

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

**Étude de la voie de dénitrification de la souche bactérienne
Methylophaga nitratireducentescens JAM1 provenant d'un
système de dénitrification d'eau de mer**

Par
FLORIAN MAUFFREY

Thèse présentée pour l'obtention du grade
Philosophiae Doctor (Ph. D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président de jury et examinateur interne :	Pr. Philippe Constant INRS – Institut Armand Frappier
Examineur externe :	Pr. Mohamed Hijri Université de Montréal
Examineur externe :	Pr. Sébastien Roy Université de Sherbrooke
Directeur de recherche :	Pr. Richard Villemur INRS – Institut Armand Frappier

RÉSUMÉ

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 est la bactérie dominante d'un biofilm dénitrifiant nourri au méthanol. Il s'agit d'une méthylotrophe utilisant le méthanol comme unique source de carbone et d'énergie et capable de réduire le nitrate afin de croître en conditions anaérobies. Par contre, elle n'est pas capable de réduire le nitrite en oxyde nitrique, mais possède les éléments génétiques pour réaliser le reste de la dénitrification. Du fait de son abondance dans le biofilm dénitrifiant, elle jouerait un grand rôle dans le processus global de dénitrification du biofilm. Elle possède deux nitrate réductases très similaires lui permettant de réduire le nitrate, trait que l'on ne retrouve que chez quelques rares espèces bactériennes. Ces deux enzymes (Nar1 et Nar2) semblent, de plus, avoir une origine différente, ce qui suggère que leurs rôles pourraient être différents dans la cellule. La création de mutants *knockout* des gènes *narG1* et *narG2* a permis de mettre en évidence une plus grande efficacité de Nar1 dans la réduction du nitrate et le maintien de la croissance. Nar2 semble moins efficace pour la croissance de la bactérie, procurant à cette dernière une affinité plus basse pour le nitrate et une plus faible vitesse de croissance. Néanmoins, Nar2 semble réguler de manière inconnue la transcription de *nar[1]* et trouve donc son utilité chez JAM1.

Le génome de la souche JAM1 prédit la présence de deux oxyde nitrique réductases (Nor1 et Nor2) et une oxyde nitreux réductase (Nos), suggérant la réduction du NO et de N₂O. Des essais en cultures axéniques ont effectivement montré la capacité de la souche JAM1 de réduire le NO et le N₂O. Elle est également capable de croître en conditions anaérobies avec du N₂O comme seul accepteur terminal d'électrons. Une production de N₂O est aussi observée chez la souche JAM1, mais elle est plus probablement attribuée à des réactions abiotiques avec le nitrite et l'hydroxylamine.

Les gènes du complexe Nor1 et Nor2 ont également des origines différentes, suggérant des rôles différents dans la cellule. Tel que les Nar, Nor2 est exprimée à un plus bas niveau que Nor1 dans la culture pure alors qu'elle est relativement surexprimée en biofilm, indiquant un possible rôle spécifique à cette condition. On peut conclure que *M. nitratireducenticrescens* JAM1 prend très probablement activement part à toutes les étapes de la dénitrification dans le biofilm, excepté la réduction du nitrite. Elle possède

une structure génique particulière au niveau de la dénitrification et des mécanismes complexes de régulation qui sont certainement inhérents à l'environnement du biofilm.

SUMMARY

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 is the dominant bacterium of a methanol-fed denitrifying biofilm. It belongs to the methylotrophic bacteria family and uses methanol as unique carbon and energy source and can reduce nitrate for growth in absence of oxygen. Although strain JAM1 cannot reduce nitrite into nitric oxide, it harbours the setup of genes responsible for denitrification. Being the major bacterium in the denitrifying biofilm, its contribution to the denitrification process of the biofilm is important. Two similar nitrate reductases are present for the reduction of nitrate, a characteristic which is only present in few bacterial species. These two enzymes (Nar1 and Nar2) seem to have originated from various species, suggesting a potential different role in the cell. *narG1* and *narG2* knockout mutants highlighted a better efficiency of Nar1 for the reduction of nitrate and bacterial growth. On the other side, Nar2 provided lower nitrate reduction and growth rates to the bacteria. Nevertheless, Nar2 seems to regulate *nar[1]* in an unknown way and thus is useful to strain JAM1. Despite the incapacity of strain JAM1 to reduce nitrite, it can reduce both NO and N₂O with two nitric oxide reductases (Nor1 and Nor2) and a nitrous oxide reductase (Nos). Strain JAM1 is also able to grow under anaerobic conditions with N₂O as sole electron acceptor. N₂O production can be observed but certainly originates from abiotic reactions of nitrite and hydroxylamine. Nor1 and Nor2 also have different origins and thus potentially have different roles in the cell. Like Nar, *nor[2]* expression is lower than *nor[1]* in pure culture but is relatively high in the biofilm, suggesting a different role or regulation. We can conclude that *M. nitratireducenticrescens* JAM1 is certainly active at each step of the denitrification in the biofilm, except the reduction of nitrite. Its denitrification pathway and its regulation are complex and unique and are certainly due to the original environment of the bacteria, the biofilm.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Richard Villemur, mon directeur de recherche, qui m'a accepté dans son laboratoire et permis de réaliser mon doctorat dans d'excellentes conditions. Je le remercie pour sa précieuse aide dans la résolution des problèmes et des énigmes rencontrées sur mon chemin. Finalement, je lui exprime ma gratitude pour m'avoir toujours encouragé dans ce que j'ai entrepris et de ne pas m'avoir mis de pression inutile sur les épaules.

Je veux remercier énormément tous les membres de mon laboratoire pour leurs conseils et l'aide qu'ils m'ont apporté. Je remercie spécifiquement Christine, Céline, Marc et Karla qui m'ont aidé à démarrer mon projet, suivis et soutenus pendant tout mon doctorat et prodigué de précieux conseils. Je me suis toujours senti confiant en sachant que je pouvais compter sur eux en cas de problèmes. Merci énormément !

Je remercie aussi tous les membres du groupe de recherche en microbiologie de l'environnement pour leur aide et leur présence. Mon environnement de travail fut extrêmement agréable et ce fut un plaisir de me rendre à l'insitut tous les jours. Je remercie plus particulièrement certaines personnes : Marie-Christine, Ahmad et Éric pour la pénible confection de mes mutants; Sylvain Millot pour son aide et son énergie pour élaborer des techniques innovantes de HPLC; Quentin et Philippe pour tous leurs conseils et l'élaboration de mon pipeline de transcriptomique ainsi que pour leur aide dans mon travail sur les gaz.

Je remercie tous mes amis d'ici et d'ailleurs qui ont souffert et sauté de joie avec moi pendant tout ce temps et qui m'ont apporté un soutien moral ces quatres dernières années. Je remercie ma famille qui m'a toujours soutenu dans tout ce que j'ai entrepris, que ce soit en France ou au Québec. Finalement, je remercie ma chérie Élodie, qui a toujours été avec moi dans les bons et les mauvais moments et qui a toujours su trouver les mots pour me donner confiance en moi et me pernettre d'avancer.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
SUMMARY	iii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	x
Synthèse	1
1. PROBLÉMATIQUE	2
1.1 Pollution du nitrate dans l'environnement.....	2
1.2 Méthodes de remédiation du nitrate	4
1.3 Le cycle de l'azote	8
1.4 La dénitrification	10
1.5 Le système de dénitrification au Biodôme de Montréal	11
2. LA RÉDUCTION DU NITRATE	16
2.1 Généralités sur les nitrate réductases	16
2.2 La nitrate réductase assimilative	17
2.3 La nitrate réductase périplasmique	18
2.4 La nitrate réductase membranaire	21
2.5 Le transport du nitrate.....	24
2.6 Le système de régulation des nitrate réductases	26
3. LA RÉDUCTION DU NITRITE EN N₂	31
3.1 La réduction du nitrite	31
3.2 La réduction du NO	35
3.3 La réduction du N ₂ O.....	38
3.4 Les voies alternatives de production de N ₂ O.....	40
4. LES BACTÉRIES MÉTHYLOTROPHES	47
4.1 La méthylotrophie	47
4.2 Le genre <i>Methylophaga</i>	52
4.3 <i>Methylophaga nitratireducenticrescens</i> JAM1	55
5. PRÉSENTATION DE LA THÈSE	58
5.1 Hypothèses de recherches.....	58
5.2 Objectifs de l'étude.....	59
5.3 Méthodes.....	60

Articles	61
6. Présentation de l'article 1	62
6.1 Résumé	63
6.2 Summary	64
6.3 Introduction	65
6.4 Materials and Methods.....	66
6.4.1 Bacterial Strains and Growth Conditions	66
6.4.2 Construction of the <i>Knockout</i> Mutants	67
6.4.3 RNA Extraction.....	68
6.4.4 <i>Methylophaga nitratireducenticrescens</i> JAM1 Transcriptome	69
6.4.5 RT-PCR	70
6.4.6 RT-qPCR Assays.....	71
6.4.7 Relative Quantification	71
6.4.8 Fnr and NarL DNA-Binding Motifs	72
6.5 Results.....	72
6.5.1 The Chromosomal Arrangement of the Denitrification Genes and their Expression under Anaerobic Conditions	72
6.5.2 Effects of the Knockout Mutations of narG1 and narG2 on Growth and on Nitrate Reduction	75
6.5.3 Relative Expression Levels of <i>narG1</i> , <i>narG2</i> , <i>narK1</i> , and <i>narK12f</i>	79
6.6 Discussion	81
6.7 Conclusion.....	84
6.8 Funding	85
6.9 Conflict of Interest Statement	85
6.10 Acknowledgment	85
7. Présentation de l'article 2	86
7.1 Résumé	87
7.2 Summary	88
7.3 Introduction	89
7.4 Materials and methods.....	91
7.4.1 Bacterial growth conditions	91
7.4.2 ¹⁵ N-labeling of N ₂ O	92
7.4.3 Measurements of nitrogenous compounds	93
7.4.4 RNA extraction	94
7.4.5 Gene expression	94
7.5 Results.....	96
7.5.1 Reduction of NO and N ₂ O by <i>M. nitratireducenticrescens</i> JAM1	96
7.5.2 Production of N ₂ O by <i>M. nitratireducenticrescens</i> JAM1	98
7.5.3 Role of NO ₃ ⁻ and NO ₂ ⁻ in N ₂ O production	101
7.5.4 Influence of NH ₄ ⁺ in N ₂ O production	102
7.5.5 Gene expression	105
7.6 Discussion	105

7.7 Conclusion	110
Funding information	110
Acknowledgment	110
8. Résultats supplémentaires	111
8.1 Matériels et méthodes	111
8.1.1 Cultures et conditions de croissance	111
8.1.2 Extraction de l'ARN et analyses bioinformatiques	112
8.2 Résultats et discussion	113
9. Discussion	117
10. Conclusion	123
11. Perspectives	125
Annexe	126
Script - alignement sur génome	126
Module fastx_tools/0.0.13	126
Module bowtie/2.2.3	126
Module SAMtools/0.1.18	127
Module BEDTools/2.20.1	127
Script – Normalisation avec R (NOIseq)	128
Références	131

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Cycle de l'azote	p. 9
Figure 1.2 : Système de dénitrification du Biodôme de Montréal et biobille contenant le biofilm dénitrifiant	p. 13
Figure 1.3 : Représentation d'un biofilm en coupe	p. 15
Figure 2.1 : Représentation des différentes nitrate réductases	p. 20
Figure 2.2 : Système de régulation des gènes associés à la dénitrification	p. 30
Figure 3.1 : Schéma du processus complet de dénitrification de <i>Paracoccus denitrificans</i>	p. 34
Figure 3.2 : différentes voies enzymatiques et enzymes associées menant à la production de N ₂ O	p. 43
Figure 6.1 : Gene arrangement of the 67 kbp region containing all of the denitrification genes	p. 73
Figure 6.2 : N ₂ O reduction by strain JAM1	p. 77
Figure 6.3 : Growth, nitrate reduction and nitrite production in cultures of strain JAM1 and the derivative <i>narG</i> mutants	p. 78
Figure 6.4 : Specific growth rates	p. 79
Figure 6.5 : Relative expressions of <i>narG1</i> , <i>narG2</i> , <i>narK12f</i> , and <i>narK1</i>	p. 85
Figure 7.1 : Reduction of N ₂ O by <i>M. nitratireducenticrescens</i> JAM1 and its growth on N ₂ O	p. 97
Figure 7.2 : Reduction of NO by <i>M. nitratireducenticrescens</i> JAM1	p. 99
Figure 7.3 : Production of N ₂ O by <i>M. nitratireducenticrescens</i> JAM1	p. 100
Figure 7.4 : Production of N ₂ O by <i>M. nitratireducenticrescens</i> JAM1 in presence of acetylene	p. 102
Figure 7.5 : NH ₄ ⁺ concentration in <i>M. nitratireducenticrescens</i> JAM1 cultures	p. 104
Figure 7.6 : Hydroxylamine production in <i>M. nitratireducenticrescens</i> JAM1 cultures	p. 107
Figure 7.7 : Relative transcript levels of <i>norB1</i> , <i>norB2</i> , <i>nnrS</i> , and <i>nosZ</i>	p. 109
Figure 8.1 : Nombre de gènes dont la régulation est significativement différentes chez JAM1 dans les cultures en biofilms par rapport à la culture pure	p. 116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1 : Caractéristiques des différentes espèces de <i>Methylophaga</i>	p. 54
Table 6.1 : Sequences of potential NarL and ANR binding sites	p. 74
Table 6.2 : Relative level of transcriptomic reads of the denitrification genes	p. 76
Table 6.3 : Kinetics of growth and nitrate reduction under denitrifying conditions	p. 80
Table 7.1 : PCR primers	p. 95
Table 7.2 : Reduction of nitrate, nitrite and production of N ₂ O by strain JAM1 and the JAM1Δ <i>narG1narG2</i> double mutant	p. 101
Table 8.1 : Ratio d'expression de différents gènes d'intérêt de JAM1 pour les cultures en biofilm par rapport à la culture pure	p. 115

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANR : *Arginine Nitrate reduction Regulator*

AOA : *Ammonium-Oxidizing Archea*

AOB : *Ammonium-Oxidizing bacteria*

ARN : Acide RiboNucléique

ASW : *Artificial Sea Water*

ATP : Adénosine TriPhosphate

BHIB : *Brain Heart Infusion Broth*

bis-MGD : *bis(Molybdopterin Guanine Dinucleotide)*

BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool*

cAMP : *cyclic Adenosine MonoPhosphate*

CBB : Calvin-Benson-Bassham

DMS : *DiMethylSulfide*

DMSOR : *DiMethylSulfoxide Reductase*

DMSP : *DiMethylSulfonioPropionate*

DNRA : *Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium*

EPS : *Extracellular Polymeric Substance*

FAD, FaDH : *Flavin Adenine Dinucleotide*

FDH : *Formate Dehydrogenase*

FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*

FNR : *Fumarate Nitrate reduction Regulator*

HPI : *Hexulosephosphate isomerase*

HPS : *Hexulosephosphate synthase*

HURM : *Hydroxylamine-Ubiquinone Redox Module*

IHF : *Integration Host Factor*

Ks : Constante de demi-saturation

MADH : *Methylamine dehydrogenase*

MAR-FISH : *MicroAutoRadiography*

MDH : *Methanol DeHydrogenase*

MFS : *Major Facilitator Superfamily*

MGD : *Molybdenum Guanine Dinucleotide*

MOB : *Methane Oxydizing Bacteria*

MQH₂ : MenaQuinole

NAD(P)H : *Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate*

NAD⁺ : *Nicotinamide Adenine Dinucléotide*

NRA : *Nitrate Reductase A*

NRZ : *Nitrate Reductase Z*

PCR : *Polymerization Chain reaction*

PMS-asc : *Phenazine Methosulfate plus ascorbate*

RNA-seq : *RiboNucleic Acid-sequencing*

RuMP : *Ribulose Mono-Phosphate*

SLM : Saint-Laurent Marin

UQH₂ : UbiQuinone

*Étude de la voie de dénitrification de la souche bactérienne
Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 provenant d'un
système de dénitrification d'eau de mer*

Synthèse

1. PROBLÉMATIQUE

1.1 Pollution du nitrate dans l'environnement

Le nitrate est un composé inorganique constitué d'un atome d'azote et de trois atomes d'oxygène (NO_3^-). On le retrouve naturellement sous forme ionique, associé le plus souvent à un atome de sodium (Na^+) ou de potassium (K^+). Les composés à base de nitrate sont utilisés dans l'alimentation comme agents de conservation empêchant la croissance de bactéries néfastes pour l'être humain, notamment *Clostridium botulinum* (Reichl, 2010). Depuis la découverte de la fixation chimique de l'azote et l'avènement de l'agriculture intensive au 20^e siècle, ceux-ci sont principalement utilisés dans les engrais chimiques en tant que source d'azote pour la croissance des plantes (Postgate, 1998, Vitousek *et al.*, 1997). Très solubles, ce sont des polluants importants des eaux souterraines et de surface, et sont classés seconds dans le classement des polluants les plus communs dans le monde après les pesticides (Spalding *et al.*, 1993). Les activités humaines sont la principale cause de pollution par le nitrate et les sources de pollution sont généralement de nature diffuse avec l'agriculture intensive ou l'irrigation avec des eaux usées (Bouchard *et al.*, 1992, Mahvi *et al.*, 2005). Le nitrate se retrouvant en grande quantité dans les sols, il est soumis au lessivage par les eaux de pluie qui le conduit jusqu'aux nappes phréatiques et cours d'eau (Strebel *et al.*, 1989). De grandes quantités de nitrate peuvent également venir de rejets industriels directement dans les cours d'eau ou de déversements de fosses septiques domestiques (Wakida *et al.*, 2005). Finalement, la décomposition bactérienne de déchets ou de cadavres d'animaux conduisent également à la production de nitrate. Ce phénomène est particulièrement problématique dans les systèmes aquatiques fonctionnant en circuit fermé, comme les aquariums municipaux où le nitrate s'accumule rapidement.

La pollution au nitrate des cours d'eau conduit au phénomène d'eutrophisation dans de nombreux cas. De fortes concentrations de nitrate en conjonction avec de grandes concentrations de phosphore (généralement sous forme de phosphate) peuvent entraîner un apport en nutriments anormal dans des milieux oligotrophes ou mésotrophes, rendant ces milieux plus eutrophes (V. H. Smith *et al.*, 1999). D'après la loi de Liebig sur le minimum, le rendement de croissance des plantes d'un milieu est limité par le nutriment essentiel, que l'on retrouve en plus petite quantité dans ce milieu

(von Liebig, 1855). L'azote N et le phosphore P sont les deux principaux éléments qui limitent le développement des plantes terrestres, mais aussi de certaines plantes d'écosystèmes aquatiques (Howarth, 1988, V. H. Smith, 1998, Vitousek *et al.*, 1991, Walker, 1991). Ainsi, un fort apport nutritionnel en nitrate profite au développement du phytoplancton et d'autres plantes aquatiques, augmentant la turbidité du milieu et provoquant la mort de nombreux organismes vivants par manque d'oxygène (hypoxie). La biodiversité de ces milieux s'en trouve alors diminuée, impactant tout l'écosystème aquatique. Le développement efflorescences algales (cyanobactéries productrices de toxines) s'est également accéléré et s'est étendu avec l'augmentation de l'eutrophisation des milieux aquatiques, augmentant la mortalité animale, mais posant également des problèmes de santé environnementale et financiers (D. M. Anderson *et al.*, 2002, Pitois *et al.*, 2001).

Le nitrate a également un effet toxique direct sur les organismes vivants. Bien que beaucoup moins toxique que d'autres molécules azotées comme le nitrite ou l'ammonium, il présente une certaine toxicité quand il est présent en très forte concentration (Camargo *et al.*, 2005). La toxicité du nitrate pour les animaux est principalement due au phénomène d'anoxie. Une fois dans le sang, le nitrate modifie la forme des transporteurs d'oxygène comme l'hémoglobine, les rendant incapables de fixer les molécules d'oxygènes (Cheng *et al.*, 2002, J. Conrad, 1990, Jensen, 1996, Scott *et al.*, 2000). Les muscles et organes reçoivent alors de moins en moins d'oxygène, conduisant à la mort de l'individu. Ingérer de trop grandes quantités de nitrate est aussi très dangereux pour l'être humain, notamment les enfants. Le nitrate est converti en nitrite dans les intestins et, en passant dans le sang, va bloquer les hémoglobines et provoquer une méthémoglobinémie (Sandstedt, 1990, Wolfe *et al.*, 2002). De plus, le nitrate contribue à la formation de nitrosamines, molécules considérées cancérigènes chez les mammifères (Harte *et al.*, 1991).

Dans les eaux de surface, des concentrations excédant 25 mg NO_3^- -N/L (1.8 mM) peuvent être observées. Ces valeurs peuvent aller jusqu'à 100 mg NO_3^- -N/L (7.1 mM) dans les eaux souterraines (Bogardi *et al.*, 1991, Gleick, 1993, Steinheimer *et al.*, 1998). Dans les aquariums marins et aquacultures, les concentrations en nitrate peuvent atteindre des valeurs aussi hautes que 500 mg NO_3^- -N /L (35.5 mM) du fait de la remise en circulation continue de l'eau et d'une bonne oxygénation (De Graaff, 1964). Malheureusement, aucune concentration limite de nitrate dans l'eau n'est officiellement

fixée à ce jour pour la santé animale. Néanmoins, il est admis qu'une concentration inférieure à 20 mg NO_3^- -N/L (1.4 mM) est nécessaire pour la bonne santé des animaux aquatiques dans les milieux marins (Spotte, 1979). Par contre, la concentration en nitrate dans l'eau potable est très surveillée et réglementée. Les concentrations maximales permises du nitrate dans l'eau potable ont été fixées à 10 mg NO_3^- -N/L (0.7 mM) au Canada et aux États-Unis, ce qui correspond à une valeur de 45 mg/L de nitrate (EPA, 1986, Guidelines, 2014, Sutton *et al.*, 2011). Cette valeur est de 50 mg/L de nitrate pour l'Union européenne. En comparaison, les teneurs maximales acceptées pour le nitrite dans l'eau potable sont de 1 mg/L et 0,5 mg/L de nitrite en Amérique du Nord et en Europe, respectivement.

1.2 Méthodes de remédiation du nitrate

Afin de maintenir des concentrations aussi basses pour l'eau destinée à la consommation, différentes méthodes ont été mises au point et se classent en deux catégories : les traitements physico-chimiques et les traitements biologiques (Dwivedi *et al.*, 2007). Les traitements abiotiques se composent essentiellement de la séparation sur membrane, l'échange d'ions, la réduction catalytique, l'électrodialyse et l'osmose inverse. La séparation sur membrane consiste à séparer le nitrate de l'eau en traversant une membrane semi-perméable. Cette méthode permet de traiter les eaux souterraines en la couplant à des techniques d'électrocinétique (Chew *et al.*, 1998). Les coûts élevés de cette technique et la production de déchets concentrés en nitrate sont les deux grands désavantages de cette technique (Kruithof *et al.*, 1989). Dans la technique d'échange d'ions, un des ions chlorure Cl^- ou bicarbonate HCO_3^- placés sur une résine sont échangés avec les ions nitrate NO_3^- . Tout comme la séparation sur membrane, cette technique génère des déchets riches en nitrate, bicarbonate, chlore mais également sulfate SO_4^{2-} (Rogalla *et al.*, 1991). La réduction catalytique est la simple transformation du nitrate en azote gazeux à l'aide d'un catalyseur comme le platine Pt, le palladium Pd ou encore le rhodium Rh. Une efficacité de réduction accrue est atteinte si un faible courant électrique est adjoint au processus (Reddy *et al.*, 2000). Le fonctionnement des membranes dites "osmose inverse" est basé sur le principe d'application d'une pression pour compenser la pression générée par le phénomène d'osmose. L'eau peut ainsi passer à travers la membrane semi-perméable du milieu

avec une forte concentration en ions vers le milieu faiblement concentré. Cette technique est de plus en plus utilisée depuis les 40 dernières années, essentiellement dans la désalinisation de l'eau de mer (Greenlee *et al.*, 2009). Elle est également utilisée pour purifier l'eau de contaminants comme le nitrate, notamment dans les zones rurales (Schoeman *et al.*, 2003). Finalement, l'électrodialyse est une méthode consistant à séparer les sels contenus dans l'eau à l'aide de membranes échangeuse d'ions en faisant intervenir un courant électrique (Kesore *et al.*, 1997). Deux électrodes sont placées de part et d'autre de la membrane séparant en deux cellules le volume d'eau à traiter. Due à la sélectivité alternative des membranes, le courant généré finit par entraîner la migration de sels inorganiques dans une des deux cellules, créant ainsi une cellule riche en sels et une autre pauvre en sels. Malgré la diversité des méthodes existantes, les coûts élevés et/ou la production de déchets rendent les techniques de remédiation abiotiques peu attrayantes.

