13.67	0.0031
Error	6	29.2973500	4.8828917		
Corrected Total	11	363.1216917			
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
NaClfaible Replicat	3 2	314.8576250 18.9667167	104.9525417 9.4833583	21.49 1.94	0.0013 0.2237

Duncan Grouping	Mean	Ν	NaClfaible
А	28.060	3	2.75 % NaCl
B	22.180	3	0.5 % NaCl
C B	18.457	3	1.0 % NaCl
C	14.100	3	0.0 % NaCl

Taux de dénitrification spécifique (variable dépendante)

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.04451667	0.20890333	33.29	0.0003
Error	6	0.03765000	0.00627500		
Corrected Total	11	1.08216667			
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr ≻ F
NaClfaible	3	1.00970000	0.33656667	53.64	0.0001
Replicat	2	0.03481667	0.01740833	2.77	0.1402
Duncan Grouping		Mean N	Naclfaible		

	rican	IN	Nacitaidie
А	1.27667	3	0.0 % NaCl
В	0.99667	3	0.5 % NaCl
С	0.74333	3	2.75 % NaCl
D	0.49667	3	1.0 % NaCl

Annexe E



Profils migratoires PCR-DGGE de diversité bactérienne lors de l'adaptation du biofilm dans le milieu d'EMS supplémenté de 300 mg-N L⁻¹ et incubé à 23 °C (A) ou supplémenté de 900 mg-N L⁻¹ et incubé à 23 °C (B). Profils réalisés préalablement en triplicatas avec des résultats similaires. Un gel synthèse n'a pas été réalisé pour une exposition à 900 mg-N L⁻¹ à 30 °C, cependant des suivis par PCR-DGGE ont été effectués lors de chacun des repiquages et ont démontrés des résultats similaires. L'ADN a été extrait à partir de biomasse directement grattée sur un support (BC et 5b) ou à partir de biomasse en suspension (1 à 5a). BC : biomasse congelée en provenance du Biodôme de Montréal, 1 à 5b : repiquages 1 à 5.

Annexe F

Procédure GLM (ANOVA) dans SAS et test de Duncan effectué sur les valeurs des réplicats associées au taux de dénitrification, à la concentration en protéines (Bradford) et au taux de dénitrification spécifique pour une adaptation à 300 ou 900 mg-N L⁻¹ (Azote) et 23 ou 30 $^{\circ}$ C (Temp). Pour chaque analyse statistique, p = 0,05.

T	1. 1/	(
танх с	ie denimineation	i varianie dependante i
I uun u	ie deminimention	(fulluolo dependunce)

Source	DF	Sum c Square	of es	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	242.922091	.7	48.5844183	133.49	<.0001
Error	6	2.183800	00	0.3639667		
Corrected Total	11	245.105891	.7			
Source	DF	Type I S	S	Mean Square	F Value	Pr > F
Azote Temp Azote*Temp Replicat	1 1 1 2	121.794408 118.001408 0.273008 2.853266	33 33 33 57	121.7944083 118.0014083 0.2730083 1.4266333	334.63 324.21 0.75 3.92	<.0001 <.0001 0.4197 0.0815
Duncan Gr	ouping	Mean	Ν	Azote		
	А	30.2550	6	900 mg-N L ⁻¹		
	В	23.8833	6	300 mg-N L^{-1}		
Duncan G	irouping	Mean	Ν	Temp		
	А	30.2050	6	30 °C		
	В	23.9333	6	23 °C		

Concentration en protéines (variable dépendante)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr ≻ F
Model	5	185.1146417	37.0229283	3.81	0.0669
Error	6	58.2346500	9.7057750		
Corrected Total	11	243.3492917			

Source	I	DF	Туре	I SS		Mean Square	F Value	Pr > F
Azote		1	32.835	2083		32.8352083	3.38	0.1155
Temp		1	142.761	.0083		142.7610083	14.71	0.0086
Azote*Temp		1	1.235	2083		1.2352083	0.13	0.7335
Replicat		2	8.283	2167		4.1416083	0.43	0.6710
	Duncan Grouping		Mean		Ν	Azote		
	А		27.598		6	900 mg-N L ⁻¹		
	A							
	А		24.290		6	300 mg-N L ⁻¹		
	Duncan Grouping		Mean	I	Ν	Temp		
	А		29.393	1	6	23 °C		
	В		22.495	;	6	30 °C		

Taux de dénitrification spécifique (variable dépendante)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.88529167	0.17705833	10.62	0.0061
Error	6	0.10000000	0.01666667		
Corrected Total	11	0.98529167			
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Azote	1	0.02900833	0.02900833	1.74	0.2352
Temp	1	0.84800833	0.84800833	50.88	0.0004
Azote*Temp	1	0.00800833	0.00800833	0.48	0.5141
Replicat	2	0.00026667	0.00013333	0.01	0.9920

Duncan Grouping	Mean	Ν	Azote
A	1.13333	6	900 mg-N L ⁻¹
A	1.03500	6	300 mg-N L^{-1}
Duncan Grouping	Mean	Ν	Temp
А	1.35000	6	30 °C
В	0.81833	6	23 °C

Annexe G.