La remédiation biologique, autrement appelée bioremédiation, ne fait pas face à ces problèmes et repose sur la capacité naturelle des bactéries et des plantes à consommer le nitrate. La bioremédiation par les plantes (phytoremédiation) repose sur l'absorption ou la dégradation des contaminants par les plantes. Plusieurs techniques de phytoremédiation différentes existent, telles que la phytodégradation ou la phytoextraction, et chaque situation requiert un traitement particulier en raison du climat, de la géologie ou encore de la région concernée (Dwivedi *et al.*, 2007, Lee, 2013). Parmi les exemples d'applications se trouvent le traitement des eaux usées, des éléments traces ou des polluants organiques (Raskin *et al.*, 1997, Schnoor *et al.*, 1995, Vymazal, 2002). Les zones humides sont propices à la phytoremédiation, en raison de leurs rôles de réservoir et de collecteur d'eau (J. B. Williams, 2002). Elles sont utilisées dans le traitement de nombreux effluents, dont les eaux de ruissellements agricoles chargées en nitrate et/ou pesticides (Beutel *et al.*, 2009, Maillard *et al.*, 2011). Les plantes sont aussi capables de stimuler les bactéries de la rhizosphère afin qu'elles dégradent les polluants. Ce processus est appelé phytostimulation ou encore rhizoremédiation (Gerhardt *et al.*, 2009). Les microorganismes, et plus particulièrement les bactéries, sont aussi directement utilisés en bioremédiation pour la dégradation du nitrate (R. L. Smith *et al.*, 1994). À nouveau, beaucoup de processus existent et chaque situation requiert une solution appropriée. La bioremédiation *in situ* consiste à stimuler les microorganismes présents dans la zone contaminée, généralement par l'introduction d'une source de carbone particulière dans le sol afin qu'ils puissent réaliser une

dénitrification plus performante. Cela a pour avantage d'avoir un coût de mise en œuvre peu élevé et une facilité d'utilisation (Cartmell *et al.*, 1998). La source de carbone est considérée comme limitante dans le développement des bactéries dénitrifiantes, et afin de stimuler leur activité, des sources de carbone sont directement injectées dans le sol. Parmi les plus utilisées se trouvent le formate, le méthanol, l'éthanol, l'acétate et le sucrose. Différentes manières d'injection ont aussi été étudiées, allant de l'injection en continu à l'injection pulsée.

La stimulation de l'activité bactérienne est pleinement exploitée dans les systèmes de traitement appelés bioréacteurs. De manière générale, les bioréacteurs sont des systèmes entretenant une activité bactérienne dans un milieu donné à des fins de production de biomasse et de métabolites particuliers ou afin d'entretenir un processus chimique constant. Il existe de nombreux types et déclinaisons de bioréacteurs qui sont propres à la situation géographique et hydraulique et au traitement que l'on souhaite appliquer (Schipper *et al.*, 2010). Ici ne sera fait la revue que des bioréacteurs étant utilisés dans la remédiation du nitrate. Les paramètres communs à tous les bioréacteurs traitant le nitrate sont l'introduction d'une source de carbone dans le milieu à traiter, afin de stimuler la croissance bactérienne et les conditions anaérobies afin de stimuler l'activité dénitrifiante (réduction du nitrate en azote gazeux).

Le premier type de bioréacteur consiste en un mur poreux que l'on introduit dans le sol, de sorte que le flux d'eau à traiter rentre en contact avec ce mur. Le flux d'eau n'est que ralenti et passe au travers du mur. Cette méthode permet de traiter les effluents souterrains peu profonds de manière passive avant qu'ils n'atteignent une rivière ou une nappe souterraine. Le mur est constitué du matériel jouant le rôle de source de carbone, généralement du bois sous forme de copeaux ou de sciure mélangé avec du sol (Fahrner, 2002, Robertson *et al.*, 1995). Cette technologie existe aussi sous forme de membranes actives perméables, sur lesquelles est fixé le matériel jouant le rôle de source de carbone (EPA, 1998). Les bioréacteurs en couches fonctionnent sur le même principe que les murs poreux à la différence qu'ils se composent de différentes couches, posées à l'horizontale sous la zone à traiter. Ils peuvent être placés sous des drains de fosses septiques ou sous des terres arables irriguées (Robertson *et al.*, 1995, Schipper *et al.*, 2008).

La dernière grande catégorie de bioréacteur est représentée par les bioréacteurs à lit et à membrane. Ce sont de grandes cuves ou citernes dans lesquelles sont ajoutés

une source de carbone tels le méthanol ou l'éthanol disponibles en grande quantité et à faible coût (Delanghe *et al.*, 1994, Ergas *et al.*, 2004) et l'eau à traiter. Les microorganismes vont alors se développer à l'intérieur des cuves où l'on maintient artificiellement des conditions de croissance idéales afin de favoriser la dénitrification. Dans les bioréacteurs à membrane, l'eau circule dans des fibres laissant diffuser le nitrate vers un biofilm bactérien dénitrifiant se trouvant sur le contour de ces fibres. Les bactéries sont ainsi séparées de l'eau sortant du bioréacteur et les populations bactériennes sont facilement contrôlables en dosant la quantité de source de carbone injectée (Ergas *et al.*, 2004). Les bioréacteurs à lit se divisent en plusieurs types. Ils sont qualifiés à lit emballé quand une matrice fixe poreuse sert de support aux bactéries. Le flux d'eau passe alors au travers de la matrice afin d'être traité (Warnock *et al.*, 2005). Si le bioréacteur est dit à lit fluidisé, les supports ne sont plus fixes mais mis en mouvement. Ce sont, par exemple, de petits supports en forme de section de tuyaux avec une croix à l'intérieur et possédant une grande surface où les bactéries peuvent se développer. Néanmoins, une grande variété de supports existe. Le mouvement est créé par le flux d'eau circulant de bas en haut (Godia *et al.*, 1995). Dans les bioréacteurs à lit mobile, l'eau est mise en mouvement mécaniquement dans la cuve afin de créer un brassage continu. L'ajout de plus ou moins de supports suffit à contrôler la quantité de bactéries et à contrôler le processus de dégradation (Rusten *et al.*, 1995).

On distingue également plusieurs façons d'alimenter les bioréacteurs. Le mode cuvée consiste à remplir le bioréacteur et à laisser séjourner l'eau pendant le temps nécessaire au traitement, puis à vider complètement la cuve. Celle-ci est lavée et remplie à nouveau afin de recommencer le processus. En mode continu, une entrée et une sortie d'eau sont maintenues en permanence. Les rendements atteints sont alors souvent plus élevés qu'en mode cuvée car on arrête le bioréacteur moins souvent et il est plus facile de contrôler les paramètres de croissance des bactéries afin de les ajuster. Il est possible de fixer les bactéries sur différents supports (eux-même fixés ou libres) afin de perdre le moins de biomasse possible. Finalement, le mode cuvée-alimentée est une combinaison des deux modes décrits précédemment. Un apport d'eau régulier ou périodique est maintenu dans la cuve, mais il n'y a pas de sortie continue d'eau. La cuve est vidée partiellement ou totalement de manière périodique, dès qu'elle est pleine ou dès que l'on juge le traitement complet. Cette méthode est la plus répandue et permet d'atteindre de bons rendements car on peut régler finement les paramètres de croissance, comme en mode continu (Cinar *et al.*, 2003).

1.3 Le cycle de l'azote

L'azote est un élément essentiel de la vie, constituant primordiale de l'ADN et des protéines, et est présent dans tous les êtres vivants, y compris les bactéries. Afin de pouvoir utiliser de nombreuses formes de molécules azotées différentes, elles ont développé différentes stratégies qui ont conduit à la mise en place du cycle de l'azote (Figure 1.1). Ces réactions assurent un équilibre entre les différentes formes de l'azote et un recyclage permanent des composés azotés. Le métabolisme de l'azote n'est pas seulement lié à la production de biomasse, mais également à la production d'énergie. En effet, si certaines bactéries tendent surtout à produire de l'ammoniac NH_3 afin d'assimiler l'azote, d'autres utilisent le nitrate comme accepteur final d'électrons dans une réaction d'oxydation produisant de l'ATP (Van Spanning *et al.*, 2005). On peut globalement diviser le cycle de l'azote en quatre parties distinctes : la réduction du nitrate/oxydation du nitrite, la dénitrification, la fixation de l'azote gazeux et la nitrification. D'autres voies s'ajoutent à celles-ci et sont internes au cycle, comme l'anammox (anaerobic ammonium oxidation) ou l'ammonification du nitrite.

La fixation de l'azote permet aux bactéries de transformer l'azote gazeux N_2 en ammoniac NH_3 , élément facilement assimilable et source d'azote pour la production de biomolécules telles que l'ADN, l'ARN et les protéines (Burns *et al.*, 1975). Cette réaction hautement endothermique est présente chez de nombreuses bactéries aérobies et anaérobies en vie « libre » ou associées à d'autres organismes tels que les racines des plantes. Dans les océans, ce sont essentiellement les cyanobactéries qui fixent l'azote (Zehr, 2011). La nitrification consiste en l'oxydation de l'ammonium en nitrite NO_2^- , en passant par la forme intermédiaire de l'hydroxylamine NH_2OH . Ces réactions entraînent la génération d'énergie sous forme d'électrons stockés dans les quinones (Ferguson, 1998). Cette réaction peut être complétée par l'oxydation du nitrite en nitrate, appelée nitratisation. La nitrification est un phénomène aérobie mais l'oxydation de l'ammonium en absence d'oxygène est tout de même possible. Il a été prouvé que le nitrate ou le nitrite pouvait servir à oxyder l'ammonium pour produire de l'azote gazeux dans un processus appelé l'anammox (Mulder *et al.*, 1995). Ce processus est de plus en plus utilisé dans la remédiation de l'ammonium dans les systèmes de traitement des eaux (Ni *et al.*, 2013). La réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA) produit de l'ammonium à partir du nitrate en passant par le nitrite (Kraft *et al.*, 2011). La réduction du nitrite permet

de transférer huit électrons à la chaîne respiratoire pour générer de l'ATP et l'ammonium produit n'est pas assimilé. Ce processus prend place quand peu de nitrate est présent dans le milieu par rapport au carbone organique. La réduction du nitrite en ammonium est catalysée par la nitrite réductase NrfA alors que la réduction du nitrate est réalisée grâce à la nitrate réductase périplasmique NapAB dans la majorité des cas. Le nitrite peut également être réduit en ammonium par l'enzyme Nas ou NirBD afin de pouvoir assimiler l'azote dans la biomasse. C'est pourquoi ces deux nitrite réductases sont dites assimilatrices.

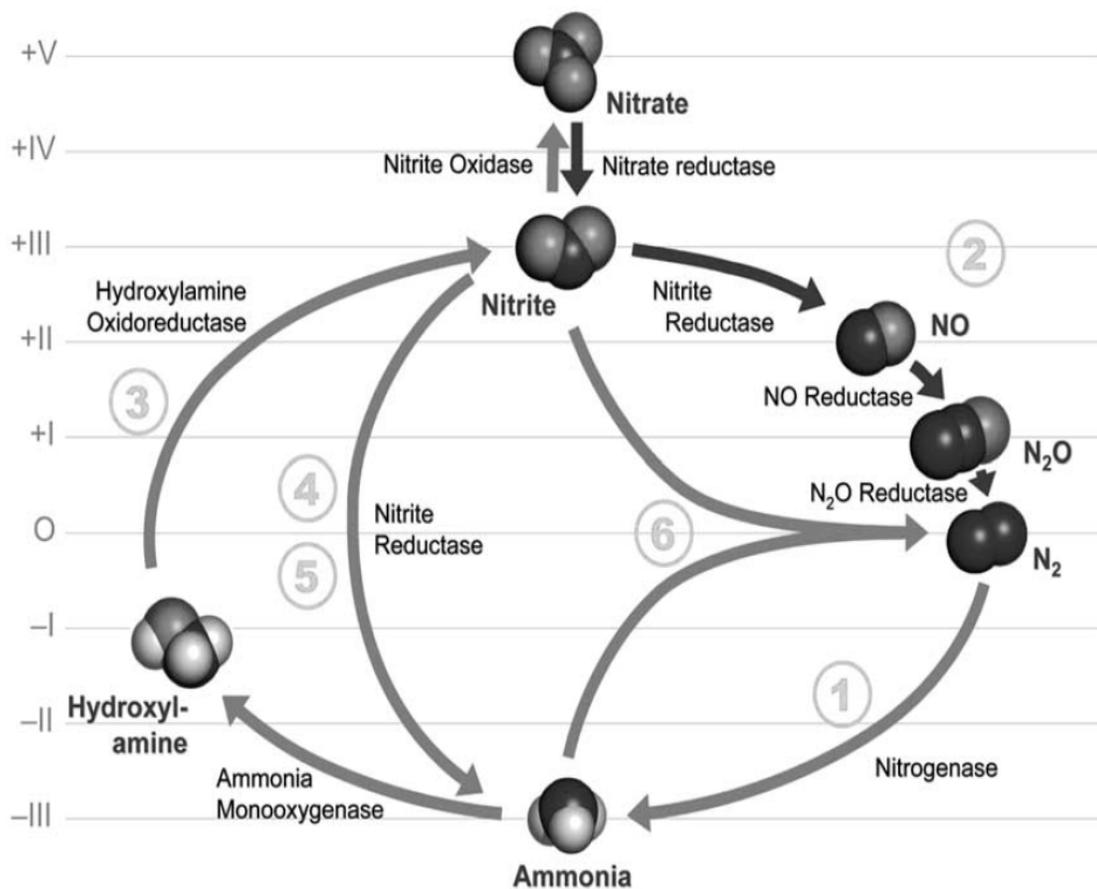


Figure 1.1 : Cycle de l'azote dans l'environnement et enzymes associées à chaque transformation. Les différents processus représentés sont (1) la fixation de l'azote, (2) la dénitrification, (3) la nitrification, (4, 5) l'ammonification dissimilatoire et assimilatoire du nitrate et (6) l'oxydation anaerobie de l'ammonium (anammox).

Tiré de Einsle *et al.* (2004).

1.4 La dénitrification

La dénitrification est une des voies métaboliques principales du cycle de l'azote. Au sens strict, elle est défini comme la réduction du nitrite en azote gazeux (Zumft, 1997). La réduction du nitrate en nitrite n'en fait pas partie car cette réaction est commune à de nombreuses espèces bactériennes différentes, dont celles qui font la DNRA. Cependant, il est assez courant d'inclure la réduction du nitrate en nitrite dans la définition de la dénitrification, et c'est ce qui sera fait ici. La dénitrification est un processus dissimilatoire faisant partie de l'appareil bioénergétique de la paroi cellulaire bactérienne. En effet, le rôle de ce processus bactérien est de produire de l'énergie grâce à la réduction du nitrate en nitrite ou du NO et du N₂O en N₂. Ce processus peut être qualifié de respiration alternative car il vient remplacer le processus de respiration aérobie quand celui-ci n'est pas possible. Concrètement, les différents oxydes d'azote présents dans ce processus jouent le rôle d'accepteur final d'électron dans les réactions d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire. Un gradient électrochimique se crée à travers la membrane et entraîne la production d'ATP à partir de d'ATP synthase. C'est un processus presque exclusivement facultatif, en cela qu'il vient toujours s'ajouter à un autre système de production d'énergie déjà en place dans la cellule. De manière générale, l'activation de cette voie métabolique se fait en présence d'oxyde d'azote et en absence d'oxygène; la respiration aérobie produisant plus d'énergie que la dénitrification est donc privilégiée quand celle-ci est possible. Malgré cela, des bactéries capables de faire la dénitrification en présence d'oxygène ont été identifiées (Hayatsu *et al.*, 2008). *Paracoccus denitrificans* ATCC 35512 a été très étudiée pour sa capacité à pouvoir réduire le nitrate en nitrite en conditions aérobies. La découverte de nombreuses bactéries capables de dénitrification aérobie tend à conclure que ce trait est un caractère particulier de la dénitrification et non pas une rare exception. Certaines réactions pourraient toutefois être liées préférentiellement à un mécanisme de détoxification du milieu plutôt qu'à un mécanisme de respiration. En effet, si le nitrate peut présenter une certaine toxicité comme évoqué précédemment, le nitrite et le NO produits par les réductions sont des molécules beaucoup plus actives ayant une toxicité très élevée (Mancinelli *et al.*, 1983).

On retrouve des bactéries dénitrifiantes dans la plupart des environnements (sols, eaux douces et marines), dont une grande variété appartient à la classe des protéobactéries (Hurst *et al.*, 2007). Il semble que les espèces dénitrifiantes soient plus

fréquentes parmi les alpha- et betaprotéobactéries, bien que cela ne soit pas reconnu officiellement comme un patron de distribution (Zumft, 1997). De plus, les bactéries dénitrifiantes sont le plus souvent aérobies et hétérotrophes, mais il existe aussi des autotrophes et fermenteurs (Maier *et al.*, 2009). Certaines bactéries dénitrifiantes sont également impliquées dans d'autres réactions du cycle de l'azote en participant à la fixation du N₂ ou la nitrification. Il existe une grande variété de caractères différents au niveau métabolique et au niveau de l'activité chez les bactéries dénitrifiantes. La dénitrification peut être complète ou partielle mais, dans un milieu donné, la dénitrification complète peut être réalisée par plusieurs espèces. Une coopération entre différentes espèces bactériennes s'opère souvent, chacune participant à une partie du processus. Cette association inter-espèce dans la réalisation d'un ou plusieurs processus métabolique est qualifiée de syntrophie (Madigan *et al.*, 1997). Dans une telle association, l'action d'une espèce est dépendante de celle de l'autre espèce. La diversité bactérienne d'un milieu a alors un impact important sur les processus métaboliques, façonnant les interactions inter-espèces. De nombreux cas de syntrophies ont été étudiés, que ce soit pour la dégradation de xénobiotiques, la dégradation méthanogène ou la dénitrification (Raghoebarsing *et al.*, 2006, Schink, 1997, D. Smith *et al.*, 2005). Beaucoup d'organismes sont devenus des modèles d'études pour la dénitrification, du fait principalement des connaissances générales que l'on possède sur ces organismes et de leur facilité d'étude en laboratoire. Parmi les organismes les plus étudiés, on retrouve notamment *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* et *Micrococcus denitrificans* (Zumft, 1997). Contrairement à la nitrification, la dénitrification est un trait facultatif, présent chez de nombreuses espèces bactériennes et qui n'est pas associée à un métabolisme particulier du carbone. Il est donc impossible d'utiliser ce trait pour définir spécifiquement des genres et espèces bactériennes. L'étude de cette voie métabolique et de sa diversité se fait alors au travers de la caractérisation des gènes codant pour cette voie.

1.5 Le système de dénitrification au Biodôme de Montréal

Le Biodôme de Montréal est un lieu où sont reconstitués les différents biomes présents en Amérique et où sont hébergées des centaines d'espèces animales et végétales. Parmi les biomes présents figure le Saint-Laurent marin (SLM), représentant

essentiellement la faune aquatique présente dans le fleuve du Saint-Laurent. Plusieurs espèces de poissons, invertébrés et oiseaux cohabitent dans ce mésocosme marin peu alimenté en eau fraîche (Parent *et al.*, 2000). Du fait de leurs fonctionnements en circuit fermé, les aquariums publics et aquacultures font face à des problèmes d'accumulation de déchets et de contaminants (Hamlin *et al.*, 2008, Parent *et al.*, 2000). Ce fut le cas du Biodôme de Montréal où la concentration en nitrate augmenta rapidement après la mise en service en 1992 du SLM pour atteindre 10.7 mM après 3 ans de fonctionnement, ayant un impact sur la santé des animaux. Une filière de dénitrification fut mise en place en 1998 afin de traiter les 3 millions de litres d'eau contenus dans le SLM et de diminuer les concentrations en nitrate ayant atteint les valeurs très élevées de 200 mg NO₃⁻-N/L (Parent *et al.*, 2000). Le système de dénitrification fut installé pour fonctionner en parallèle du système de contrôle principal du bassin. Deux cuves de 1m³ chacune composaient principalement le système, dont un réservoir de désoxygénation et un réservoir de dénitrification (Figure 1.2.A). Une unité de fractionnement d'écume ainsi qu'un réservoir de débordement venaient compléter l'installation. La cuve associée à la dénitrification contenait des supports en libre mouvement pour le développement du biofilm dénitrifiant. La température maintenue dans le système était comprise entre 16°C et 24°C et du méthanol était ajouté en tant que source de carbone. Le biofilm s'est développé au fil du temps par des microorganismes présents naturellement dans l'eau de mer du Biodôme qui ont trouvé dans le bioréacteur un environnement propice à leur développement (environnement microaérobie, nitrate et méthanol) (Figure 1.2.B). Normand Labbé *et al.* (2003b) démontrèrent qu'en ajoutant un cocktail d'éléments traces deux fois par jour (370 mg FeSO₄ · 7H₂O, 130 mg MnSO₄ · 4H₂O, 20 mg CuSO₄ · 5H₂O), les rendements de dénitrification étaient améliorés. Malgré des performances attestées, la filière de dénitrification fut arrêtée en 2005 pour cause de rendements insuffisants. Le biofilm du réacteur a pu être conservé par le laboratoire du Prof. Villemur pour des études subséquentes.

Les biofilms peuvent être définis comme une surface ou une interface sur ou dans laquelle une communauté de microorganismes interagissent ensemble et se développent (Allison *et al.*, 2000). Cette communauté est représentée par un ensemble de populations bactériennes de différentes espèces ayant des interactions telles que l'échange de matériel génétique, de signaux de communications ou de métabolites. De plus, une matrice composée d'exopolysaccharides (EPS) est sécrétée par les bactéries composant le biofilm et constitue un microenvironnement dans lequel les bactéries

évoluent (Figure 1.3). Ces EPS sont constitués principalement de polysaccharides et de protéines, mais aussi d'autres constituants tels que de l'ADN, des lipides et des substances humiques (Evans, 2003). Les biofilms se retrouvent dans des environnements variés où ils se forment la plupart du temps sur une surface à l'interface solide-liquide. Ils adoptent une forme dépendante du milieu dans lequel ils se trouvent, allant du filament au tapis bactérien ou sous forme ressemblant à un mycélium fongique (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). La structure interne du biofilm peut également varier d'un cas à un autre, bien que la distribution à l'intérieur du biofilm ne semble jamais se faire de manière homogène. L'hétérogénéité des biofilms se manifeste par une distribution variable des cellules et des agrégats de cellules, par la présence de canaux traversant le biofilm de part en part ou d'espaces vides d'EPS (Costerton *et al.*, 1995). Les avantages du mode de vie en biofilm sont nombreux (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). La vie sur une surface apporte une stabilité pour le développement bactérien et une proximité des cellules favorisant certaines fonctions catalytiques. L'EPS formant le biofilm apporte également une protection efficace contre de nombreux facteurs environnementaux (pH, exposition aux UV et agents antimicrobiens, déshydratation et salinité, ...). Finalement, le biofilm pourrait également favoriser l'émergence de sous-populations appelées « persistantes » présentant un phénotype plus résistant que les populations régulières.



Figure 1.2 : Photos du système de dénitrification du Biodôme de Montréal. (A) Désoxygénateur (à droite) et dénitrificateur (à gauche); (B) Photo d'une biobille de type Bioflow 9[®] sur laquelle s'est développé un biofilm.

N. Labbé *et al.* (2003a) étudièrent le biofilm se développant dans le système de dénitrification du SLM dans le but de caractériser la microflore bactérienne et sa dynamique. Trois souches appartenant aux alphaprotéobactéries furent isolées à partir du biofilm et nommées NL8, NL21 et NL23. Ces trois souches furent affiliées respectivement à la famille des *Phyllobacteriaceae*, et aux espèces *Paracoccus denitrificans* et *Hyphomicrobium zavarzinii*, les deux dernières espèces ayant déjà été retrouvées dans d'autres systèmes de dénitrification nourris au méthanol (Lemmer *et al.*, 1997, Neef *et al.*, 1996). La souche NL23 fut retrouvée avec une plus grande abondance que les deux autres souches, et l'étude de cette souche démontra son appartenance à une nouvelle espèce nommée *Hyphomicrobium nitratorans* (Martineau *et al.*, 2013b). Une analyse des gènes de l'ARN ribosomal 16S a permis de mettre en évidence que les bactéries les plus abondantes dans le biofilm représentaient 15 à 20 espèces différentes. Le groupe des gammaprotéobactéries se révéla être le plus abondant, représentant 71% des gènes de l'ARN 16S analysés, affiliés au genre *Methylophaga* de la famille des *Picirickettsia*. Deux nouvelles espèces appartenant au genre *Méthylophaga*, JAM1 et JAM7, furent par la suite isolées et nommées respectivement *Methylophaga nitratorans* et *Methylophaga frappieri* (Auclair *et al.*, 2010). Des expériences d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) confirmèrent la forte proportion de *Methylophaga* spp. dans le biofilm (36-79 %) alors que *Hyphomicrobium* spp. ne représentait que 7-8 % de la population totale et n'apparaissait qu'après 22 jours de colonisation du biofilm (N. Labbé *et al.*, 2007). Les *Hyphomicrobium* spp. possédant une croissance lente, il n'est donc pas surprenant de ne détecter leur présence que tard dans la croissance du biofilm (Hirsch, 1989). Le FISH révéla également la présence d'eucaryotes, essentiellement des protistes, dans de fortes proportions dans les premiers jours de la colonisation du biofilm, mais diminuant en abondance relative avec le développement du biofilm (Laurin *et al.*, 2008). Auclair *et al.* (2011) détectèrent par PCR et séquençage la présence de plusieurs gènes liés à la dénitrification dont *narG*, *napA*, *nirK*, *nirS*, *cnorB* et *nosZ*. Certaines de ces séquences furent attribuées à *M. nitratorans* JAM1 et à *Hyphomicrobium nitratorans* NL23. Des essais de qPCR ciblant les gènes *narG1* et *narG2* appartenant à la souche JAM1 et le gène *napA* appartenant à la souche NL23 ont par la suite montré que les deux espèces étaient aussi abondantes l'une que l'autre dans le biofilm, malgré les résultats obtenus par FISH. Les conditions de cultures différentes dans les deux expériences pourraient expliquer les différences d'abondance observées entre les deux espèces. En effet, alors

que les qPCR ont été réalisées sur du biofilm issu de supports en libre suspension, le FISH fut réalisé à partir de lamelles qui étaient placées dans le haut du bioréacteur où la concentration en oxygène était supérieure. Quoiqu'il en soit, les autres gènes liés à la dénitrification étant retrouvés de 10 à 10000 fois moins dans le biofilm, il a été suggéré que les souches JAM1 et NL23 étaient les acteurs majeurs de la dénitrification dans le biofilm.

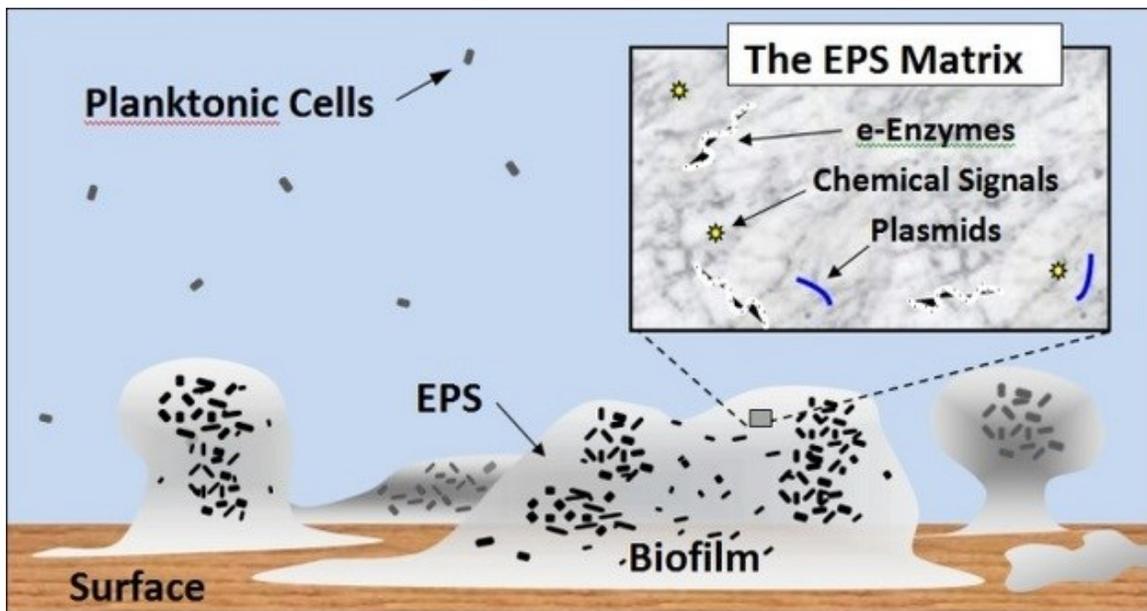


Figure 1.3 : représentation d'un biofilm en coupe.
Tiré de Ikuma (2013).

2. LA RÉDUCTION DU NITRATE

2.1 Généralités sur les nitrate réductases

La réduction du nitrate est la première étape de la dénitrification. Il existe plusieurs enzymes différentes qualifiées de nitrate réductases capable de faire cette réaction (Nar, Nap et Nas) et se composent de deux types différents : les nitrate réductases assimilatives et les nitrate réductases dissimilatoires ou respiratoires (Barton, 2005). Les premières permettent à la bactérie de puiser son azote à partir du nitrate qu'elle transforme en ammonium afin de l'incorporer dans ses différents constituants cellulaires. Les nitrate réductases dissimilatoires, quant à elles, sont associées à l'acquisition d'énergie (respiration anaérobie), la détoxification et la régulation redox du milieu. La réaction catalysée par ces enzymes est la suivante :



Comme la réaction de réduction n'entraîne le transfert que d'un atome d'oxygène, les nitrate réductases sont qualifiées de monooxygénases. Il a été démontré que les trois nitrate réductases pouvaient coexister chez certaines bactéries telles que *Alcaligenes eutropha* et *Paracoccus denitrificans* (Sears *et al.*, 1997, Warnecke-Eberz *et al.*, 1993). D'un point de vue constitutionnel, toutes les nitrate réductases ont en commun le fait qu'elles requièrent un cofacteur contenant du molybdène interagissant avec la molécule de nitrate (Moura *et al.*, 1997). Quand il est connu, ce cofacteur se présente souvent sous forme de dinucléotide guanine molybdoptérine (MGD). Toutes les nitrate réductases appartiennent à la famille des DMSOR (dimethyl sulfoxide reductase) qui possède la particularité d'avoir deux fractions de pyranoptérine maintenant l'atome de molybdène dans le site actif comme une pince (George *et al.*, 1999). Le molybdène permet alors l'échange d'électrons avec la molécule de nitrate pour la réaction de réduction avec un potentiel redox très élevé de +433 mV, facilitant grandement la réaction (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Bien qu'il ne soit pas rare de retrouver plusieurs nitrate réductases différentes chez une espèce bactérienne, il est en revanche plus exceptionnel de voir plusieurs fois le même type de nitrate réductase dans un génome. Parmi ces rares organismes, on peut citer *Escherichia coli* (deux Nar et un Nap), *Shewanella piezotolerans* (deux Nap) ou encore *Rhodobacter sphaeroides* (deux

Nap) (Bonnefoy *et al.*, 1994, Y. Chen *et al.*, 2011, Hartsock *et al.*, 2011). Chez toutes ces espèces, chaque nitrate réductase possède un rôle spécifique de l'autre nitrate réductase du même type. Plus de détails sur ces espèces seront fournis plus bas.

2.2 La nitrate réductase assimilative

Le nitrate ne peut être directement transformé en ammonium à des fins d'assimilation. Il est dans un premier temps réduit en nitrite, qui est à son tour réduit en ammonium. La nitrate réductase jouant ce rôle est qualifiée de nitrate réductase assimilative Nas (Figure 2.1.A). Les gènes et les enzymes responsables de la réduction assimilative du nitrate sont différents et distincts de ceux responsables de la réduction dissimilatoire du nitrate, bien que la réaction reste la même (Barton, 2005). De nombreux organismes possèdent ce trait, mais il a surtout été étudié chez la bactérie *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (Lin *et al.*, 1994). Les gènes codant pour cette enzyme sont regroupés dans l'opéron *nasFEDCBA*. L'ordre et la présence des différentes unités sont dépendantes des espèces ainsi que du rôle de chaque protéine Nas (Gonzalez *et al.*, 2006). *nasFED* codent pour un transporteur ABC classique de nitrate/nitrite homologue à celui du système de transport du nitrate *nrt* présent chez *Synechococcus* sp. souche PCC7942 (Omata *et al.*, 1993). *nasFED* est responsable d'acheminer le nitrate du périplasme au cytoplasme où a lieu la réduction en ammonium, localisation appropriée étant donné que la synthèse des biomolécules s'y déroule. *nasA* code pour la sous-unité catalytique de nitrate réductase mais ne contient pas le domaine de fixation du FAD ou NADH commun à toutes les nitrate réductases (Lin *et al.*, 1993). Elle est couplée à NasC, une petite sous-unité contenant le FAD, qui va jouer ce rôle. Ces deux gènes sont nécessaires pour avoir une activité de réduction du nitrate. Les électrons nécessaires à la réduction du nitrate proviendraient alors du NAD(P)H ou de la ferrédoxine (Van Spanning *et al.*, 2005). *nasB* code pour la nitrite réductase NADH-dépendante réduisant le nitrite en ammonium. Du point de vue de la régulation, le mécanisme d'assimilation se met en place lorsque les concentrations d'ammonium deviennent basses et que du nitrate est disponible dans le milieu. L'oxygène n'a aucun effet sur la régulation de cet opéron. La détection de ces conditions se fait par l'intermédiaire de systèmes globaux du contrôle du nitrate (NtrC) et de détecteurs spécifiques de nitrate/nitrite (Wu *et al.*, 1999).

2.3 La nitrate réductase périplasmique

La nitrate réductase périplasmique Nap est le premier type de nitrate réductase dissimilatoire que l'on retrouve chez les bactéries (Figure 2.1.B). Cette enzyme est liée à la membrane cytoplasmique de la cellule et tournée vers le périplasme (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Cette enzyme est généralement associée à la respiration anaérobie, bien que la validité de cette affirmation soit débattue. En effet, afin de produire de l'énergie, un gradient de protons doit se créer entre le périplasme et le cytoplasme. Le gradient électrochimique ainsi créé peut être exploité par les ATP synthases afin de créer de l'ATP. Le complexe receveur d'électron (Nap) et le donneur d'électron (*e.g.* formate déshydrogénase) se trouvant tous les deux dans le périplasme, aucun gradient de protons n'est créé lors de la réduction du nitrate en nitrite car les protons produits sont tout de suite consommés par réaction de réduction (Jepson *et al.*, 2007). Cependant, il a été montré qu'un tel gradient peut néanmoins se former si la réduction du nitrate est couplée avec l'oxydation du formate (Kern *et al.*, 2009). De manière générale, de nombreuses bactéries utilisent le système Nap afin de faire la respiration anaérobie du nitrate ou pour encourager la dénitrification. Nap a été isolée et purifiée pour la première fois chez *Paracoccus denitrificans* en 1993 et par la suite dans une grande variété de bactéries (Sears *et al.*, 1993, Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Cette enzyme est constituée de trois sous-unités NapABC dont les gènes sont compris dans un même opéron *napABC* (Richardson *et al.*, 2001). NapAB forme le complexe catalytique localisé dans le cytoplasme qui est associé avec NapC, protéine transmembranaire ancrée dans la membrane cytoplasmique. NapA est la sous-unité catalytique possédant un cluster [4Fe-4S] alors que NapB est un cytochrome c_{552} à dihème faisant le transfert des électrons jusqu'à NapA (Breton *et al.*, 1994). Des études structurales de NapA ont montré des différences au niveau du cycle catalytique de l'enzyme entre les bactéries *Desulfovibrio desulfuricans* et *Rhodobacter capsulatus* (Van Spanning *et al.*, 2005). Bien que cette différence puisse être due aux méthodes différentes utilisées dans les deux études, il se peut qu'il existe différentes façons de réaliser le cycle catalytique de l'enzyme, notamment au niveau de la coordination de l'oxygène du Mo pendant le cycle catalytique. NapC s'ancre dans la membrane cytoplasmique grâce à une hélice transmembranaire située en N-terminal avec quatre hèmes de type *c* (Roldán *et al.*, 1998). Son domaine périplasmique prend en charge le transfert des électrons provenant du pool de quinols situé dans la membrane jusqu'au

complexe catalytique NapAB (Cartron *et al.*, 2002). Les deux électrons nécessaires à la réduction du nitrate en nitrite sont transférés par le biais des hèmes présents chez NapB et du cluster [4Fe-4S] de NapA pour arriver au site catalytique avec bis-MGD de NapA, catalysant la réaction de réduction.

Excepté *Shewanella putrefaciens* et *Campylobacter jejuni*, toutes les bactéries possédant une nitrate réductase Nap ont en commun les gènes *napABCD* réunis dans un opéron (Van Spanning *et al.*, 2005). Ces deux bactéries ne possèdent pas de *napC*, mais étant donné le rôle primordial joué par NapC, il a été avancé qu'une autre protéine ayant des propriétés équivalentes et située autre part dans le génome devait être utilisée par ces bactéries. NapD, qui est conservée dans tous les opérons *nap*, a un rôle de chaperonne et participe à l'assemblage des différentes sous-unités (Potter *et al.*, 1999a). Par la suite, il est possible de retrouver différents gènes additionnels (*napKEFGH*) compris dans l'opéron *nap* mais leurs positions et leurs apparitions diffèrent selon les espèces (Van Spanning *et al.*, 2005). De plus, ces protéines ne semblent pas jouer de rôles essentiels dans la réduction du nitrate par Nap (Potter *et al.*, 1999a). Selon la combinaison des gènes présents dans l'opéron, on peut classer les opérons *nap* dans trois catégories. Dans la première, *napGH* est présent mais *napE* est absent. Les rôles sont inversés dans la deuxième catégorie où *napGH* est absent et *napE* présent. Finalement la troisième catégorie est définie par l'absence de ces gènes (Van Spanning *et al.*, 2005). Quoi qu'il en soit, il semble qu'il y ait une corrélation entre l'organisation de l'opéron et la physiologie de la bactérie et/ou même du devenir du nitrite produit (Potter *et al.*, 2001). Il a été avancé également que les gènes absents de l'opéron *nap* pourraient être remplacés par des gènes situés autre part dans le génome ayant une fonction similaire. La fonction de NapE et NapK reste inconnue à ce jour, ces deux gènes codant pour des protéines membranaires en petites hélices simples. Peu d'informations sont disponibles pour NapF et NapG également. NapF pourrait être localisée dans le cytoplasme, contrairement à NapG, qui semble être destinée au périplasma, car un signal de transport pour le périplasma est présent dans sa séquence. NapH est ancrée à la membrane avec ses extrémités C et N faisant face au cytoplasme. Elle possède les mêmes motifs que NapF et NapG sur son domaine C-terminal. Les caractéristiques structurales de NapGH suggèreraient un rôle dans l'oxydation de l'ubiquinol chez *E. coli* (Brondijk *et al.*, 2002). Les centres métalliques du complexe NapHGC fourniraient les deux électrons à NapAB grâce à l'oxydation de deux molécules du pool de quinole UQH₂ (ubiquinoles), ce qui a pour effet de transférer deux protons

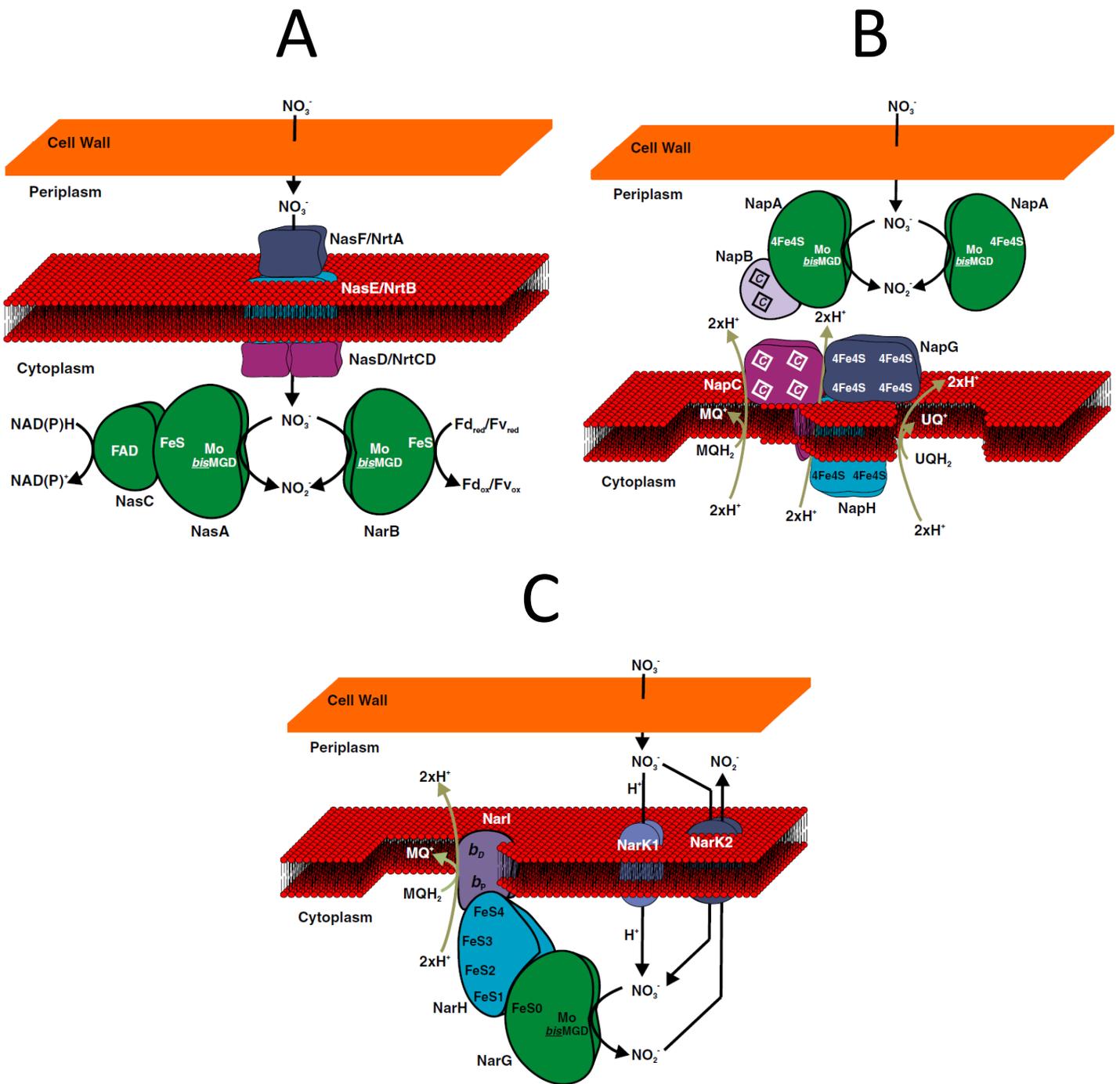


Figure 2.1 : Représentation des différentes sous-unités de (A) la nitrate réductase assimilative, (B) la nitrate réductase périplasmique et (C) la nitrate réductase membranaire. Modifié de Gonzalez *et al.* (2006)

H⁺ du cytoplasme vers le périplasme (Gonzalez *et al.*, 2006). De plus, le transfert d'électrons entre NapG et NapC entrainerait également le transfert de deux protons du cytoplasme vers le périplasme, pour un total de quatre protons transférés (Brondijk *et al.*, 2004). Ainsi la réduction d'une molécule de nitrate par Nap contribuerait quand même à l'établissement du gradient de proton malgré les deux protons consommés par Nap pour la réduction du nitrate. Une deuxième voie possible serait que le transfert d'électrons vers NapAB ne serait pris en charge que par NapC chez les organismes ne possédant ni NapG ni NapH. Cependant, les électrons fournis proviendraient du pool de MQH₂ (menaquinols) car Nap est incapable d'utiliser UQH₂ (Brondijk *et al.*, 2004). Dans ce cas-ci, seuls deux protons sont transférés dans le périplasme et consommés pour la réaction de réduction, ne produisant aucun gradient de protons. Les organismes concernés utilisent alors la réduction du nitrate pour consommer des électrons et réduire une potentielle accumulation dans le cytoplasme d'équivalents de réduction comme le NADH et le FADH₂ (Gonzalez *et al.*, 2006).

2.4 La nitrate réductase membranaire

La nitrate réductase membranaire Nar est ancrée dans la membrane cytoplasmique comme Nap, mais son site actif est tourné vers le cytoplasme (Figure 2.1.C). Nar est composée de trois sous-unités, NarGHI (Ballard *et al.*, 1988). NarI est la sous-unité γ transmembranaire, ancrée à la membrane avec son extrémité N-terminal faisant face au périplasme. Sur cette partie se trouve le centre *hème* b_i de faible potentiel énergétique (Rothery *et al.*, 1999). C'est par le centre *hème* b_i que Nar reçoit les électrons du pool de quinol présent dans la membrane, ce qui est caractéristique des mécanismes de transfert d'électrons de la respiration. L'oxydation de la quinol dans le site périplasmique de NarI entraîne le transfert de deux électrons de l'hème b_i jusqu'à un deuxième hème, b_h , situé du côté cytoplasme de NarI et qui possède un haut potentiel énergétique. Ces deux hèmes b forment un plan orthogonal à la membrane et sont intégrés à NarI avec des résidus histidines (Berks *et al.*, 1995). Pendant le transfert des électrons, deux protons sont également libérés dans le périplasme, contribuant à la création d'un gradient de protons au travers de la membrane et faisant de Nar une enzyme électrogénique. NarG et NarH forment respectivement la sous-unité catalytique α et la sous-unité β (Ballard *et al.*, 1988). Le complexe NarGH se situe dans le

cytoplasme et est relié à NarI par l'extrémité C-terminal de NarH. Cette dernière possède un centre fer-soufre [3Fe-4S] et trois centres [4Fe-4S] qui lui permettent de faire le transfert des électrons donnés par NarI jusqu'à NarG, qui possède également quatre domaines fer-soufre de type α - β . La sous-unité catalytique contient le cofacteur molybdoptérine bis-MGD qui joue le rôle de centre catalytique, permettant le transfert final des électrons vers le nitrate pour le réduire en nitrite. Le mécanisme de transfert des deux électrons catalysé par le molybdène a été déduit des observations faites avec Nap (Van Spanning *et al.*, 2005). Il est suggéré que la structure du centre bis-MGD fasse des cycles entre l'état mono-oxo Mo(IV) et des-oxo Mo(V) pendant la réaction.