Affiliations les plus probables aux genres bactériens. Les séquences et leur proportion (%) des gènes de l'ARNr 16S ont été obtenues du pyroséquençage et affiliées au genre bactérien le plus proche.

Carrie	Condition de culture							
Genre	300	300-30	900	900-30	0,0	0,5	1,0	
Methylophaga	97,7	95,0	97,1	91,9	85,4	87,8	97,9	
Hyphomicrobium					11,8	7,4	0,3	
Marinicella	1,5	3,4	1,6	5,0	0,2	1,5	0,9	
Winogradskyella	0,14	0,15	0,13	0,12	0,03	0,32	0,12	
Pseudomonas	0,11	0,13	0,04	0,54	0,67	0,80	0,05	
Aequorivita	0,10	0,09	0,14	0,59	0,03	0,01	0,02	
Roseobacter	0,07	0,02	0,08	0,02		0,03	0,02	
Marinobacter	0,06	0,02	0,05			0,01	0,01	
Acholeplasma	0,05	0,05	0,04		0,04	0,52	0,02	
Stappia	0,05	0,23	0,41	0,40	0,19	0,26	0,12	
Halomonas	0,04	0,07	0,08	0,01	0,07	0,11	0,05	
Paracoccus	0,04	0,02	0,09	0,02	0,04	0,07	0,05	
Devosia	0,03		0,01	0,03		0,05	0,01	
Rhodobacter	0,03		0,01	0,01	0,03			
Rhodovulum	0,02	0,01		0,02		0,12	0,10	
Roseovarius	0,02	0,13	0,11	0,11				
Sulfitobacter	0,02		0,03	0,01		0,01		
Bartonella	0,01		0,01			0,02		
Geobacter		0,23	0,01	0,11	0,08	0,02		
Azoarcus		0,08		0,01	0,07			
Coxiella		0,08		0,17		0,02	0,02	
Capnocytophaga		0,06		0,04			0,01	
Thalassobacter		0,05		0,01		0,01		
Oceanospirillum		0,04		0,01				
Desulfuromusa		0,02						
Flavobacterium		0,01		0,01		0,19	0,21	
Oceanibaculum		0,01	0,03	0,01	0,22	0,20	0,04	
Phaeobacter		0,01		0,01				
Stigmatella		0,01		0,01	0,01		0,01	
Kordia		0,01						
Aminobacter			0,02		0,03	0,06	0,01	
Roseibacterium			0,02		0,04			
Idiomarina			0,01					
Hoeflea			0,01		0,01	0,14	0,04	
Mesorhizobium			0,01		0,05	0,06	0,01	

	Condition de culture						
Genre	300	300-30	900	900-30	0,0	0,5	1,0
Entotheonella			0,01	0,01	0,01		
Jannaschia			0,01				
Pantoea				0,49			
Formosa				0,10	0,67	0,01	0,01
Stenotrophomonas				0,06			
Labrenzia				0,04			
Sphingobacterium				0,02			
Chitinophaga				0,01			
Pseudoxanthomonas				0,01			
Rahnella				0,01	0,01		
Kangiella				0,01			
Anaerolinea				0,01			
Azorhizobium					0,06	0,02	
Afipia					0,02	0,01	
Dinoroseobacter					0,02	0,01	0,02
Alkalitalea					0,02		
Cytophaga					0,02		
Clostridiisalibacter					0,01		
Pectobacterium					0,01		
Serratia					0,01		
Ochrobactrum					0,01	0,02	
Ruminofilibacter					0,01		
Moraxella					0,01		
Dietzia					0,01		
Shinella					0,01		
Methylosinus					0,01	0,02	
Bosea					0,01		
Pedomicrobium					0,01		
Methylocystis					0,01		
Bdellovibrio					0,01		
Desulfuromonas						0,04	
Chlorobium						0,04	
Mycoplana						0,03	
Enterobacter						0,01	
Pelobacter							0,01
Roseicyclus							0,01
Roseinatronobacter							0,01