Nar est codée par l'opéron *narGHJI*, commun et conservé dans la quasi-totalité des espèces possédant cette enzyme. NarJ est une protéine chaperonne qui est nécessaire au bon assemblage et à la maturation de Nar. *E. coli* possède deux nitrate réductases membranaires Nar encodées dans les opérons *narGHJI* (NRA) et *narZYWV* (NRZ) (Bonney *et al.*, 1994). Bien que de nombreuses espèces bactériennes possèdent plusieurs nitrate réductases différentes (*Paracoccus denitrificans*, *Alcaligenes eutrophus*, *Klebsiella pneumoniae*, etc), posséder deux copies de la même nitrate réductase est un cas très particulier parmi les microorganismes. Les deux Nar présentes chez *E. coli* ont une structure et des propriétés biochimiques très similaires mais également une très haute homologie de séquences (Blasco *et al.*, 1990). Les deux enzymes sont en tous points similaires d'un point de vue réactionnel et utilise le même substrat. Il est également possible d'obtenir une enzyme fonctionnelle avec un opéron formé de sous-unités provenant de NRA et de NRZ (Blasco *et al.*, 1992). La différence majeure entre NRA et NRZ se situe au niveau de l'expression de leurs gènes relatifs. NRZ ne semble pas être régulée par les régulateurs communs des nitrate réductases contrairement à NRA. Son expression semble se faire de manière constitutive et à un niveau bien plus faible que NRA. Une explication possible serait que NRZ aiderait la bactérie à s'adapter à des conditions anaérobies lors d'un passage d'un milieu avec oxygène à un milieu sans oxygène.

D'autres gènes sont retrouvés très fréquemment autour des opérons *nar* ou même inclus dans l'opéron. *narXL* est souvent présent chez les bactéries dénitrifiantes, que ce soit en amont de *narGHJI* (*E. coli*, *Pseudomonas* spp.) ou en aval (*Ralstonia solanacearum*) (Van Spanning *et al.*, 2005). Ces gènes codent pour un système à deux composants de détection du nitrate qui intervient dans la régulation de différents gènes

liés à la dénitrification. Des transporteurs de nitrate et nitrite, tel que *narK*, se retrouvent également à proximité des opérons *nar*. Les transporteurs sont traités plus en détails plus loin.

Malgré la catalyse de la même réaction, il existe des différences entre Nar et Nap, découlant de leurs caractéristiques structurales et leurs localisations propres. Théoriquement, les deux enzymes contribuent de la même manière à la création d'un gradient de proton (quand cela est possible dans le cas de Nap). Pourtant, Nap est considérée comme moins productrice d'ATP que Nar. Cependant, cette déficience pourrait être compensée par la plus grande affinité de Nap pour le nitrate ainsi que par la variété de sous-unités supplémentaires associées à Nap pouvant être présentes dans le génome (Potter *et al.*, 2001). *E. coli* possède une nitrate réductase périplasmique Nap en plus de ses deux nitrate réductases membranaires (NRA et NRZ). Bien qu'ayant une efficacité similaire, NRA (nitrate réductase considérée comme principale chez *E. coli*) et Nap ont toutefois une affinité très différente pour le nitrate (Potter *et al.*, 1999b). En effet, la souche mutante n'exprimant que Nap possède un K_s (constante d'affinité) de 15 μM contre 50 μM pour la souche n'exprimant que NRA. Il a été conclu que Nap était principalement responsable de la réduction du nitrate dans les conditions de faibles concentrations de nitrate alors que NRA est la nitrate réductase la plus rapide et efficace quand le nitrate est présent en excès. Il existe également des différences au niveau du substrat entre les deux enzymes. En effet, Nap est totalement spécifique au nitrate alors que Nar peut réduire le nitrate mais également le chlorate et le bromate. Cette spécificité pour son substrat moins grande de Nar fait que l'enzyme peut être inhibée par compétition par les azotures alors que Nap y est insensible. Cette propriété démontre les différences structurales entre les deux enzymes et pourraient être dues à la présence d'une sérine chez Nar jouant le rôle de ligand à l'atome de molybdène alors que Nap possède une cystéine (Potter *et al.*, 2001).

2.5 Le transport du nitrate

Le nitrate et le nitrite se retrouvent sous forme ionisée dans les milieux aqueux et possèdent donc une charge qui les empêche de traverser facilement les membranes des cellules (Moir *et al.*, 2001). Or, si la réduction du nitrite jusqu'en azote gazeux se passe dans le périplasma, la réduction du nitrate en nitrite par la nitrate réductase membranaire Nar ou la nitrate réductase assimilatrice Nas a lieu dans le cytoplasme. Les bactéries assimilant le nitrate ou possédant un système Nar sont donc obligées de transporter activement le nitrate à l'intérieur des cellules. De même, le nitrite produit par la réduction du nitrate doit être activement relâché dans le périplasma où il pourra être réduit. John (1977) a mis en évidence cette nécessité en montrant que la nitrate réductase purifiée de *E. coli* et *P. denitrificans* réduisait le nitrate et le chlorate, alors que des cultures de ces bactéries n'étaient capables de réduire que le nitrate, le chlorate n'étant pas importé par la bactérie. Énergétiquement, l'import du nitrate dans la cellule est défavorable car il doit se faire contre le gradient électrochimique de protons présent dans la membrane bactérienne (Moir *et al.*, 2001). Différents systèmes de transports du nitrate se sont donc développés chez les bactéries, dépendamment du type de nitrate réductase.

Chez les bactéries assimilatrices de nitrate, la dépense d'énergie pour le transport du nitrate n'est pas un problème, car l'unique but de la réaction est l'assimilation de l'azote dans l'organisme. Comme cité précédemment, NasFED est un transporteur de type ABC utilisant l'ATP comme source d'énergie afin de transférer les molécules de nitrate (et nitrite) à travers la membrane. Ce transporteur a été mis en évidence chez *Klebsiella oxytoca* mais est également codé par l'opéron *nrtABCD* chez *Synechococcus* sp. PCC7942 (Omata *et al.*, 1993, Wu *et al.*, 1998). Dans le périplasma, le nitrate est pris en charge par NasF (ou NrtA), qui a une forte affinité pour le nitrate, permettant son transport à travers le transporteur ABC. Cependant, ces sous-unités ne sont pas nécessaires pour le passage du nitrate. Une grande concentration de nitrate dans le milieu suffit pour permettre son transport par simple phénomène de diffusion. Ces sous-unités ne deviennent essentielles que pour les faibles concentrations de nitrate, grâce à leur haute affinité (Omata *et al.*, 1993, Wu *et al.*, 1998). *nasE* (ou *nrtB*) code pour la partie membranaire de l'enzyme comportant les pores permettant au nitrate et au nitrite de passer la membrane. Finalement, la partie liant l'ATP dans le cytoplasme est constituée d'un homodimère de NasD ou d'un hétérodimère de NrtC et NrtD.

Pour leurs parts, les bactéries possédant un système Nar ne pourraient se permettre une dépense énergétique dans le transport du nitrate (Figure 2.1.C). En effet, le but de la respiration sur le nitrate étant la création d'énergie, une dépense d'énergie rendrait le processus non optimal. Elles utilisent dans ce cas des transporteurs de type antiporteur nitrate/nitrite qui ont un effet électroneutre sur la cellule en compensant l'import d'une molécule de nitrate par l'export d'une molécule de nitrite (Rowe *et al.*, 1994). En plus de permettre le transport du nitrate, ce type de transporteur permet la relocalisation du nitrite dans le périplasma afin qu'il soit subséquentement réduit pour la dénitrification (ou l'assimilation chez certaines bactéries comme *E. coli*) ou afin de réduire les concentrations cytoplasmiques de nitrite pouvant devenir toxiques pour la cellule. Un autre type de transporteur de nitrate est le symporteur nitrate/H⁺ (Moir *et al.*, 2001). Un proton est transporté du périplasma au cytoplasme en même temps qu'une molécule de nitrate, ce qui permet de conserver une charge globale neutre. L'existence de ces deux types de transporteurs de nitrate a été mise en évidence chez *Paracoccus denitrificans*, mettant également en avant leurs utilités propres au sein d'un même organisme (Boogerd *et al.*, 1983). Le symporteur n'ayant pas besoin de la présence de nitrite pour fonctionner, il joue le rôle d'initiateur du transport dans la mise en place de la réduction du nitrate. Dès que du nitrite est produit, l'antiporteur peut prendre le relais ou compléter l'action du symporteur. Cependant, ce fonctionnement a été remis en cause avec la découverte d'un transporteur fusionné, montrant qu'un symporteur n'est pas nécessaire au démarrage de l'import du nitrate et que chaque transporteur peut changer son mode de fonctionnement en fonction des conditions environnantes (Goddard *et al.*, 2008).

Les transporteurs de nitrate cités précédemment appartiennent à la famille des NarK, protéines membres des transporteurs transmembranaires de type MFS et plus précisément le cluster 6 de cette famille (Major Facilitator Superfamily). Deux sous-types de NarK existent également, le type I et le type II (Moir *et al.*, 2001). Ces deux types se différencient par leurs affiliations phylogénétiques, formant deux groupes distincts. L'hypothèse avancée est que le type I serait responsable de l'absorption du nitrate alors que le type II se chargerait de l'extrusion du nitrite. Plusieurs NarK peuvent être retrouvés chez les bactéries et de nombreux homologues existent. De plus, au moins un gène *narK* est systématiquement retrouvé en amont de l'opéron *narGHJ* chez toutes les bactéries dénitrifiantes étudiées jusqu'à présent. Chez *Paracoccus denitrificans*, un transporteur est exprimé comme la fusion de 2 transporteurs différents NarK1 et NarK2

(Goddard *et al.*, 2008). NarK1 apparaît comme un symporteur nitrate/H⁺ alors que NarK2 serait plutôt un antiporteur nitrate/nitrite. Bien que fusionnée, les deux parties semblent être indépendantes l'une de l'autre, fonctionnant séparément et ayant des affinités pour le nitrate spécifiques à chacune. Cette fusion pourrait faciliter la régulation et l'activité de chaque type de transport.

On ne connaît pas précisément la structure ni le mode de fonctionnement des transporteurs NarK. Ils sont majoritairement constitués d'hélices transmembranaires, douze au total dont deux apparaissant comme moins hydrophobes que les autres du fait de résidus arginines présent dans leur structure (Moir *et al.*, 2001). Ces deux résidus arginine sont très conservés chez toutes les protéines du cluster 6 des MFS, qui inclut les NarK et les transporteurs de nitrate des plantes et champignons. Plusieurs autres acides aminés sont conservés dans cette structure et les prédictions indiquent que les extrémités C- et N-terminal du transporteur se trouveraient dans le cytoplasme. *E. coli*, une des bactéries les plus étudiées pour le transport du nitrate, possède deux gènes codant pour des transporteurs de nitrate, *narK* et *narU* codant pour un homologue (Jia *et al.*, 2005). Ces deux protéines partagent 76% d'identité et sont toutes les deux capables de transporter le nitrate et le nitrite. La structure complète et un mode de fonctionnement de NarU furent proposés récemment (Yan *et al.*, 2013). Le transporteur suivrait le modèle « rocker-switch » (Law *et al.*, 2008) suivant lequel un accès alterné au périplasme et au cytoplasme est opéré par une rotation du domaine N-terminal par rapport au domaine C-terminal. Ce mouvement permettrait l'ouverture progressive d'un canal transportant le nitrate après que celui-ci se soit spécifiquement lié au transporteur. Le même type de mécanisme a été mis en évidence pour NarK (Fukuda *et al.*, 2015).

2.6 Le système de régulation des nitrate réductases

La réduction du nitrate est une réaction secondaire, un mode de respiration alternatif généralement utilisé par les bactéries seulement quand cela est nécessaire, c'est-à-dire quand il n'y a pas ou peu d'oxygène dans le milieu et présence de nitrate. Les bactéries sont donc obligées de réguler leurs systèmes de réduction du nitrate afin de maximiser l'énergie produite par la respiration. L'oxygène et les oxydes d'azote apparaissent très logiquement comme les régulateurs majoritaires de ce système. Le

système de régulation des nitrate réductases le plus étudié et connu reste celui d'*E. coli*. C'est donc celui-ci qui sera présenté majoritairement dans ce texte. D'autres bactéries ont aussi été très étudiées pour leurs système de régulation des nitrate réductases, telle que *Pseudomonas aeruginosa* (Schreiber *et al.*, 2007) (Figure 2.2).

La détection du nitrate par la bactérie se fait à l'aide d'un système à deux composantes. Les systèmes à deux composants sont souvent présents chez les bactéries dans le but de répondre à des facteurs environnementaux. Chez *E. coli*, ce système à deux composantes est représenté par NarXL ainsi que NarQP, homologue de NarXL (Rabin *et al.*, 1993, Stewart *et al.*, 1989). NarX et NarQ jouent le rôle de détecteur de nitrate et nitrite alors que NarL et NarP possèdent le rôle de régulateur. Cependant, ces systèmes ne régulent pas les mêmes gènes. Certains gènes répondent à NarL et d'autres à NarL et NarP. D'une manière générale, ces systèmes régulent positivement les opérons *narGHJI*, les différents *narK* et l'opéron *fdnGHI* (formate dehydrogenase-N) mais répriment les opérons *frdABCD* (fumarate reductase) et *dmsABC* (triméthylamine N-oxide reductase) et le gène *adhE* (alcohol dehydrogenase) (Zumft, 1997). NarX (ou NarQ) est une protéine transmembranaire avec un domaine périplasmique conservé qui reconnaît la molécule de nitrate (S. B. Williams *et al.*, 1997). Au repos, NarX est dans une conformation empêchant l'activité autokinase ainsi que le transfert phosphorylé vers l'Asp59 de NarL. En présence de nitrate, NarX adopte une conformation différente et permet l'activité autokinase et la phosphorylation de NarL. C'est cet état phosphorylé de NarL qui permet l'activation de gènes sous le contrôle de NarXL. La façon dont le nitrate se lie à NarX n'est toujours pas connue. Grâce à l'étude d'autres protéines liant le nitrate, notamment l'hémocyanine de *Limulus polyphemus* et la tyrosine phosphatase de *Yersinia enterocolitica*, il est supposé que le nitrate se lie aux atomes d'oxygène d'un résidu arginine de NarX par des ponts hydrogène (Fauman *et al.*, 1996, Hazes *et al.*, 1996). D'autres ponts hydrogènes pourraient partir d'un oxygène du nitrate pour se lier à un autre résidu du détecteur NarX. Ce modèle suggérerait que les liaisons hydrogènes entre NarX et la molécule de nitrate puissent se faire sans avoir recours à un métal de transition dans NarX. NarL est composé de deux domaines respectifs, un domaine receveur permettant de faire le lien avec NarX et un domaine se liant à l'ADN afin d'activer la transcription (Baikalov *et al.*, 1996). Le premier domaine se situe en N-terminal et sa structure est très similaire au domaine correspondant au régulateur de chimiotaxie CheY et de NtrC, un régulateur de l'azote. Ce domaine comporte le résidu Asp59 permettant le transfert du groupement phosphorylé provenant de NarX et le

changement de la conformation de la protéine. Non phosphorylée, NarL possède une conformation présentant un repliement de son domaine liant l'ADN situé en C-terminal, qui est inactif et ne peut se lier à l'ADN. Ce n'est que lors de la phosphorylation de la protéine que ce domaine devient accessible et permet à NarL de se lier à sa séquence cible d'ADN. Cette séquence se compose en heptamère, c'est-à-dire l'enchaînement précis de sept acides nucléiques différents. Chez *E. coli*, cette séquence est définie par T-A-C-Y-N-M-T avec Y pouvant être un C ou un T, M un A ou un C et N n'importe quel nucléotide (Tyson *et al.*, 1994). Cette séquence peut légèrement varier mais est plutôt bien conservée parmi les différentes espèces dénitrifiantes. Ces séquences en heptamère sont situées en amont de plusieurs gènes liés à la dénitrification autre que les nitrate réductases (Zumft, 1997). Ces séquences ne semblent toutefois pas actives. De manière générale, les séquences de liaison NarL se retrouvent en plusieurs copies, dans le même sens ou antisens. L'espace qui les sépare peut également être plus ou moins grand selon le gène et l'espèce. En amont du *narG* de *E. coli*, on peut retrouver un groupe de cinq heptamères et un groupe de trois heptamères à différentes positions. On y retrouve également un site de liaison d'un autre type de régulateur, les FNR.

Les protéines de la famille des FNR (Fumarate Nitrate reduction Regulator) sont des régulateurs et détecteurs d'oxygène (Mazoch *et al.*, 2002). Ils sont utilisés par les bactéries qui sont amenées à passer de milieux riches en oxygène à des milieux pauvres en oxygène, en activant de nombreux gènes et en désactivant d'autres. Les nitrate réductases sont donc logiquement régulées par ce type de régulateurs. Ceux-ci furent également découverts et étudiés chez *E. coli* puis retrouvés dans la majorité des espèces dénitrifiantes par la suite, appartenant pour la plupart à l'embranchement des protéobactéries (Mazoch *et al.*, 2002). Sa structure est proche de celle de CRP, protéine réceptrice de cAMP qui joue le rôle d'activateur catabolique. Le site de fixation des FNR est une séquence palindromique TTGAT-N4-ATCAA, généralement située entre la position -40 et -50 (-41.5 chez *narGHJ* de *E. coli*) en amont du site de démarrage de la transcription. Des distances plus grandes sont toutefois possibles avec des réarrangements topologiques de l'ARN polymérase et de la protéine FNR (Wing *et al.*, 1995). Ce motif est communément appelé « FNR box ». Selon la localisation de ce motif, les protéines FNR peuvent agir en tant qu'activateur ou de répresseur. Ces régulateurs présentent des variations dans leurs fonctions et leurs structures et sont groupés dans différentes classes (Guest *et al.*, 1996). La protéine prototype est le FNR de *E. coli* car elle fut découverte en premier. Il forme le premier groupe avec d'autres

protéines telles que FnrA, FnrL et FnrP. Ce premier groupe est divisé en 2 classes, IA et IB, en fonctions de l'espacement entre les cystéines retrouvées en N-terminal. Un deuxième groupe (classe IC) représenté par la protéine FixK de *Bacillus subtilis* est formé des FNR ne possédant pas de cluster cystéine en C-terminal (Ramos *et al.*, 1995). *P. aeruginosa* possède un homologue (51% d'homologie) à la protéine FNR de *E. coli* nommée ANR (Sawers, 1991). Elle fut nommée ainsi car elle possède un rôle dans le catabolisme de l'arginine en plus de la réduction du nitrate et qu'aucune respiration sur le fumarate n'est possible chez *P. aeruginosa*. De plus, ANR contrôle toute les étapes de la dénitrification et semble même être un régulateur global du métabolisme anaérobie de *P. aeruginosa* (Ye *et al.*, 1995). La découverte de plusieurs homologues de FNR et ANR dans diverses pseudomonades et autres espèces dénitrifiantes suggèrent que la régulation des processus anaérobiques est plus complexe et ne dépend pas d'un régulateur de type FNR (Zumft, 1997).

On retrouve également des motifs de liaisons NarL et FNR en amont des gènes *narK* codant pour les transporteurs de nitrate (Moir *et al.*, 2001). Chez *E. coli*, il y a un site de liaison NarL et un site de liaison FNR dans la région promotrice de *narK*. Zumft (1997) met également en avant la régulation potentielle des nitrate réductases par différents métaux tels que le fer (Fe) et le molybdène (Mo). En effet, lorsque le milieu devient anaérobie, les bactéries ont besoin de synthétiser un grand nombre d'enzymes dont les nitrate réductases et des cytochromes transférant les électrons. Tel que vu précédemment, ces enzymes sont riches en fer du fait de la présence de nombreux hèmes [4Fe-4S] ou [3Fe-4S] et d'un centre catalytique constitué autour d'un atome de molybdène. ModE est une protéine détectant le molybdène dans le milieu et un répresseur connu de l'opéron *modABCD* codant pour un transporteur du molybdène dans la cellule. Il a été démontré que ModE est également un élément essentiel à la transcription de l'opéron *nar* de *E. coli* (Self *et al.*, 1999). Cette protéine agirait sur la régulation en venant se lier à une région intergénique *narXL-narK*. Finalement, un élément supplémentaire est également nécessaire pour réguler l'activité de *nar*, il s'agit de IHF (Integration Host Factor) (Rabin *et al.*, 1992). Cet élément, qui a également été décrit chez *P. aeruginosa* (Schreiber *et al.*, 2007), reconnaît une séquence se situant entre les motifs de liaison en heptamère de NarL et permet un repliement de l'ADN à cet endroit. Ce repliement a pour conséquences de mettre en contact NarL, le facteur de transcription FNR et la polymérase afin de permettre la transcription (Zhang *et al.*, 1996).

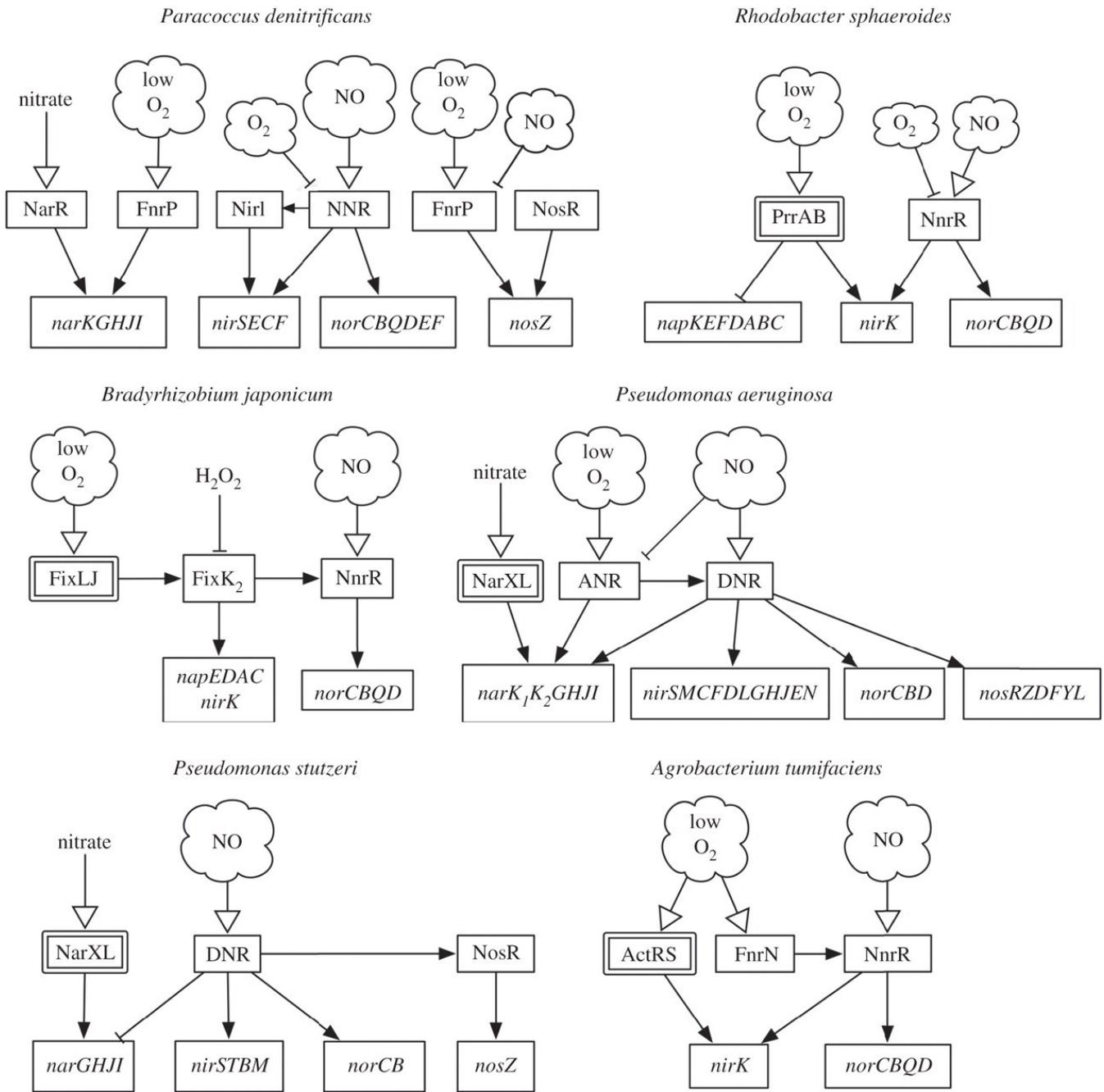


Figure 2.2 : schémas du système de régulation des gènes associés à la dénitrification chez plusieurs espèces bactériennes différentes.
Tiré de Spiro (2012).