Légende : **300** : 300 mg-N L⁻¹ à 23 °C et à 2,75 % NaCl, **300-30** : 300 mg-N L⁻¹ à 30 °C et à 2,75 % NaCl, **900** : 900 mg-N L⁻¹ à 23 °C et à 2,75 % NaCl, **900-30** : 900 mg-N L⁻¹ à 30 °C et à 2,75 % NaCl, **900** -**30** : 900 mg-N L⁻¹ à 30 °C et à 2,75 % NaCl, **0,0** : 300 mg-N L⁻¹ à 23 °C et à 0,0 % NaCl, **0,5** : 300 mg-N L⁻¹ à 23 °C et à 0, 5 % NaCl et **1,0** : 300 mg-N L⁻¹ à 23 °C et à 1,0 % NaCl.

Annexe H



Profil migratoire PCR-DGGE de diversité bactérienne obtenu pour la culture du biofilm en mode continu dans le bioréacteur du Biodôme de Montréal. Les supports ont été retirés du bioréacteur lorsqu'il était opérationnel et l'extraction d'ADN a été effectuée. Un DGGE dont le gradient passe de 20 à 80 % a ensuite été réalisé. Figure adaptée de Laurin *et al.*, 2006.

Annexe I

Comparaison de la composition entre l'eau de mer naturelle et le milieu Instant Ocean. Selon Aquarium systems et mesuré par plasma, chromatographie et spectrométrie. Tirée de Capel (1999).

Nom	Formule	Eau de mer naturelle	Instant Ocean par Aquarium Systems	Instant Ocean Mesuré				
ELEMENTS MAJEURS								
Chlore	Cl	19 497	19 251	18 894				
Sodium	Na	11 049	10 757	10 861				
Sulfate	SO4	2 750	2 659	2 259				
Magnésium	Mg	1 318	1 317	1 293				
Calcium	Ca	422	398	369				
Potassium	K	408	402	376				
Brome	Br	67	2.3	0.0				
Strontium	Sr	8.1	8.6	17				
Borates	BO3	25.3	32.4	26.5				
Fluor	F	1.3	<0.05	0.0				
	ELEMENTS TRACES							
Lithium	Li	0.14	0.18	0.38				
Silicium	Si	0.14	non mesuré	0.46				
Rubidium	Rb	0.12	Traces	non mesuré				
Iode	I (I , IO3)	0.06	0.22	non mesuré				
Barium	Ba	0.01	<0.05	0.01				
Molybdène	Мо	0.01	<0.01	0.18				
Vanadium	V	0.002	<0.04	0.15				
Aluminium	Al	< 0.001	<0.04	6.6				
Zinc	Zn	< 0.001	<0.02	0.03				
Cuivre	Cu (74% CuCO3)	< 0.001	< 0.03	0.12				
Fer	Fe	< 0.001	< 0.03	0.01				
Nickel	Ni	< 0.001	<0.04	0.10				

Chrome	Cr	< 0.001	<0.0006	0.40			
Manganèse	Mn	< 0.001	<0.01	0.07			
Cobalt	Со	< 0.001	<0.05	0.08			
Argent	Ag	< 0.001	non mesuré	0.25			
Plomb	Pb	< 0.001	<0.005	0.45			
Cadmium	Cd	< 0.001	<0.02	0.03			
Arsenic	As	non mesuré	<0.0002	non mesuré			
Etain	Sn	non mesuré	Traces	non mesuré			
Antimoine	Sb	non mesuré	Traces	non mesuré			
Selenium	Se	non mesuré	Traces	non mesuré			
SYSTEME TAMPON et COMPOSES CARBONES à pH 8.2							
Carbone oganique	TOC :C	0.6	non mesuré	0.36			
Gaz carbonique	CO2 + H2CO3	0.5	non mesuré	0.5			
Carbonates	CO3	12.2	non mesuré	11.6			
Bicarbonate	НСО3	108	192	111			
	С	COMPOSES AZOTES					
Ammonium	NH4:N	0.003	non mesuré	0.15			
Nitrite	NO2:N	0.002	non mesuré	non mesuré			
Nitrate	NO3:N	0.003	0.0	0.01			
Azote organique	DON :N	0.14	non mesuré	0.04			
Azote gazeux	N2	11	non mesuré	non mesuré			
COMPOSES PHOSPHORES							
Phosphore organique	DOP :P	0.006	non mesuré	0.003			
Phosphates	PO4 :P	0.006	0.0	0.002			