3. LA RÉDUCTION DU NITRITE EN N₂

3.1 La réduction du nitrite

Il existe deux types de nitrite réductases intervenant dans la dénitrification : le cytochrome *cd₁* constitué de tétrahèmes et codé par le gène *nirS*, et CuNIR possédant un atome de cuivre comme dans son centre catalytique et codé par le gène *nirK* (Castiglione *et al.*, 2012, Zumft, 1997). Le cytochrome *cd₁* se retrouve dans les trois quarts des espèces bactériennes réduisant le nitrite et notamment chez les pseudomonades (Bothe *et al.*, 2006). On retrouve ces deux nitrite réductases chez toutes les sous-classes des protéobactéries, sans aucune exclusivité d'un type de nitrite réductase pour une sous-classe particulière (Zumft, 1992). Bien que les deux types de nitrite réductases ne sont jamais retrouvés ensemble dans la même espèce bactérienne, il est possible d'interchanger un type de nitrite réductase pour l'autre. En effet, chez une *Pseudomonas stutzeri* ne possédant plus son cytochrome *cd₁* d'origine, l'activité de dénitrification a été rétablie en introduisant un *nirK* (CuNIR) de *P. aureofaciens* (Glockner *et al.*, 1993).

Les centres cuivre Cu(II) des CuNIR sont classés dans trois groupes différents selon leurs propriétés optiques et leurs propriétés de résonance paramagnétiques d'électrons (EPR) : le type 1 (bleu), le type 2 (non bleu) et le type 3 (binucléaire et EPR-inactif) (Malkin *et al.*, 1970). Les nombreuses CuNIR isolées de différentes espèces bactériennes présentent de nombreuses différences dans leurs propriétés d'absorbance, leurs masses moléculaires ou encore leurs activités catalytiques. Malgré cette apparente hétérogénéité, les structures aux rayons X confirment l'appartenance à la même famille de toutes ces enzymes. Ces structures ont également démontré que CuNIR est une enzyme trimérique (Grossmann *et al.*, 1993). La structure tridimensionnelle de CuNIR fut résolue pour la première fois chez *Achromobacter cycloclastes*, montrant l'association de 3 sous-unités associées autour d'un axe et formant un canal central (Adman *et al.*, 1995). *In vitro*, CuNIR transforme le nitrite en NO en utilisant le phenazine methosulfate plus ascorbate (PMS-asc) comme donneur d'électron. Elle peut également former de l'ammoniaque et du N₂O lors de cette réaction. Certaines CuNIR sont également capables de former du N₂O en associant une molécule de nitrite et d'hydroxylamine et certaines CuNIR sont même capables de réduire l'O₂ (Zumft, 1997). Au niveau de la

structure, ce sont les centres cuivres de type 2 qui ont le rôle et la capacité de lier le substrat dans la réaction de réduction. Afin de réaliser cela, une molécule d'eau est déplacée du centre cuivre de type 2 et la molécule de nitrite peut alors entrer et se lier à l'atome de Cu à l'aide de ses atomes d'oxygène (Howes *et al.*, 1994). Les centres cuivre de type 1, quant à eux, ont pour rôle d'accepter les électrons entrant dans l'enzyme et de les transférer aux Cu de type 2 (Suzuki *et al.*, 1994). Les donneurs d'électrons principaux des CuNIR sont l'azurine et la pseudoazurine. Les cytochromes ne semblent pas être impliqués fréquemment dans cette réaction. Le potentiel redox de ces enzymes va dépendre de leurs compositions en centres cuivre de type 1 et de type 2. Pour *Achromobacter xylosoxidans*, il est de +260 mV à pH 7.2 (Masuko *et al.*, 1984).

Le cytochrome *cd₁* le plus connu et majoritairement étudié est celui de *P. aeruginosa* (Horio *et al.*, 1961). Il fut initialement décrit comme un cytochrome oxydase et c'est une des enzymes liée à la dénitrification les plus étudiées dans le monde. Le cytochrome *cd₁* peut également réduire l'oxygène afin de permettre la respiration chez *Roseobacter denitrificans* (Bothe *et al.*, 2006). Toutefois, la réaction est 100 fois plus lente que la réduction du nitrite. L'enzyme est un homodimère dont les sous-unités sont constituées de deux hèmes, C et D₁, faisant du cytochrome *cd₁* un tétrahème. La structure du cristal du cytochrome *cd₁* d'une *Paracoccus* sp. révéla une formation en hélice α du domaine de l'hème C alors que le domaine de l'hème D₁ adopte une structure en hélice β (Fülöp *et al.*, 1995). Le degré de conservation de NirS est élevé chez les différents genres bactériens le possédant, regroupant toutes ces protéines dans une famille unique (Zumft, 1997). Le potentiel redox du cytochrome *cd₁* varie d'une espèce à une autre et est dépendant des interactions entre les hèmes C et D₁ (Silvestrini *et al.*, 1992). Il est de +290 mV chez *P. aeruginosa*. Les donneurs d'électrons de cette enzyme sont spécifiquement l'azurine et le cytochrome *c₅₅₁*, ce dernier étant un meilleur donneur d'électrons que l'azurine (Silvestrini *et al.*, 1982). Comme pour CuNIR, du N₂O peut être formé par l'activité du cytochrome *cd₁* en bien moindre quantité que le NO et pourrait être causé par la dimérisation d'un nitroxyl (Garber *et al.*, 1982). Le cytochrome *cd₁* peut également entraîner la nitrosation de l'hydroxylamine, de l'azide et des amines (Zumft, 1997). La synthèse de cette enzyme est fortement régulée en amont par la régulation de gènes codant pour la synthèse de ses différents constituants (*hemA*, *hemN*, *nirSMCFDLGHEN*) avec des combinaisons variantes selon l'espèce. Cependant, de manière générale, les régulateurs intervenant dans la régulation du cytochrome *cd₁* et de CuNIR sont ANR/FNR et NarL.

Il existe d'autres nitrite réductases, qui ne s'incluent pas dans le mécanisme de dénitrification car elles sont responsables de la réduction du nitrite en ammonium (Castiglione *et al.*, 2012). Elles sont également divisées en deux catégories : la nitrite réductase à multihème NrfA et la nitrite réductase à NAD(P)H NirBD. Seule la première enzyme est dite dissimilatoire, car elle contribue à la création d'un gradient de protons, et donc à la création d'énergie (Stewart, 1993). NrfA, aussi désignée par cytochrome c_{552} , est un cytochrome à pentahèmes présent dans le périplasme chez *E. coli*. Elle est codée par un opéron comprenant sept gènes, *nrfABCDEFG*, dont seul *nrfA* code pour l'enzyme (Hussain *et al.*, 1994). Toutefois, l'organisation des gènes ainsi que la composition de l'opéron peut varier selon l'espèce (Einsle, 2011). Les gènes autres que *nrfA* sont indispensables pour l'activité de l'enzyme et ont un rôle dans le transfert des électrons jusqu'à NrfA ou dans la synthèse de cytochromes requis pour la réaction de réduction. Certaines bactéries possèdent le gène *nrfH* inclus dans l'opéron *nrfABCDEFG*, également impliqué dans le transfert d'électrons jusqu'à NrfA (Einsle *et al.*, 2000). Le donneur d'électrons le plus probable est le formate et dans de nombreuses entérobactéries, cette enzyme est liée au pool de ménaquinole (Einsle, 2011). L'enzyme est également capable de réduire le NO, le N₂O et les hydroxylamines mais surtout les sulfites, créant ainsi un lien entre le cycle de l'azote et celui du soufre. NrfA forme un homodimère, les hèmes parallèles et perpendiculaires de chaque unité se retrouvant proches les uns des autres et paquetés ensemble (Bamford *et al.*, 2002). De par sa localisation et son fonctionnement, le principal rôle attribué à NrfA est la production d'énergie. Cependant, elle pourrait également jouer un rôle dans l'assimilation de l'azote par la cellule, l'ammonium pouvant être importé dans le cytoplasme pour être assimilé (Cole, 1982). Des rôles dans la détoxification et la réduction des sulfites ont également été envisagés. Pour NirBD, la détoxification et l'assimilation de l'azote sont les rôles qui lui sont principalement attribués. En effet, c'est une enzyme cytoplasmique utilisant le NADH comme donneur d'électrons afin de réduire le nitrite en ammonium, ne générant aucun gradient énergétique de protons (Cole, 1978). Il est aussi possible qu'elle soit utilisée afin de régénérer le pool de NAD⁺ dans la cellule. L'enzyme est composée de deux polypeptides : une grande sous-unité catalytique codée par *nirB* et une petite sous-unité codée par *nirC* (Bothe *et al.*, 2006). Ces deux nitrite réductases ne sont synthétisées que dans les cellules ayant poussé en absence d'oxygène car sous le contrôle des régulateurs FNR. Le nitrite est aussi un activateur de la transcription de NrfA (Page *et al.*, 1990). Le rôle de NirBD étant

principalement de détoxifier le nitrite issu de la réduction du nitrate, généralement par Nar, elle se doit d'être active en même temps et sa transcription est aussi activée par la présence de nitrate par le biais du régulateur NarL chez les entérobactéries. Quand il est produit dans le cytoplasme et non réduit en ammonium, le nitrite est exporté dans le périplasma grâce aux antiporteurs nitrate/nitrite tels que décrits plus haut. Mais il est possible que la bactérie ait besoin d'importer le nitrite dans le cytoplasme afin de le réduire en ammonium pour l'assimilation (Moir *et al.*, 2001). Chez *E. coli*, le nitrite est importé dans la cellule via la protéine NirC, un transporteur bidirectionnel spécifique au nitrite.

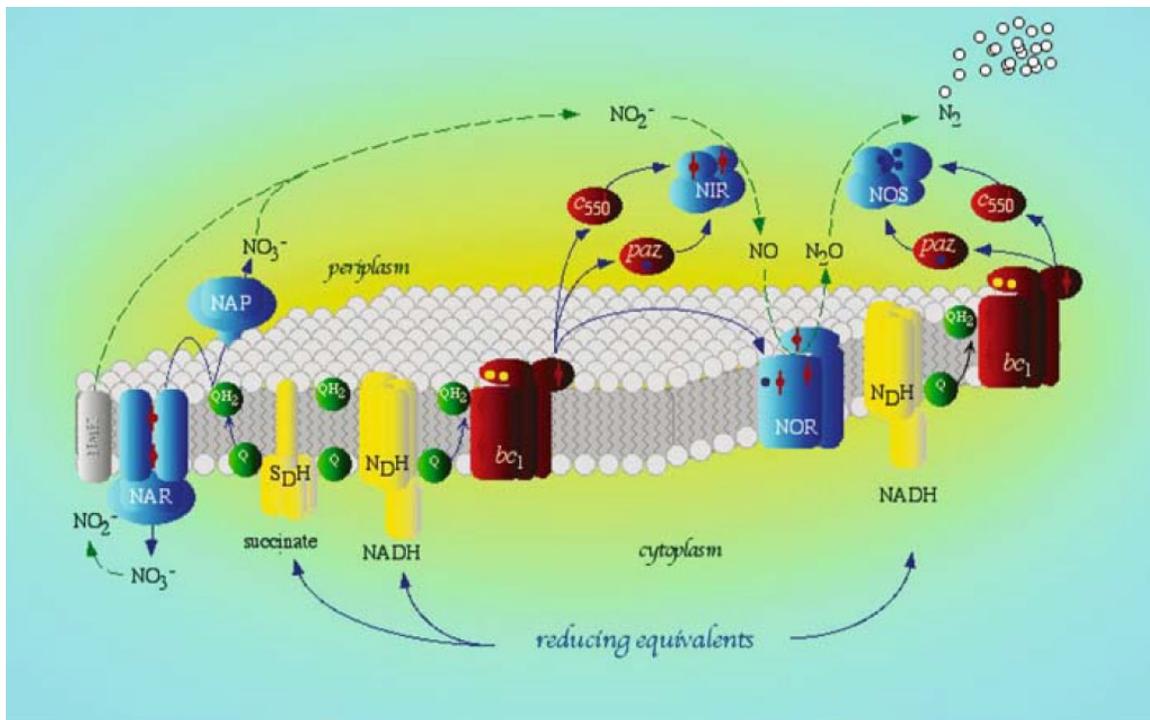


Figure 3.1 : Schéma du processus de dénitrification complet de *Paracoccus denitrificans*. Les lignes en pointillés représentent le mouvement des oxydes d'azote. Les lignes pleines représentent le mouvement des électrons. SDH, succinate dehydrogenase; NDH, NADH dehydrogenase; Q, quinone; bc1, cytochrome bc1 complex; c550, cytochrome c; paz, pseudoazurin; NAR, membrane-bound nitrate reductase; NAP, periplasmic nitrate reductase; NIR, cd1-type nitrite reductase; NOR, bc-type NO reductase; NOS, nitrous oxide reductase.

Tiré de Van Spanning *et al.* (2005).

3.2 La réduction du NO

La réduction du NO est une étape particulière de la dénitrification car c'est celle-ci qui conduit à la formation de la liaison N-N. Cette liaison se forme à un certain moment lors de la réaction de réduction du NO en N₂O (Tavares *et al.*, 2006). L'enzyme responsable de cette réaction est l'oxyde nitrique réductase NOR. Malheureusement, aucune structure 3D n'est connue de cette enzyme et les données structurales existantes du site actif sont surtout des données spectroscopiques. Il existe trois différentes classes de NOR dont le site actif possède une forte homologie entre ces classes. La majeure différence provient du donneur d'électrons qui diffère entre les classes : cNOR (cytochrome c), qNOR et qCuNOR (quinol). Une autre différenciation est également possible en fonction de la longueur de la chaîne d'acides aminés, cela regroupe les différents NORs de la même façon que précédemment. Celle-ci sépare les oxydes nitriques réductases en deux groupes, celui à chaîne courte scNOR (environ 450 acides aminés) et celui à chaîne longue lcNOR (environ 760 acides aminés) (Zumft, 2005). Les oxydes nitrique réductases ne génèrent pas de gradient de protons au travers de la membrane car elles utilisent exclusivement les protons présent dans le périplasme pour la réaction de réduction du NO (Hendriks *et al.*, 2002). Une voie de transfert des protons jusqu'au centre catalytique doit donc exister et des études mettent en avant certains résidus qui pourraient être impliqués dans cette fonction (Flock *et al.*, 2006).

cNOR n'a été retrouvée que dans peu de bactéries dénitrifiantes à ce jour, parmi lesquelles on retrouve *Parococcus denitrificans*, *P. aeruginosa* ou encore *Pseudomonas stutzeri* (Heiss *et al.*, 1989, Hoglen *et al.*, 1989, Kumita *et al.*, 2004). L'enzyme est composée de deux sous-unités : NorB qui est la sous-unité catalytique située dans la membrane cytoplasmique et qui contient deux hèmes de type *b* ainsi qu'un atome de fer non-hème et NorC qui est une sous-unité ancrée dans la membrane cytoplasmique avec une partie dans le périplasme et contenant un hème de type *c*. Cet hème de type *c* est responsable du transfert d'électrons provenant du cytochrome *c* jusqu'à NorB (Tavares *et al.*, 2006). cNOR est codé par deux gènes compris dans un même opéron, *norB* et *norC*. D'autres gènes sont souvent trouvés en cluster autour de *norCB* et l'organisation ainsi que la présence de ces gènes diffèrent selon les espèces (Zumft, 2005). Le cluster le plus souvent retrouvé est *norEFCBQD*, qui est l'organisation que l'on retrouve chez les espèces de *Pseudomonas* (Bedzyk *et al.*, 1999). Cette organisation respecte

néanmoins certaines règles : *norQ* et *norD* sont toujours présents avec *norCB*, *norD* se retrouvant en aval de *norCB* et *norQ* s'intercalant souvent entre *norB* et *norD*. La position de *norE* et *norF* est variable et ces gènes sont parfois absents. Les rôles des protéines codées par ces gènes auxiliaires sont variables; ils peuvent affecter l'expression et la fonction de *norCB* ainsi que la réduction du NO et la croissance de la bactérie (Zumft, 2005).

La structure primaire de qNOR est très similaire à celle de cNOR, mais l'enzyme se présente sous la forme d'une seule sous-unité, dont les donneurs d'électrons sont les quinols (Cramm *et al.*, 1999). La grande particularité de cette enzyme est qu'elle n'est exprimée qu'en absence des autres enzymes liées à la dénitrification, excepté chez *Ralstonia eutropha* (Householder *et al.*, 2000). La sous-unité qNOR est composée d'une partie N-terminale très similaire à la sous-unité NorC alors que sa partie C-terminale présente des similarités avec NorB. Il a alors été proposé que qNOR soit composée de la fusion des sous-unités NorB et NorC et ait perdu son centre hème c au profit d'un site de fixation des quinols (Tavares *et al.*, 2006). qNOR est codé par un seul gène, *norZ*, pouvant également être nommé *norB* chez certains organismes (Zumft, 2005). Aucun gène auxiliaire particulier n'est retrouvé avec lui à l'inverse de *norCB*. qCuNOR est une enzyme exclusive à *Bacillus azotoformans* qui est formée de deux sous-unités. Elle possède une sous-unité similaire à NorB, alors que la seconde sous-unité ne possède pas de centre hème c mais un site cuivre A afin de faire le transfert d'électrons. Ces électrons proviennent du menaquinol et aussi du cytochrome c_{551} , bien qu'avec quatre fois moins d'activité qu'avec les menaquinols (Suharti *et al.*, 2004). De ce fait, les menaquinols sont potentiellement utilisés pour la détoxification du NO.

La réduction de l'oxyde nitrique est une partie intégrante de la dénitrification et est donc régulée de manière identique, en absence d'oxygène et en présence d'oxydes d'azote. C'est naturellement le NO qui présente la plus forte régulation des oxydes nitriques réductases et est même vu comme la molécule signal centrale de l'expression de tout l'appareil de dénitrification du nitrite, c'est-à-dire de la réduction du nitrite et du NO (Palmedo *et al.*, 1995, Zumft, 2005, Zumft *et al.*, 1994). NOR n'est pas exprimé en présence d'oxygène et l'enzyme est donc purifiée à partir de cultures en conditions anaérobies ou avec une faible concentration d'oxygène. Ce constat est néanmoins remis en question depuis quelques années car les études mettent en avant de plus en plus d'espèces aérobies capables de faire la dénitrification telles que *Klebsiella*

pneumoniae, *Pseudomonas stutzeri* ou encore *Alcaligenes faecalis* (Joo *et al.*, 2005, Pal *et al.*, 2015, J-J. Su *et al.*, 2001). Chez ces espèces, une régulation particulière de la dénitrification a dû se mettre en place afin de rendre la dénitrification aérobie possible. L'expression anaérobie des gènes *nor* est régulée par des régulateurs de type Crp-FNR, comme c'est le cas pour les nitrate réductases ainsi que les nitrite réductases. En effet, des motifs de reconnaissance de ces régulateurs sont présents dans le promoteur *nor*. Des régulateurs homologues au Crp-FNR jouent également un rôle dans la régulation des gènes *nor*; il s'agit de Dnr, DnrD, NnrR ou Nnr (le nom changeant selon qu'il soit lié à la régulation du nitrite, l'oxyde nitrique ou la dénitrification). Bien qu'ils soient homologues aux Crp-Fnr, ils ne possèdent pas de cluster Fe-S servant à la détection de l'oxygène et à l'activation de la transcription (Zumft, 2005). Ces régulateurs sont sensibles aux concentrations en NO et activent l'expression des gènes régulés en présence de NO dans le milieu. La façon dont le NO agit sur ces régulateurs afin qu'ils puissent activer la transcription est inconnue à ce jour. Dnr et NnrR sont également très importants pour la régulation et la formation de tout l'appareil de dénitrification du nitrite; chez *Rhodobacter sphaeroides*, NnrR régule l'expression de *norC* et de *nirK* en présence de NO et est nécessaire pour établir la voie de respiration du nitrite (Tosques *et al.*, 1996). Finalement, la présence de motifs palindromiques dans le promoteur des gènes *dnr* et *nnrR* similaires à la Fnr box de *E. coli* suggère une autorégulation de ces gènes mais également, dans certains cas, un contrôle hiérarchique des régulateurs.

D'autres enzymes ont été identifiées comme capables de réduire le NO en N₂O mais n'entrent pas dans la dénitrification car leur rôle est plus axé sur la détoxification et elles ne produisent généralement pas d'énergie pour la bactérie (Poole, 2005). En effet, le NO se révèle être un des oxydes d'azote les plus toxiques pour les cellules vivantes de manière générale et donc une des molécules signal les plus fortes dans les systèmes biologiques (Furchgott, 1999). Le NO a pour effet d'inhiber des enzymes clés telles que des oxydases et autres enzymes à hèmes liant l'oxygène mais également les enzymes possédant des centres Fe-S. Le NO peut également réagir avec des anions superoxydes et générer du peroxyde de nitrite, une molécule possédant des effets encore plus toxiques que le NO. La nitrosation, création de composés dérivés nitroso- à partir de molécules organiques, est aussi un des effets toxiques possibles d'une trop forte concentration de NO dans le milieu. Les organismes ont donc naturellement élaboré des mécanismes de défense contre le stress nitrosatif et notamment des enzymes réduisant le NO en N₂O afin de maintenir une concentration faible de NO dans le milieu. Poole

(2005) dresse une liste non exhaustive de ces enzymes; les deux principales étant la flavohémoglobine (Hmp) et la flavorubredoxine étudiées principalement chez *E. coli*. Cette dernière est une homologue à FrpA se révélant être une enzyme flavo-diiron, et son rôle protecteur contre le stress nitrosatif a été démontré (Silaghi-Dumitrescu *et al.*, 2005). Chez *Nitrosomonas europaea*, le cytochrome c_{554} s'est révélé posséder des capacités de détoxification du NO en apportant une réduction lente mais régulière du NO dans la cellule (Upadhyay *et al.*, 2006). Cette enzyme monomérique se trouve dans le périplasme et possède 4 hèmes de type *c* impliqués dans le transfert des électrons et permettant la réaction catalytique. Une oxyde nitrite réductase appelé P450_{nor} est présente chez le champignon *Fusarium oxysporum* et a également été caractérisée comme protectrice contre le stress nitrosatif (Daiber *et al.*, 2005). Afin de réaliser la réduction du NO, l'enzyme utilise directement le NADH présent dans le cytoplasme de la cellule. En plus de son effet protecteur contre le NO, P450_{nor} aurait également un effet de protection contre le peroxy-nitrite.

3.3 La réduction du N₂O

Le N₂O, oxyde nitreux, est réduit en N₂ grâce à l'oxyde nitreux réductase N₂OR, une protéine possédant plusieurs atomes de cuivre dans sa structure (Tavares *et al.*, 2006). La réduction du N₂O n'est pas obligatoirement couplée à la dénitrification et plusieurs espèces non dénitrifiantes sont connues pour réduire le N₂O. La réaction de réduction du N₂O est très exergonique avec un $\Delta G^0 = -340 \text{ kJ.mol}^{-1}$ du fait de la stabilité de l'azote gazeux N₂. Ainsi, de nombreuses espèces bactériennes sont capables de croître avec du N₂O comme seule source d'énergie. Le processus de réduction du N₂O implique le cytochrome *bc1*, participant au transfert d'électrons et transférant dans le même temps des protons au travers de la membrane cytoplasmique (Zumft, 1997). De manière fortuite, il fut découvert que l'acétylène était un inhibiteur de la réaction de réduction du N₂O (Fedorova *et al.*, 1973). L'acétylène est alors devenu un outil indispensable dans les études en cultures pures sur le N₂O et afin de déterminer le potentiel de dénitrification des sols. Le mécanisme d'inhibition n'est pas connu à ce jour, mais on sait qu'il est réversible et non compétitif, et que l'acétylène peut également inhiber d'autres métalloenzymes (Hyman *et al.*, 1988).

Les N₂ORs sont des enzymes homodimériques périplasmiques dont chaque sous-unité contient un centre cuivre binucléaire Cu_A et un centre cuivre multinucléaire Cu_Z (Einsle *et al.*, 2004). Cela permet à N₂OR de conserver l'énergie lors de la réduction, malgré son caractère soluble. Le centre Cu_A est similaire à celui retrouvé chez les cytochromes *c* oxidases et aurait un rôle dans le transfert des électrons intramoléculaires. Le centre Cu_Z est, quant à lui, le centre catalytique de la réaction de réduction. Les structures tridimensionnelles de N₂OR ont montré que la protéine possédait une large surface de dimérisation entre ses deux sous-unités, qui se retrouve en position de tête à queue (Brown *et al.*, 2000, Coyle *et al.*, 1985). Cette position particulière a pour conséquence un fort rapprochement entre le Cu_A d'un monomère avec le Cu_Z de l'autre, permettant le transfert d'électrons du donneur (cytochrome *c* monohème ou pseudoazurine) jusqu'à Cu_Z en passant par Cu_A (Tavares *et al.*, 2006). Il est cependant difficile de définir précisément les donneurs d'électrons en jeu car des voies parallèles de transfert d'électrons peuvent se mettre en place, et certaines fois des donneurs d'électrons alternatifs peuvent apparaître, ce qui a pour conséquence que la réductase ne reçoit pas ses électrons d'un complexe lié à la respiration mais d'un intermédiaire (Mařchová *et al.*, 1991).

N₂OR est encodé par le gène *nosZ* (Zumft, 1997). Ce gène fait partie d'un cluster de gènes retrouvés avec *nosZ* chez toutes les espèces possédant un N₂OR. L'arrangement que l'on retrouve majoritairement est *nosRZDFYL*, avec *nosR* pouvant avoir une position variable, se plaçant après *nosZ* ou à la fin du cluster (Pauleta *et al.*, 2013). Chez certaines bactéries dénitrifiantes, surtout des alphaprotéobactéries, un gène supplémentaire *nosX* est présent et peut se retrouver au début ou à la fin du cluster principal. Finalement, il se peut que certains de ces gènes accessoires soient présents en plusieurs copies. NosR semble être impliqué dans différents aspects de la synthèse et de l'activité de N₂OR. Chez *Pseudomonas stutzeri*, il contrôle la transcription de *nosZ* mais il est également nécessaire pour que N₂OR fonctionne à pleine activité et pour la bonne insertion du centre Cu_A et Cu_Z lors de la formation de l'enzyme (Cuypers *et al.*, 1992, Pauleta *et al.*, 2013). *nosDFYL* joue très certainement un rôle dans l'assemblage du centre Cu_Z qui est assemblé, avec Cu_A, dans le périplasma. Chez des mutants *nosDFY*, les N₂ORs isolées ne possèdent que des centres Cu_A; il fut donc proposé que NosDFY code pour un transporteur ABC impliqué dans l'assemblage des centres Cu_Z (Riester *et al.*, 1989). *nosL*, bien que généralement cotranscrit avec *nosDFY*, n'est pas essentiel à la formation des centres Cu_Z. NosX est tout aussi

nécessaire que NosR afin de maintenir une enzyme pleinement fonctionnelle, mais n'intervient pas dans l'assemblage des centres Cu_2 (Pauleta *et al.*, 2013). Il est possible que NosX joue un rôle dans le transfert des électrons jusqu'à N_2OR et maintienne l'enzyme dans un état catalytique actif. Les epsilonprotéobactéries possèdent deux gènes supplémentaires, *nosH* et *nosG*, codant tous les deux pour des cytochromes *c* constituant le système de transport des électrons jusqu'au N_2OR cytoplasmique.

La régulation des N_2ORs a été très étudiée et donc connue pour de nombreux organismes. Curieusement, la transcription de *nosRZDY* n'est que très faiblement induite par le N_2O alors que le NO induit fortement la transcription de l'opéron (Arai *et al.*, 2003). Une séquence similaire à une FNR box se situe dans le promoteur de l'opéron, ce qui montre qu'un régulateur de type FNR contrôle également sa transcription. Ce régulateur est représenté par le facteur Dnr chez *P. aeruginosa*, contrôlant la régulation de *nosRZDY* dépendamment du NO. Chez d'autres bactéries, des régulateurs homologues ont également ce rôle; il s'agit de Nnr pour *P. denitrificans* et de DnrD pour *P. stutzeri* (Bergaust *et al.*, 2011, Van Spanning *et al.*, 1999). Les régulateurs de type FNR étant des senseurs d'oxygène, la régulation des N_2ORs est inhibée par l'oxygène. Chez *P. denitrificans*, FnrP est un senseur d'oxygène ayant également des propriétés de régulation de la transcription de N_2OR (Bergaust *et al.*, 2011).

3.4 Les voies alternatives de production de N_2O

Le N_2O est un gaz à effet de serre très puissant et destructeur de la couche d'ozone. Il est très étudié et surveillé au niveau environnemental et au niveau de ses voies de production. Il existe différentes voies métaboliques conduisant à la production de N_2O chez les bactéries (Figure 3.2). La voie de dénitrification ainsi que la détoxification des NO_x font partie de ces voies et ont été décrites précédemment. La dernière voie métabolique est représentée par l'oxydation de l'ammonium par les microorganismes nitrifiants (Stein, 2011). Toutes ces voies métaboliques sont en constante compétition dans l'environnement et leur part respective dans le budget total de N_2O dépendent des conditions environnementales. Les bactéries nitrifiantes, comme leur nom l'indique, utilisent la réaction de nitrification dans leur métabolisme central,

mais certaines font cette réaction de manière fortuite dû à du co-métabolisme (Prosser, 1986). La nitrification repose sur l'oxydation de l'ammonium NH_4^+ en hydroxylamine NH_2OH qui, à son tour, est oxydé en nitrite NO_2^- ou en oxyde nitrique NO . Ce NO_2^- ou NO est ensuite transformé en N_2O par des voies de dénitrification ou de détoxification telles que reportées précédemment. Ce mécanisme de production de N_2O est qualifié de dénitrification nitrifiante (Wrage *et al.*, 2001). Dans l'environnement, le NO_2^- produit peut être oxydé en NO_3^- par un autre type de bactéries qualifiées d'oxydeurs de nitrite complétant ainsi le processus de nitrification de l'ammonium (Bock *et al.*, 1992). Ces organismes ne seront pas décrits ici car ils n'interviennent pas dans la production de N_2O . Les AOA, pour « ammonium-oxidizing archea », font partie des organismes capables de nitrification mais ne seront pas traités ici. Le premier groupe de bactéries réalisant la nitrification comprend les bactéries chimiolithotrophes, ne consommant que des substrats inorganiques pour générer de l'énergie, et certaines fixant le carbone inorganique. Dans ce groupe, on retrouve les bactéries oxydant l'ammonium appelés AOB pour « ammonium-oxidizing bacteria » (Wood, 1986). Les AOB ont besoin d'oxygène pour leur métabolisme de nitrification et de l'hydroxylamine NH_2OH est produit en tant qu'intermédiaire de la réaction. L'oxydation de l'ammonium représente le métabolisme central de ces bactéries, produisant l'énergie nécessaire à leur croissance. Certaines AOB sont aussi capables de produire du N_2O en conditions microaérophiles en réduisant le NO_2^- , certainement à l'aide d'enzymes liées à la dénitrification (Goreau *et al.*, 1980). Ce processus est appelé dénitrification aérobie et n'a été observé que chez quelques AOB. De plus, les enzymes et mécanismes impliqués sont inconnus pour le moment. Le NO_2^- produit par ces organismes stimule également les autres processus liés à l'azote comme la production de NH_2OH et de N_2O (Ralf Conrad, 1996). Une famille de bactéries proche des AOB du point de vue évolutif est également capable d'oxyder l'ammonium en nitrite, il s'agit des bactéries oxydant le méthane ou MOB pour « methane-oxidizing bacteria ». À l'inverse des AOB, cette réaction se fait de manière co-métabolique et aucune énergie n'en est retirée (Dalton, 1977). Les processus mis en jeu dans ces réactions sont encore moins connus et caractérisés que pour les AOB, mais l'importance de ces bactéries dans le budget total de N_2O dans l'environnement pourrait être significatif. Les MOB sont aussi capables de faire d'autres réactions liées au cycle de l'azote tel que la réduction du NO qui est le mécanisme principal pour la production de N_2O (Krämer *et al.*, 1990, Mandernack *et al.*, 2000). Le deuxième groupe est représenté par les bactéries hétérotrophes oxydant l'ammonium. Ces bactéries

utilisant des sources de carbones organiques pour leur métabolisme principal, elles ne produisent aucune énergie par l'oxydation de l'ammonium en nitrite (Killham, 1986). Parmi ces hétérotrophes, de nombreuses espèces produisent du N_2O à partir du NO_2^- produit par la voie traditionnelle de dénitrification en conditions microaérophiles (Castignetti *et al.*, 1984). Toutes ces espèces bactériennes sont naturellement en compétition dans la nature car elles occupent la même niche. En plus de la réduction du NO_2^- en N_2O via le NO , du N_2O est également produit par l'oxydation du NH_2OH qui est un produit intermédiaire de la nitrification. Mais les quantités de N_2O produites de cette manière sont considérées négligeables car l'oxydation du NH_2OH en NO_2^- est plus rapide (Whittaker *et al.*, 2000).

La production de N_2O chez ces organismes se fait en deux temps, la nitrification se faisant en conditions aérobies et la dénitrification en conditions anaérobies. Un continuum s'est néanmoins développé dans les classes de ces bactéries dépendamment de l'environnement plus ou moins aérobie. Par exemple, des bactéries hétérotrophes oxydant l'ammonium possèdent des enzymes liées à la dénitrification ayant une forte activité en présence d'oxygène (I. C. Anderson *et al.*, 1993). L'équilibre entre les différentes espèces azotées produites peut aussi être influencé par les facteurs environnementaux comme l'humidité du sol influençant le ratio NO/N_2O chez des chimolithotrophes oxydant l'ammonium (E. A. Davidson, 1993). Le ratio C/N est également un facteur contrôlant grandement la production de N_2O . Cela est surtout vrai dans les communautés bactériennes comprenant des populations chimolithotrophes et des populations hétérotrophes. En effet, un environnement avec un faible C/N favorise d'avantage les chimolithotrophes alors qu'un C/N élevé favorise le métabolisme d'oxydation de l'ammonium des hétérotrophes (Kuenen *et al.*, 1994). En conditions dénitrifiantes (anaérobie et présence de nitrate), la disponibilité du nitrate et du carbone organique détermine si le métabolisme produit plus particulièrement du N_2 ou du N_2O . Finalement, le pH possède également un fort effet sur la production de N_2O car le NO_2^- peut se décomposer en NO et N_2O dans des conditions acides. Cependant, l'influence du pH ne peut être corrélée simplement à la production de N_2O et les effets du pH sur cette dernière ne sont pas encore bien compris (Stein *et al.*, 2003).

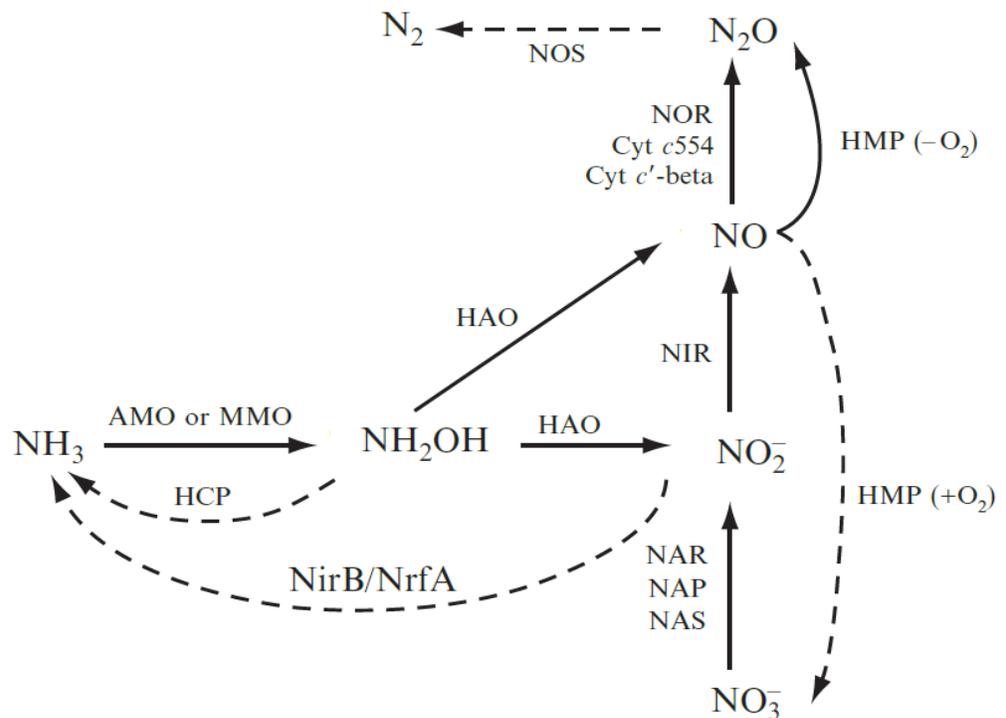


Figure 3.2 : différentes voies enzymatiques et enzymes associées menant à la production de N₂O.
Tiré de Stein (2011)

Afin de transformer l'ammonium en NH₂OH, les AOB et MOB utilisent une ammonium monooxygénase AMO ou méthane monooxygénase MMO, respectivement (Wrage *et al.*, 2001). Cette réaction consomme deux électrons afin de réduire l'O₂ en H₂O, ces deux électrons provenant de la réaction suivante, l'oxydation de NH₂OH en NO₂⁻. AMO et MMO sont similaires dans de nombreux aspects, que ce soit au niveau de la composition des sous-unités, des inhibiteurs ou encore des séquences des gènes codant l'enzyme (Murrell *et al.*, 1996). Seule AMO sera ici décrite en détail. AMO est capable de faire la catalyse de nombreux substrats qui vont inhiber l'oxydation de NH₄⁺, de manière compétitive ou par liaisons covalentes, comme c'est le cas pour l'acétylène (McCarty, 1999). AMO est une enzyme membranaire constituée de trois polypeptides : AmoA, AmoB et AmoC (Arp *et al.*, 2002). Parmi les trois sous-unités, c'est AmoA qui possède le plus certainement la fonction catalytique, et le cuivre semble être un co-facteur important pour cette fonction. Le seul indice prouvant la présence d'AmoC dans le polypeptide vient du fait que les trois gènes codant pour les trois sous-unités sont co-transcrits dans un même ARNm. L'opéron contenant ces trois gènes (*amoA*, *amoB* et

amoC) est présent en deux copies quasiment identiques (>99%) chez *N. europaea*, et une troisième copie de *AmoC* est également présente (McTavish *et al.*, 1993, Sayavedra-Soto *et al.*, 1998). Le nombre de copies de cet opéron varie selon l'espèce bactérienne et jusqu'à trois copies ont été retrouvées chez des bactéries autotrophes (Klotz *et al.*, 1998). Les différentes copies sont actives et fonctionnelles chez *N. europaea* et exprimées différemment, suggérant un rôle particulier à chacune. La transcription des gènes *amo* n'est induite que par le NH₃ et la présence d'inhibiteurs, AMO ne perturbe pas cette transcription. Il est donc possible que *amoABC* soit transcrit alors que l'enzyme ne peut être fonctionnelle. Cela suggère que le NH₃ possède deux rôles, celui de régulateur et celui de source d'énergie (Hyman *et al.*, 1995, Sayavedra-Soto *et al.*, 1998).

L'hydroxylamine NH₂OH produit par l'action de AMO/MMO est ensuite prise en charge par l'hydroxylamine oxydoréductase HAO et est oxydée en nitrite ou en NO (Stein, 2011). HAO est un homotrimère périplasmique dont chaque sous-unité contient huit hèmes de type *c* (Hendrich *et al.*, 2001). Ces hèmes sont arrangés en clusters et participent au flux d'électrons au travers de la protéine et à la catalyse de l'oxydation du NH₂OH (Arp *et al.*, 2002). Ce flux d'électrons est dirigé du cytochrome *c*₅₅₄ (donneur d'électrons) jusqu'au cytochrome *c*_{m552}. Des quatre électrons générés par l'oxydation de NH₂OH, deux sont directement utilisés pour la réaction d'oxydation de NH₃ par AMO, telle que décrite précédemment. Les deux électrons restants sont utilisés pour d'autres processus cellulaires comme la génération d'ATP (Wood, 1986). HAO est encodée par un seul gène, *haoA*, généralement co-transcrit avec un autre gène *haoB* chez presque toutes les AOB (Stein, 2011). *haoB*, originalement nommé *orf2*, possède un rôle encore inconnu à ce jour (Poret-Peterson *et al.*, 2008). Chez *N. europaea*, organisme modèle chez les AOB, *haoB* n'est pas présent et le génome de la bactérie comprend trois copies complètement identiques de *hao*, très éloignées les unes des autres sur le génome de la bactérie (Arp *et al.*, 2002). Aucun rôle particulier n'est pour le moment attribué à chaque copie de *hao*, des mutants ayant chacun un des *hao* interrompu ne présentant aucune différence phénotypique avec la souche sauvage (Hommes *et al.*, 1996). Chaque copie de *haoAB* est co-exprimée avec l'opéron *cycAB*, codant respectivement pour les cytochromes *c*₅₅₄ et *c*_{m552} responsables des flux d'électrons des HAO. *haoAB* et *cycAB* forment ensemble le « *Hydroxylamine-Ubiquinone Redox Module* » (HURM) qui peut être retrouvé jusque chez les Planctomycètes oxydant l'ammonium (Klotz *et al.*, 2008). Le cytochrome *c*₅₅₄ possède également une activité de réduction du NO *in vitro*,

indiquant qu'il pourrait fonctionner en coopération avec HAO dans la production de N₂O dans la voie d'oxydation aérobie de l'hydroxylamine. Les MOB aussi possèdent les gènes *haoAB* et oxydent le NH₂OH, mais ne possèdent pas *cycAB*, ce qui explique qu'ils ne retirent pas d'énergie de cette réaction (Stein, 2011). Comme pour *amoABC*, la transcription de *hao* est induite par NH₃ chez *N. europaea* mais dans une moindre mesure (Sayavedra-Soto *et al.*, 1996). Aucune information quant à des différences d'expression entre les différentes copies n'existe à ce jour. Finalement, certaines MOB sont capables d'oxyder le NH₂OH et de produire du N₂O, mais ne possèdent pas les gènes *haoAB*; les mécanismes utilisés chez ces bactéries ne sont toujours pas caractérisés pour le moment (Knowles *et al.*, 1988).

La co-dénitrification (pour dénitration co-métabolique) est une voie métabolique produisant du N₂O, assez peu étudiée décrite pour la première fois par Tanimoto *et al.* (1992). Cette voie a surtout été observée chez différentes espèces de champignons, mais a également été reportée pour certaines bactéries dénitrifiantes. La co-dénitrification consiste à utiliser un composé azoté inorganique (e.g. NH₄⁺) ou un composé azoté organique (e.g. azide) afin de produire du N₂O de manière différente à la dénitration traditionnelle. Cette réaction se produit dans des conditions qui sont favorables à la dénitration, c'est-à-dire une faible concentration en oxygène et la présence d'oxydes d'azote. De plus, la co-dénitrification n'est induite qu'en présence de NO₂⁻ ou de NO₃⁻ alors que les composés co-métabolisés ne peuvent induire cette réaction. Tanimoto *et al.* (1992) démontrèrent grâce à des techniques utilisant de l'azote ¹⁵N comme traceur, qu'un des N du N₂O provenait du NO₂⁻ et le deuxième N provenait du composé azoté organique ou inorganique, créant ainsi un N₂O hybride. Le NH₂OH, impliqué dans la production de N₂O par le biais de la nitrification, peut également être utilisé dans la réaction de co-dénitrification (Spott *et al.*, 2011). La seule enzyme connue catalysant cette réaction est le cytochrome P450nor qui est aussi responsable de la réduction du NO en N₂O (Nor) chez les champignons (F. Su *et al.*, 2004). Des mécanismes abiotiques peuvent aussi conduire à la formation de N₂O, ou du moins à la formation de NO pouvant être réduit en N₂O par la suite. La chimio-dénitrification est la réduction chimique du nitrite en NO en présence de NH₂OH (Stuven *et al.*, 1992). Chez un mutant *knockout nirK* de *N. europaea* ne pouvant plus réduire le nitrite, la production de N₂O fut attribuée à un phénomène de chimio-dénitrification, le NH₂OH étant présent naturellement dans les cultures de cette souche (Schmidt *et al.*, 2004). Les milieux complexes sont aussi susceptibles de contenir des composés pouvant potentiellement

se dégrader et produire des composés azotés dans certaines conditions. Luckmann *et al.* (2014) démontrèrent qu'en présence de nitrite, le milieu BHIB (Brain Heart Infusion Broth) pouvait se dégrader et conduire à la formation de NO. L'autooxydation des hydroxylamines est également possible et conduit à la formation d'ions nitoxyl qui se transforment majoritairement à leur tour en peroxydinitrite (Moews *et al.*, 1959).

4. LES BACTÉRIES MÉTHYLOTROPHES

4.1 La méthylothrophie

La méthylothrophie est connue depuis le début du 20^e siècle en tant que métabolisme et est devenue par la suite un champ d'étude à part entière de la biochimie d'un grand nombre d'organismes classés comme méthylotrophes ainsi que les enzymes et voies métaboliques mises en jeu (Söhngen, 1906). Les méthylotrophes sont, par définition, des organismes capables d'utiliser des composés carbonés ne contenant aucune liaison C-C en tant que source d'énergie ni source de carbone (Anthony, 1982). Ces organismes sont restreints à quelques genres bactériens appartenant aux alpha-, beta- and gammaprotéobactéries ainsi qu'aux *Actinobacteria*. De plus, les études d'organismes modèles ont conduit à la création de catégories de méthylotrophes bien distinctes : les méthylotrophes facultatifs et les méthylotrophes obligatoires, les méthanotrophes de type I ou de type II et les hétérotrophes et les autotrophes (Chistoserdova, 2011). Cependant, la découverte de bactéries méthylotrophes n'appartenant pas à ces genres et de nouvelles voies métaboliques de la méthylothrophie remettent en cause ce fondement. Les méthylotrophes ont un rôle important à jouer dans les cycles de l'azote et du soufre, car parmi les substrats utilisés par ces organismes, on retrouve du méthane, du méthanol, des amines méthylées, des méthanes halogénés et des composés soufrés méthylés (Chistoserdova, 2011). On peut de manière simplifiée schématiser les voies métaboliques de la méthylothrophie en trois parties distinctes, chacune comportant plusieurs modules différents :

- l'oxydation du substrat primaire, entraînant la production de formaldéhyde ou d'un radical méthyl ou méthylène (généralement du tétrahydrofolate H₄F).
- l'oxydation du formaldéhyde (ou du méthyl- ou méthylène-H₄F) en CO₂.
- l'assimilation d'un composé en C1 qui peut se situer au niveau du formaldéhyde, du CO₂ ou d'une combinaison de CO₂ et méthylène-H₄F.

Afin d'être considéré comme méthylotrophe, un organisme se doit de posséder au moins un module dans chacune des parties décrites précédemment. Ce concept suggère que la méthylothrophie est de nature modulaire, c'est-à-dire que beaucoup de possibilités existent au niveau des voies métaboliques et que ses modules sont interchangeables/remplaçables et quelque fois redondants (Chistoserdova, 2011).

Toutefois, la définition de la méthylothrophie a encore besoin de précision car certains organismes utilisent ces voies métaboliques pour faire du co-métabolisme des composés en C1 plutôt que de les utiliser pour du métabolisme basé sur les composés en C1.

Les méthanotrophes sont définis par le fait qu'ils utilisent le méthane CH_4 en tant que substrat primaire dans leurs méthylothrophie. En conditions aérobies, le méthane est oxydé en méthanol et ensuite en formaldéhyde, rentrant à son tour dans le cycle RuMP (Ribulose MonoPhosphate) ou dans le cycle de la sérine (décrit plus bas). Cette différence dans l'utilisation du formaldéhyde classe les méthanotrophes dans le type I (cycle du RuMP, gammaprotéobactéries) ou dans le type II (cycle de la sérine, alphaprotéobactéries). Deux enzymes oxydant le méthane en conditions aérobies ont été très étudiées et caractérisées, la méthane monooxygénase soluble (sMMO) et la méthane monooxygénase membranaire (pMMO) (Hakemian *et al.*, 2007, Trotsenko *et al.*, 2008). pMMO se retrouve de manière quasiment universelle chez tous les méthanotrophes étudiés à ce jour alors que sMMO n'est présent que chez quelques espèces. L'oxygène est un élément essentiel pour l'oxydation du méthane mais l'oxydation anaérobie est également possible et a été seulement démontrée chez les *Archaea* (Knittel *et al.*, 2009). Il a été proposé que cette voie métabolique s'opère grâce à une méthanogenèse inverse (Thauer *et al.*, 2008). Il n'est pas impossible que cette voie métabolique particulière soit également présente chez des bactéries méthylothrophes encore inconnues pour le moment. Un autre substrat utilisé par les méthylothrophes est la méthylamine CH_5N , qui peut oxyder en formaldéhyde par deux voies différentes : soit par une méthylamine déshydrogénase MADH chez les bactéries Gram-négatives, soit par la méthylamine oxydase chez les bactéries Gram-positives. Il existe également une voie métabolique indirecte basée sur le transfert du groupe méthyle suivi par une oxydation menant probablement à la formation de méthylène- H_4F (Chistoserdova *et al.*, 2009). Parmi ces trois voies, la MADH est le système le plus connu. Les gènes codant pour cette voie (le cluster *mauBEDAGLMN*) sont très conservés et toutes les espèces possédant ces gènes ont été caractérisées comme méthylothrophes par la suite. C'est pour cela que la MADH est un marqueur caractéristique de la méthylothrophie (V. L. Davidson, 2004). Le méthanol est également un des substrats caractéristiques des méthylothrophes. L'enzyme oxydant le méthanol, la méthanol déshydrogénase (MDH), fut pendant une longue période l'enzyme la plus étudiée pour la méthylothrophie. Tout comme la MADH, la MDH est un marqueur caractéristique de la méthylothrophie

(Anthony, 1982, Anthony, 2004). Isolée et caractérisée pour la première fois chez *M. extorquens*, la MDH est codée par le gène *mxoF* accompagné par plusieurs gènes accessoires *mxoGACKLRS* dont les fonctions sont connues pour la plupart (Vuilleumier *et al.*, 2009). Pourtant, de nombreux échantillons environnementaux ont montré une activité d'assimilation du méthanol en absence de *mxoF*, suggérant que d'autres méthanol déshydrogénases sont à l'œuvre dans la nature (Chistoserdova, 2011). La MDH2, une méthanol déshydrogénase, fut récemment découverte et possède une faible similarité avec la MDH (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008). Chez certaines bactéries assimilant le méthanol, ni MDH ni MDH2 n'est présent. Le gène *xoxF* dont le peptide partage 50% d'identité avec MxoF a été proposé comme candidat potentiel remplaçant la MDH chez ces bactéries (Hou *et al.*, 2008). Finalement, il existe d'autres composés méthylés pouvant servir de substrat aux méthylotrophes que l'on retrouve moins fréquemment mais qui soulignent encore d'avantage le rôle important que jouent les méthylotrophes dans les grands cycles de la matière. Parmi ces substrats, on peut trouver le chlorométhane, bromométhane, diméthylsulfoniopropionate (DMSP), diméthylsulfide (DMS) ou encore la triméthylamine (Chistoserdova, 2011).

L'oxydation du formaldéhyde est une partie importante dans la méthylotrophie car elle permet non seulement de générer de l'énergie pour la bactérie, mais elle permet aussi de garder les concentrations de formaldéhyde basses car c'est un composé toxique pour la cellule. Les formaldéhyde déshydrogénases FdH sont un système simple et efficace d'oxydation du formaldéhyde et ne sont codées que par un seul gène (Vorholt, 2002). Il apparaît comme le système de détoxification majeure du formaldéhyde de plusieurs bactéries, méthylotrophes comme non méthylotrophes. Curieusement, il est absent chez la plupart des méthylotrophes au profit d'un autre système plus élaboré ayant pour cofacteur le tétrahydromethanoptérin (H₄MPT) et encodé par au moins vingt gènes (Chistoserdova *et al.*, 1998). Chez *M. extorquens*, là où il a été découvert, ce système est indispensable pour la création d'énergie (sous forme de NAD(P)H) et pour maintenir les concentrations de formaldéhyde à des concentrations non toxiques. Une voie métabolique analogue à celle-ci et liée au tétrahydrofolate est présente chez de nombreux méthylotrophes et implique l'enzyme F₀LD, une protéine possédant des activités de méthylène-H₄F déshydrogénase et méthylène-H₄F cyclohydrolase. La plupart des méthylotrophes dont le génome est connu et séquencé possèdent cette enzyme dans leur génome (Chistoserdova, 2011). Le formate généré par l'oxydation du formaldéhyde est à son tour oxydé par une formate

déshydrogénase (FDH). On retrouve de nombreuses copies de FDH chez plusieurs organismes dont les méthylophiles; *M. extorquens* en possédant quatre. Ces quatre FDH sont toutes différentes et sont numérotées de FDH1 à FDH4 (Chistoserdova, 2011). Les FDH sont peu conservées chez les méthylophiles et semblent être distribuées de manière aléatoire; des FDH homologues pouvant être largement distribuées parmi les bactéries méthylophiles et non méthylophiles (Ettwig *et al.*, 2010, Hou *et al.*, 2008). Chez les organismes utilisant le cycle du RuMP, les FDH sont très peu exprimées; le formaldéhyde étant également utilisé dans ce cycle (Anthony, 1982). Néanmoins, ces organismes ne peuvent se passer de l'oxydation du formate; des mutants sans FDH n'étant pas viables malgré un cycle du RuMP fonctionnel.

Trois voies d'assimilation différentes existent chez les méthylophiles et prennent place à des niveaux différents : le cycle du RuMP utilise le formaldéhyde généré par l'oxydation du substrat primaire, le cycle de la sérine utilise le méthylène- H_4F et le CO_2 et le cycle CBB (Calvin-Benson-Bassham) seulement le CO_2 (Chistoserdova, 2011). Il est à noter que si les deux premières voies d'assimilation citées ici sont propres aux organismes méthylophiles, le cycle CBB est partagé avec des organismes autotrophes non méthylophiles ainsi que les plantes. Le cycle du RuMP permet la génération de molécules en C3 utilisées pour la biosynthèse et la génération de NAD(P)H par l'oxydation d'une autre molécule du cycle (Anthony, 1982). Le cycle démarre par l'ajout d'une molécule de formaldéhyde sur un sucre en C5 (RuMP) et il finit par la régénération de ce même sucre afin de recommencer le cycle. Des enzymes courantes sont requises afin de réaliser le cycle : les enzymes de la glycolyse, du cycle du pentosephosphate et de la voie Entner-Doudoroff. Seules deux enzymes spécifiques au cycle du RuMP interviennent, il s'agit de l'héxulosephosphate synthase (HPS) et de l'héxulosephosphate isomérase (HPI). Ces deux enzymes sont considérées comme des signatures de la méthylophilie. Toutefois le cycle du RuMP peut également être utilisé pour la détoxification du formaldéhyde, donc la présence des gènes *hps/hpi* n'est pas une preuve de méthylophilie (Yasueda *et al.*, 1999). Le cycle de la sérine est également spécifique aux méthylophiles. Il permet la production de molécules en C3 et C4 servant pour la synthèse de biomasse et de glyoxylate servant d'accepteur pour le méthylène- H_4F . en assimilant à la fois le CO_2 et le méthylène- H_4F (Anthony, 1982). Comme pour le cycle du RuMP, plusieurs enzymes communes provenant d'autres cycles métaboliques interviennent dans le cycle de la sérine. Les enzymes spécifiques à ce cycle sont l'hydroxypyruvate réductase et la sérine glyoxylate aminotransférase.

(Ward *et al.*, 2004). Afin de pouvoir assimiler des molécules en C1 dans le cycle de la sérine, le glycoxylate a besoin d'être régénéré. Cela est réalisé à partir d'acétyl-CoA par la voie de éthylmalonyl-CoA (Peyraud *et al.*, 2009). Cette voie n'est cependant pas spécifique aux méthylophiles et peut être utilisée pour le métabolisme des composés en C2 par des non méthylophiles et des méthylophiles facultatifs. Le cycle CBB peut être retrouvé comme seule voie d'assimilation de composés en C1 chez certaines bactéries. Dans ce cas, il sert uniquement à assimiler le CO₂ afin de permettre la production de biomasse. Chez d'autres bactéries, il est présent en plus d'un autre cycle d'assimilation de composés en C1 et son rôle précis est encore inconnu pour le moment (Chistoserdova *et al.*, 2005). Le gène clé de ce cycle, *cbbLS*, est probablement soumis aux transferts latéraux car on a retrouvé plusieurs copies de ce gène dans le génome de plusieurs bactéries; chaque copie ayant des affiliations à des familles bactériennes différentes (Kane *et al.*, 2007).

La méthylophilie peut être reliée à la dénitrification chez certains organismes, comme chez *Paracoccus denitrificans* ou les *Hyphomicrobium* spp., méthylophiles dénitrifiant très étudiés (Baker *et al.*, 1998, Betlach, 1982). La nature aérobie de la méthylophilie semble incompatible avec la dénitrification essentiellement anaérobie mais des accepteurs d'électrons autres que l'O₂ ont été reconnus pour la méthylophilie. Bien qu'aucune souche bactérienne n'ait été isolée pour le moment, l'oxydation du méthane peut être liée à la dénitrification dans certains bioréacteurs (Ettwig *et al.*, 2008). Le méthanol fut souvent utilisé comme source de carbone dans les bioprocédés car il était peu coûteux étant donné qu'il s'agit d'un déchet industriel. Il permet d'améliorer les rendements de dénitrification dans le traitement des eaux usées. De nombreux méthylophiles associés entre autres au genre *Hyphomicrobium*, *Paracoccus*, *Methylophilaceae* ont été retrouvés dans les boues activées de ces bioréacteurs, bien que le lien entre ces organismes et la dénitrification opérant dans ces réacteurs n'ait pas été fait (Chistoserdova *et al.*, 2009). Cependant, il a été démontré que des méthylophiles appartenant au genre *Methylophilum* avaient besoin de nitrate pour pouvoir croître sur le méthanol, faisant un lien direct entre ces deux métabolismes (Kalyuzhnaya *et al.*, 2009).

4.2 Le genre *Methylophaga*

Le genre *Methylophaga* fut découvert en 1985 par l'isolement de sa première espèce, *Methylophaga marina* (Janvier *et al.*, 1985). Cette découverte entraîna également la reclassification de la bactérie *Methylomonas thalassica* en *Methylophaga thalassica*. Ces deux espèces ont servi à la réalisation de la première caractérisation du genre, mais de nouvelles espèces découvertes par la suite et appartenant au genre *Methylophaga* ne correspondaient plus tout à fait à la caractérisation faite par Janvier *et al.* (1985). Boden (2012) fournit une nouvelle description du genre *Methylophaga* en prenant en compte les nouvelles espèces isolées depuis 1985. Cela n'inclue pas *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1, dont la description détaillée a été faite ci-après. À ce jour, le genre *Methylophaga* comprend dix espèces distinctes dont le nom a été validé et publié. En plus de *M. nitratireducenticrescens*, il y a *M. marina*, *M. thalassica*, *M. alcalica*, *M. amidosulfivorans*, *M. lonarensis*, *M. muralis*, *M. sulfidovorans*, *M. thiooxydans* et *M. frappieri* également isolée du biofilm dénitrifiant comme l'espèce *M. nitratireducenticrescens* (Antony *et al.*, 2012, Boden *et al.*, 2010, de Zwart *et al.*, 1996, Doronina *et al.*, 2003, Doronina *et al.*, 2005, Janvier *et al.*, 1985, Kim *et al.*, 2007, Villeneuve *et al.*, 2013) D'autres souches ont été dénommées *Methylophaga* par les auteurs des publications associées, mais ces noms n'ont jamais été validés et publiés. Ces souches ne sont donc pas prises en compte dans la description donnée par Boden (2012). Les espèces de *Methylophaga* forment deux clades séparant les trois espèces alcaliphiles (*M. alcalica*, *M. lonarensis* et *M. muralis*) des autres espèces dont la représentante est *M. marina*. Ce regroupement est cohérent avec le plus faible taux d'identité de séquence de gène de l'ARNr 16S des espèces du premier clade avec *M. marina*.

Les *Methylophaga* spp. sont des bactéries aérobies strictes à Gram-négative formant des bâtonnets. Elles sont non-sporulantes et peuvent se déplacer à l'aide d'un unique flagelle polaire. Elles sont typiquement isolées à partir de milieux aqueux oligotrophes comme les environnements marins. L'espace périplasmique est fin et ne mesure que 20-30 nm. Ce sont des espèces halophiles modérées, dont certaines alcaliphiles, ne pouvant pas croître en l'absence de NaCl. Certaines espèces sont auxotrophes à la vitamine B₁₂ tandis que d'autres sont capables de réduire le nitrate en nitrite et sont incapables de l'utiliser pour leur croissance. Le milieu de culture commun à toutes ces espèces est le milieu 1403 (ATCC), et aucune n'est capable de croître sur un

milieu complexe. La quinone dominante du système respiratoire est UQ-8, et toutes les *Methylophaga* spp. utilisent des composés en C1 dans l'assimilation du carbone et comme source d'énergie via une variante du cycle du RuMP. Le méthane ne fait cependant pas partie des composés en C1 assimilables par ces bactéries mais certaines espèces peuvent utiliser des composés multicarbonés comme le fructose. Aucune *Methylophaga* spp. n'est capable de croissance autotrophe et certaines sont chimolithohétérotrophes. Finalement, le contenu G+C de l'ADN des *Methylophaga* varie de 42 à 50 mol%. La description détaillée de chaque espèce est présentée dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Caractéristiques des différentes espèces de *Methylophaga*. Espèce: 1, *M. alcalica*; espèce 2, *M. aminisulfivorans*; espèce 3, *M. lonarensis*; espèce 4, *M. marina*; espèce 5, *M. muralis*; espèce 6, *M. sulfivorans*; espèce 7, *M. thalassica*; espèce 8, *M. thiooxydans*. Tiré de Boden (2012).

Property	1	2	3	4	5	6	7	8
Type strain	M39 ^T	MP ^T	MPL ^T	222 ^T	Kr3 ^T	RB-1 ^T	ATCC 34146 ^T	DMS010 ^T
Growth temperature (°C)	4-35	ND	20-37	10-40	0-42	ND	10-40	ND
Growth pH	8-11	6-8	7-10	ND	6-11	ND	ND	ND
Vitamin B ₁₂ auxotrophy	+	-	-	+	+	+	+	-
Predominant cellular fatty acids	C _{16:0} ; C _{16:1} ; C _{18:1}	C _{16:0} ; C _{16:1}	C _{16:0} ; C _{16:1} ; C _{18:1}	ND	C _{16:0} ; C _{16:1} ; C _{18:1}	ND	ND	ND
Growth on fructose	-	+	-	+	+	-	+	+
Growth on MMA	+	+	-	+	+	+	+	+
Source	Saline soda lake	Seawater	Soda lake	Seawater	Marble wall	Marine microbial mat	Seawater	Algal culture

4.3 *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1

La souche JAM1 associée au genre *Methylophaga* fut isolée à partir du biofilm dénitrifiant provenant du système de dénitrification du Biodôme de Montréal par Auclair *et al.* (2010). La présence de *Methylophaga* spp. dans un milieu anaérobie ou du moins micro-aérophile parut surprenant du fait de la nature aérobie stricte de ce genre bactérien. La souche fut par la suite caractérisée et identifiée par Villeneuve *et al.* (2012), Villeneuve *et al.* (2013) et prit le nom de *Methylophaga nitratireducenticrescens*. La séquence du gène de l'ARNr 16S révéla une forte identité (96%) avec celle de *M. alcalica*. C'est une gammaprotéobactérie qui possède les caractéristiques attribuées aux *Methylophaga* spp. excepté qu'elle est aérobie facultative et non stricte. Sur gélose nutritive, elle forme de petites colonies beiges et lisses d'un diamètre de 2-3 mm (Villeneuve *et al.*, 2013). En culture liquide, la bactérie possède une forte tendance à flocculer, et de manière plus accentuée en conditions aérobies. Elle est positive pour la catalase et l'oxydase ainsi que l'estérase (C4), la leucine arylamidase, la naphthol-AS-BI-phosphohydrolase et l'activité phosphatase alcaline. Les optimum de croissance se situent à 30°C (15 à 37°C), à pH 8 (6 à 11) et à 3% NaCl (0.5 à 8%). La souche requiert la vitamine B₁₂ pour sa croissance, comme plusieurs autres *Methylophaga* spp., mais aussi une certaine concentration d'ions Na⁺ dans son milieu. Son unique source d'énergie et de carbone est le méthanol, la source de carbone utilisée dans le bioréacteur du Biodôme. Elle est sensible à plusieurs antibiotiques dont la gentamicine, la kanamycine, la streptomycine, la tétracycline et la triméthoprim, et résistante au chloramphénicol et à l'ampicilline jusqu'à 500 µg.ml⁻¹.

M. nitratireducenticrescens se distingue des autres *Methylophaga* spp. par sa capacité à réduire le nitrate en nitrite mais surtout par sa capacité à croître sur le nitrate en conditions anaérobies (Auclair *et al.*, 2010). Toutefois, la souche démontre une croissance plus forte en conditions aérobies; l'oxygène fournissant plus d'énergie que le nitrate. Le nitrite produit n'est pas consommé et s'accumule de manière équimolaire dans le milieu. Le nitrite est toxique pour la cellule et quand de faibles concentrations sont présentes initialement dans les cultures pures, inhibant sa croissance. Cette réduction de nitrate a également lieu quand il y a présence d'oxygène dans le milieu. Le séquençage du génome de *M. nitratireducenticrescens* a montré que la réduction du nitrate reposait sur deux enzymes Nar (Nar1 et Nar2) codées par les opérons *nar[1]GHJI* et *nar[2]GHJI* (Villeneuve *et al.*, 2012). *narG1* et *narG2* possèdent 61%

d'identité au niveau de la séquence d'acides nucléiques et 55% d'identité pour la séquence d'acides aminés (65% de similarité). NarG1 est affilié au NarG de la betaprotéobactérie *Thiobacillus denitrificans* avec un haut degré d'identité et de similarité (88% et 93%, respectivement) alors que NarG2 est affilié au genre gammaprotéobactérie (Auclair *et al.*, 2010). Cela suggère que Nar1 aurait été acquise par transfert horizontal de gènes. Le faible degré de similarité entre *narG1* et *narG2* (<67%) renforce cette idée d'origine différente (Palmer *et al.*, 2009). L'expression de ces deux gènes est potentiellement constitutive; en effet des ARNm de *narG1* et *narG2* ont été détectés en conditions anaérobies et aérobies avec ou sans nitrate dans le milieu. Aucun gène codant pour une nitrite réductase (*nirK* ou *nirS*) n'est présent, ce qui expliquerait l'incapacité de la souche à réduire le nitrate. Deux opérons *nor* sont également présents dans le génome. De la même manière que *nar1*, *nor2* est affilié aux betaprotéobactéries et semble avoir été acquis par transfert horizontal. Un opéron *nos* codant pour la réduction du N₂O est aussi présent dans le génome, faisant de *M. nitratireducenticrescens* un détenteur d'une voie de dénitrification coupée en deux parties. Finalement, trois transporteurs de nitrate *narK* sont retrouvés dans le génome, dont deux situés en aval de *nar1*. Tous les gènes de la dénitrification de *M. nitratireducenticrescens* sont situés très proches les uns des autres, sur un îlot génomique de 67 kpb, ce qui est une particularité en soit (Voir article 1, Fig 1). Sur cet îlot génomique, on peut également retrouver les gènes codant pour une protéine de biosynthèse pour le cofacteur molybdène *mogA*, une protéine de biosynthèse pour le cofacteur molybdène A *moaA*, le senseur de nitrate *narXL* et la protéine de réponse au stress induit par le NO *nnrS*. D'autres gènes présents dans le génome sont à noter comme l'opéron *mxoDEFJGIRACKL* codant pour la méthanol déshydrogénase, tous les gènes codant pour la glycolyse et ceux de la variante Entner-Douderoff de la voie du RuMP.

M. nitratireducenticrescens a été caractérisée comme une des deux bactéries les plus abondantes dans le biofilm dont elle est issue (Auclair *et al.*, 2010, N. Labbé *et al.*, 2003a). Bien que *M. nitratireducenticrescens* ne réduise pas le nitrite dans son milieu, aucune accumulation de nitrite n'est observée dans des cultures du biofilm dénitrifiant, indiquant que les autres microorganismes présents prennent en charge le reste de la dénitrification (Auclair *et al.*, 2010). *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 est potentiellement l'espèce majoritaire responsable de la réduction du nitrite car elle est également présente en abondance dans le biofilm et possède une voie de dénitrification

complète (Martineau *et al.*, 2013a). Il est possible qu'une association étroite (syntrophie) s'opère entre ces deux organismes dans le biofilm afin de réaliser la dénitrification complète. Cette association pourrait même aller au-delà de la dénitrification, les interactions inter-espèces étant très nombreuses et profondes au sein des communautés microbiennes (James *et al.*, 1995). En effet, il est intéressant de mettre en avant la faible tolérance au NaCl de la souche *H. nitratorans* (1% maximum) en culture pure alors que cette concentration est de 2.4% dans le milieu originel du biofilm (Martineau *et al.*, 2013b). *M. nitratireducenticrescens* possède dans son génome le gène permettant la synthèse d'ectoïne, une molécule ayant un fort pouvoir osmoprotectant (Villeneuve *et al.*, 2013). L'ectoïne relâchée dans le biofilm pourrait ainsi protéger les espèces bactériennes peu tolérantes au sel comme *H. nitratorans*, renforçant les relations entre ces deux espèces. Finalement, ces deux bactéries utilisent le méthanol comme source de carbone et d'énergie et pourraient échanger des métabolites associés à l'oxydation du méthanol bien qu'elles ne partagent pas le même cycle d'assimilation du carbone. En effet, les *Hyphomicrobium* spp. utilisent le cycle de la sérine contre la voie RuMP chez les *Methylophaga* spp.

5. PRÉSENTATION DE LA THÈSE

5.1 Hypothèses de recherches

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 est une bactérie unique du genre *Methylophaga* pour sa capacité à croître sur le nitrate et possède une voie de dénitrification très particulière car coupée en deux parties, et comprenant deux versions des enzymes Nar et Nor. En outre, elle est issue d'un biofilm, milieu complexe où se côtoient de nombreuses espèces bactériennes interagissant les unes avec les autres dans la réalisation de voies métaboliques telle que la dénitrification. L'étude de la voie de dénitrification de *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 possède une portée scientifique significative en apportant des connaissances sur plusieurs plans. Premièrement, elle apportera de nouvelles données sur les bactéries marines dénitrifiantes qui restent encore peu étudiées. Pourtant, les milieux marins, qu'ils soient naturels ou artificiels, sont autant touchés par la pollution par les nitrates que les milieux d'eau douce. Ensuite, cela permettra d'augmenter les connaissances sur les voies de dénitrification existantes et les cycles biochimiques de l'azote. Finalement, ces connaissances s'intégreront parfaitement dans l'étude globale du biofilm dénitrifiant. Représentant l'espèce la plus abondante du biofilm, la compréhension de son fonctionnement (de manière générale mais particulièrement au niveau de la dénitrification) en sera affinée. Deux hypothèses ont été émises afin de caractériser cette voie de dénitrification :

- les nitrate réductases Nar1 et Nar2 jouent un rôle équivalent dans la cellule pour la réduction du nitrate.
- *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 est capable de réduire le NO et le N₂O malgré son incapacité à réduire le NO₂⁻.

5.2 Objectifs de l'étude

Afin de répondre aux hypothèses précédentes, différents objectifs ont été établis :

Hypothèse 1

- Créer des mutants *knockout* des gènes *narG1* et *narG2* de la souche JAM1
- Étudier la croissance et la capacité à réduire le nitrate de chaque souche JAM1 (sauvage et mutantes) dans différentes conditions de culture
- Calculer les taux de croissance spécifiques pour chaque souche JAM1 (sauvage et mutantes)
- Étudier l'expression et la régulation des gènes liés à la réduction du nitrate pour chaque souche JAM1 (sauvage et mutantes) dans différentes conditions de culture

Hypothèse 2

- Étudier et mesurer la capacité à réduire le NO de la souche JAM1
- Étudier et mesurer la capacité à réduire le N₂O de la souche JAM1
- Étudier l'expression et la régulation des gènes liés à la réduction du NO et du N₂O à différentes phases d'une culture
- Étudier les voies de production du N₂O chez la souche JAM1 (ajouté pendant l'étude)

5.3 Méthodes

Afin de répondre à la première hypothèse, des mutants *knockout narG1*, *narG2* et *narG1narG2* de *Methylophaga nitratreducens* JAM1 furent créés. L'étude des souches mutantes et de la souche sauvage s'est ensuite faite en suivant leur croissance et leur capacité à réduire le nitrate dans différentes conditions de croissance à l'aide de spectrophotométrie et de chromatographie ionique, respectivement. L'expression de ces gènes ainsi que d'autres gènes liés à la réduction du nitrate comme les transporteurs NarK ont été suivis par RT-qPCR dans différentes conditions de culture afin d'observer l'influence des facteurs environnementaux (O_2 et NO_3^-) sur leurs expressions. L'influence des mutations fut également observée sur l'expression de ces gènes en comparant les mutants à la souche sauvage. Des recherches de sites de régulation dans les promoteurs ont également été réalisées préalablement afin de mieux déterminer les mécanismes de la régulation de la réduction du nitrate. Afin d'avoir une vue générale de la transcription des gènes de la souche JAM1, son transcriptome fut établi par assemblage sur génome.

Pour la deuxième hypothèse, des suivis de la réduction de N_2O par la souche JAM1 ont été effectués à l'aide d'une chromatographie gazeuse dans plusieurs conditions de culture. La réduction du NO fut attestée par insertion de NO dans les cultures de la souche JAM1 et observation de la production de N_2O qui découlait de cette réduction. La production de N_2O sans ajout de NO ayant également été observée, l'influence de divers paramètres environnementaux (O_2 , NO_3^- , C_2H_2 , NH_4^+) fut étudiée. L'origine du N_2O produit fut déterminée à l'aide d'expériences avec de l'azote marqué ^{15}N permettant de faire un traçage du NO_3^- et du NH_4^+ . Les mesures des ratios isotopiques du N_2O produit furent réalisées par un laboratoire extérieur. Finalement, l'expression des gènes impliqués dans la production de N_2O (*norB1*, *norB2*, *nos*, *nnrS*) fut suivie pendant les différentes phases de production/consommation de N_2O .

Des expériences complémentaires de transcriptomiques ont été effectuées en séquençant les ARNm produits par le biofilm dans différentes conditions de culture. Le transcriptome de la souche JAM1 dans le biofilm fut élaboré à partir des jeux de données d'expression et comparé au transcriptome de la souche JAM1 en culture axénique. Les changements d'expression des différentes voies métaboliques de la souche ont pu être calculés entre les cultures pures et le biofilm.

***Étude de la voie de dénitrification de la souche bactérienne
Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 provenant d'un
système de dénitrification d'eau de mer***

Articles

6. Présentation de l'article 1

Importance of the Two Dissimilatory (Nar) Nitrate Reductases in the Growth and Nitrate Reduction of the Methylophilic Marine Bacterium *Methylophilus* *nitratireducentescens* JAM1

L'importance de deux nitrate réductases (Nar) dans la croissance et la réduction du nitrate chez la bactérie méthylophile marine *Methylophilus nitratireducentescens* JAM1

Florian Mauffrey, Christine Martineau et Richard Villemur

FM : contribution principale à l'élaboration et la réalisation des expériences et à la rédaction de l'article.

CM : élaboration des expériences et rédaction de l'article.

RV : élaboration des expériences et rédaction de l'article.

Publié dans *Frontiers in Microbiology* le 24 Décembre 2015

Mention sur les changements exigés par le comité de revue

L'article fut accepté avec corrections mineures. La plupart des commentaires ne demandaient aucun ou de légers ajouts dans le texte après explications avec les réviseurs. Les données de transcriptomiques furent déposées dans une banque de données en ligne tel que demandé par les réviseurs afin de les rendre publiques.

6.1 Résumé

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 est la seule espèce du genre *Methylophaga* capable de croître dans des conditions anaérobies avec du nitrate comme accepteur d'électrons. Dans son génome se trouve une voie de dénitrification tronquée, qui se compose de deux nitrate réductases, Nar1 et Nar2; deux oxyde nitrique réductases, Nor1 et Nor2; et une oxyde nitreux réductase, Nos; mais pas de nitrite réductase (NirK ou NirS). Le transcriptome de la souche JAM1 cultivée dans des conditions anaérobies en présence de nitrate et de méthanol a montré que tous ces gènes étaient exprimés. Nous avons étudié l'importance de Nar1 et de Nar2 en créant des mutants *knockout* de *narG1* et/ou *narG2*. Les mesures du taux de croissance spécifiques et du taux de réduction de nitrate spécifique des mutants *knockout* JAM1 Δ *narG1* (Nar1) and JAM1 Δ *narG2* (Nar2) ont clairement démontré que les deux systèmes Nar contribuent à la croissance de la souche JAM1 en conditions anaérobies, chacun à des niveaux différents. Le mutant JAM1 Δ *narG1* a montré une importante diminution du taux de réduction de nitrate, influençant en conséquence sa croissance dans des conditions de culture anaérobies. Chez le mutant JAM1 Δ *narG2*, la mutation a induit un retard de 20h avant d'atteindre un taux de réduction du nitrate similaire à celui de la souche JAM1. La mutation de *narG1* n'a pas affectée pas l'expression de *narG2*. Par contre, l'expression du système Nar1 fut fortement sous-régulée en présence d'oxygène chez le mutant JAM1 Δ *narG2*. Ces résultats indiquent que Nar1 est la nitrate réductase la plus active chez la souche JAM1 mais que Nar2 semble réguler l'expression de Nar1.

6.2 Summary

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 is the only reported *Methylophaga* species capable of growing under anaerobic conditions with nitrate as electron acceptor. Its genome encodes a truncated denitrification pathway, which includes two nitrate reductases, Nar1 and Nar2; two nitric oxide reductases, Nor1 and Nor2; and one nitrous oxide reductase, Nos; but no nitrite reductase (NirK or NirS). The transcriptome of strain JAM1 cultivated with nitrate and methanol under anaerobic conditions showed the genes for these enzymes were all expressed. We investigated the importance of Nar1 and Nar2 by knocking out *narG1*, *narG2* or both genes. Measurement of the specific growth rate and the specific nitrate reduction rate of the *knockout* mutants JAM1 Δ *narG1* (Nar1) and JAM1 Δ *narG2* (Nar2) clearly demonstrated that both Nar systems contributed to the growth of strain JAM1 under anaerobic conditions, but at different levels. The JAM1 Δ *narG1* mutant exhibited an important decrease in the nitrate reduction rate that consequently impaired its growth under anaerobic conditions. In JAM1 Δ *narG2*, the mutation induced a 20-h lag period before nitrate reduction occurred at specific rate similar to that of strain JAM1. The disruption of *narG1* did not affect the expression of *narG2*. However, the expression of the Nar1 system was highly downregulated in the presence of oxygen with the JAM1 Δ *narG2* mutant. These results indicated that Nar1 is the major nitrate reductase in strain JAM1 but Nar2 appears to regulate the expression of Nar1.

6.3 Introduction

Methylophaga sp. are methylotrophic *Gammaproteobacteria* that are typically isolated from marine environments or brackish waters. They have a strict requirement for Na^+ for growth and use one-carbon compounds such as methanol or methylamine (but not methane) as sole carbon and energy sources with carbon assimilation proceeding via the 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase-variant of the ribulose monophosphate (RuMP) pathway (Boden, 2012). They all are strictly aerobic with the exception of *Methylophaga nitratreducenticrescens* JAM1, which can grow under anaerobic conditions by reducing nitrate into nitrite but does not reduce nitrite further (Auclair *et al.*, 2010, Villeneuve *et al.*, 2013). *M. nitratreducenticrescens* JAM1 was isolated from a denitrifying biofilm developed inside of the methanol-fed fluidized denitrification system used to treat seawater at the Montreal Biodome in Canada (Auclair *et al.*, 2010).

The nitrate-reducing activity of *M. nitratreducenticrescens* JAM1 is correlated with the presence and expression of two distinct dissimilatory Nar nitrate reductases (Nar1 and Nar2; Auclair *et al.*, 2010; Villeneuve *et al.*, 2013). Nar nitrate reductases are membrane-bound enzymes in which the catalytic subunit faces the cytoplasm and catalyzes the reduction of nitrate into nitrite for energy production (Bonney *et al.*, 1994). They are multimeric enzymes typically encoded by the *narGHJ* operon with *narGHI* encoding the subunits of the enzyme (Gonzalez *et al.*, 2006). The expression of the *narGHJ* operon is induced by a high concentration of nitrate and low concentration of oxygen. However, many counterexamples exist. In *M. nitratreducenticrescens* JAM1, the *narG1* and *narG2* genes have been shown to be expressed in the presence or absence of nitrate and oxygen in pure cultures, which indicates putative constitutive expressions of these genes under these conditions. However, only *narG1* expression was observed in the biofilm, which suggests differential expression mechanisms and roles for these two Nar systems (Auclair *et al.*, 2012). Although open reading frame (ORF) encoding a nitrite reductase (NirS- or NirK-type) was absent in strain JAM1 genome, gene clusters encoding two nitric oxide reductases (Nor1 and Nor2) and one nitrous oxide reductase (Nos) were found. The gene clusters encoding for these five reductases (Nar1, Nar2, Nor1, Nor2 and Nos) and constituting an incomplete denitrification pathway are located in close proximity in a 67 kb chromosomal region (Villeneuve *et al.*, 2013).

The importance of each Nar system in nitrate reduction and growth in *M. nitratireducenticrescens* JAM1 was assessed by generating *narG1* and *narG2* knockout mutants of strain JAM1. These mutants were tested for their abilities to grow and reduce nitrate under different conditions. Changes in the expression levels of the two *narGs* were then measured by reverse transcription-real-time PCR (RT-qPCR). We also measured the effects of such mutations on the expression levels of the nitrate transporter genes *narK*. Our results revealed that the two Nar systems contribute to growth and nitrate reduction but at different levels. Furthermore, the transcriptome of *M. nitratireducenticrescens* JAM1 that was grown under anaerobic conditions was derived to assess the expression level of the denitrification genes. Our results showed that the *nar1* gene cluster was eight times more expressed than the *nar2* gene cluster. Determination of the importance to these two nitrate reductases will help to decipher some of the mechanisms of denitrification in a marine environment.

6.4 Materials and Methods

6.4.1 Bacterial Strains and Growth Conditions

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 (ATCC BAA-2433T, DSM 25689T) and the knockout mutants were cultured in the *Methylophaga* medium 1403 (Villeneuve *et al.*, 2013). This medium contained 37 mM ammonium chloride. After autoclaving, methanol, solution T, Wolf's mineral solution, vitamin B12 and nitrate were added under sterile conditions. Aerobic cultures were made in 200-ml Erlenmeyer flasks with constant shaking at 350 rpm. For the cultures under anaerobic conditions, 30 ml of non-sterile 1403 medium was dispensed into 70-ml serum bottles, which were then flushed for 15 min with N₂ to remove oxygen from the headspace. The bottles were sealed with rubber stoppers and metal seals and autoclaved. Inoculum was made of fresh aerobic culture without nitrate to reach an optical density (OD_{600nm}) of 0.025. Nitrate was added as sodium nitrate (NaNO₃) at a final concentration of 40 mM. Biological replicates were conducted for all growth experiments and experiments were repeated once on a different day. The maximum specific growth rates were derived by non-linear regression with the Monod equation (Healey, 1980).

Bacterial growth was monitored by spectrophotometry (OD_{600nm}). Samples were homogenized prior to measurements with a Potter-Elvehjem homogenizer to disperse flocs, which appeared in aerobic cultures of all strains. Nitrate and nitrite concentrations were determined by ion chromatography using the 850 Professional IC (Metrohm, Herisau, Switzerland) with a Metrosep® A Supp 5 analytical column (250 mm × 4.0 mm). For the N_2O reduction culture assays, strain JAM1 was cultured under anaerobic conditions with 40 mM $NaNO_3$ and 100 μ mol N_2O injected in the headspace (3500 ppmv). Headspace accounted for approximately 40 ml, half of the total volume of the flask. N_2O concentration in the headspace was determined by gaseous chromatography using an Agilent 7890B series GC Custom (SP1 option 7890-0504/0537) with a Haye Sep Q80/100 column. N_2O was detected with an electron capture detector.

6.4.2 Construction of the *Knockout* Mutants

A protocol modified from Thongdee *et al.* (2008) was used to construct the JAM1 $\Delta narG1$ and the JAM1 $\Delta narG2$ mutants. The upstream and downstream regions of *narG1* and *narG2* were amplified and subsequently fused together with two rounds of PCR (Supplementary Image S1). The JAM1 $\Delta narG1 narG2$ double mutant was obtained using the same protocol with JAM1 $\Delta narG1$ as the host strain.

The first round of PCR was performed in a 50- μ l reaction volume with the ThermoPol® Buffer (New England Biolab), 10 μ g bovine serum albumin (BSA), 200 μ M deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 100 pmol of each primer (Supplementary Table S1), 100 ng of strain JAM1 DNA and 1.25 U of Taq DNA polymerase. PCR was performed at 95°C for 30 s, followed by 30 cycles at 95°C for 30 s, 63.5°C or 64°C for 45 s for the $\Delta narG1$ or $\Delta narG2$ constructions, respectively, 68°C for 30 s (Supplementary Table S1), and a final extension period of 10 min at 68°C. The second round of PCR was performed with the same PCR reagents, 50 ng of each of the first round amplicons and 100 pmoles of the *narG1-upF/narG1-dnR* or *narG2-upF/narG2-dnR* primers (Supplementary Table S1). However, these primers were added only after the third PCR cycle to allow the two amplicons to join together. PCR was then performed as in the first PCR round. The expected DNA fragments were extracted by agarose gel electrophoresis and purified using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

(Promega). The fragments were ligated into the pEX18Gm plasmid vector (Hoang *et al.*, 1998) via *SacI* and *Bam*HI for the *narG1* knockout mutant and *Eco*RI and *Pst*I for the *narG2* knockout mutant. The DNA constructions were then cloned in *Escherichia coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 2001) and screened for gentamicin-resistant clones. Plasmid DNA was extracted from the representative clones, and the presence of the insert in the plasmid was verified by enzymatic digestion with *SacI* and *Bam*HI or *Eco*RI and *Pst*I.

The respective constructions were electroporated in strain JAM1 (or in the JAM1 Δ *narG1* mutant for the double mutant) using the following protocol: strain JAM1 was cultured for 24 h to reach an OD_{600nm} of 0.6; 1 ml of the culture was centrifuged at 12,000 \times g for 1 min; the cells were washed five times with 300 mM of a sucrose solution to remove all salts and then concentrated in 100 μ l of sucrose solution; the electroporation was performed on ice with 100 μ l of bacterial cells and 100 ng of plasmid DNA at 2500 V; after the electric shock, the cells were transferred in the 1403 medium and incubated at 30°C for 4 h and then centrifuged and plated on 1403 agar medium supplemented with gentamicin (50 μ g/ml); the resistant colonies were transferred in 1403 medium supplemented with 50 μ g/ml of gentamicin; and the simple recombinants were plated on 1403 agar medium supplemented with sucrose (10%) to isolate the double recombinants using the sucrose sensitivity gene *sacB* of pEX18Gm. The gene arrangements of the knockout mutants were confirmed by PCR. Attempts to do complementation assays in the mutants by electroporation or by conjugation with the MiniCTX1, MiniCTX2, and pUC18-miniTn7 integrative vectors were unsuccessful.

6.4.3 RNA Extraction

To measure the transcriptional level of *narG1*, *narG2*, *narK1*, and *narK12f* by RT-qPCR, total RNA was extracted from strain JAM1 and the JAM1 Δ *narG1* and JAM1 Δ *narG2* mutants that were cultivated under the following conditions: (1) aerobic without nitrate, (2) aerobic with nitrate and (3) anaerobic with nitrate. Total RNA from strain JAM1 (anaerobic conditions with nitrate) was also used to investigate the possible co-transcription of *narK1narK2* and *nar[1]GHJI*, of *nar[2]GHJI* and *ppi*, and of *ppi* and *narK12f*. In all cases, samples (5–30 ml) were taken during the exponential growth phase (20–24 h of incubation). The bacteria were centrifuged and dispersed in the

extraction solution (composed of 500 µl of phenol-Tris-HCl, pH 4.3 and 1.5 ml of 50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, and 150 mM NaCl) and placed into 2-ml tubes containing 250 mg of 0.2 mm glass beads. The samples were then flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction.

After thawing, RNA was extracted by bead beating twice for 20 s with a FastPrep-24® (MPTM) set at 4.0. The tubes were then centrifuged at 16,000 × g for 15 min at 4°C, and 500 µl of the upper phase was extracted three times with a phenol/chloroform/isoamyl alcohol mix (25:24:1) and one time with chloroform/isoamyl alcohol (24:1). The RNA was then recovered by precipitation with 100 µl of 10 M ammonium acetate and 800 µl of 100% ethanol. After centrifugation at 16,000 × g for 15 min at 4°C, the supernatant was discarded, and the pellet was dried at room temperature. Finally, the RNA was dissolved in DEPC-treated water and stored at 4°C. The RNA extracts were treated twice with Turbo™ DNase (Ambion) for 30 min to remove all contaminant DNA. The absence of DNA was verified by end-point PCR. Extractions were made separately from three independent samples.

6.4.4 *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 Transcriptome

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 transcriptome was derived from total RNA extracted of anaerobic cultures with methanol and 40 mM nitrate. RNA was sent to McGill University and Génome Quebec Innovation Centre for RNA sequencing by Illumina method. The Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits (Meta-Bacteria; Epicentre, Madison, WI, USA) were used to deplete total RNA of the ribosomal RNA. The RNA was then treated with the TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). A total of 51,351,358, 49,962,176, and 52,021,554 reads were obtained for the three replicates after sequencing. All computations were made on the supercomputer Briarée from the Université de Montréal, managed by Calcul Québec and Compute Canada. Raw RNA-seq files have been deposited in the NCBI database (accession number SRP066381). Raw reads were filtered to remove low quality reads using FASTX toolkit1 by discarding any reads with more than 10% nucleotides with a PHRED score <20. Reads were then aligned with the reference genome *M. nitratireducenticrescens* JAM1 (GenBank accession number CP003390) using Bowtie (v

2.2.3) with default parameters. SAMtools (v 0.1.18) and BEDtools (v 2.20.1) were used for the generation of sam and bam files, respectively. The GC content of JAM1 genes was also calculated using BEDtools (v 2.20.1), prior to normalization. Normalization of the read count was done using the RPKM normalization function of the NOIseq package in R (Tarazona *et al.*, 2011). To exclude features with low read counts, a low count filter was applied using a CPM method with a CPM value of 1 and a cutoff of 100 for the coefficient of variation.

Non-ribosomal RNA reads were associated with 3,095 of 3,096 annotated genes. The number of reads in corresponding genes between replicate cultures varied in the percentage of standard variation (%SD: $SD \times 100 / \text{average number of reads}$) from 0 to 107%, with an average %SD of 12.2% and a median %SD of 9.7%. Only 48 annotated genes showed %SD above 40%. These results showed that, for the vast majority of genes, the expression pattern between replicates was consistent. Because methanol dehydrogenase is a key element of the metabolism in methylotrophs, the expression level of the reported genes in this study was normalized to the level of *mxoF* (10130 normalized reads), which was arbitrarily set at 100.

6.4.5 RT-PCR

One step RT-PCRs were performed using QIAGEN® OneStep RT-PCR Kits following the manufacturer's protocol with 200 ng of total RNA extracted from strain JAM1 and 100 pmoles of the primers *narK2-narG1-F/narK2-narG1-R*, *narI2-Ppi-F/narI2-Ppi-R*, or *Ppi-narK12f-F/Ppi-narK12f-R* (Supplementary Table S2). Briefly, the reaction began with a reverse transcription step of 30 min at 50°C followed by an initial PCR activation step of 15 min at 95°C. Next, 30 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 60°C and 1 min at 72°C were performed with a final extension step of 10 min at 72°C. The amplicons were visualized by agarose gel electrophoresis and revealed by ethidium bromide staining. Negative controls were RT-PCR carried out with no template.

6.4.6 RT-qPCR Assays

cDNAs were generated from the RNA using hexameric primers and the Reverse Transcription System from Promega (Madison, WI, USA) with 1 µg of RNA extract. Real-time quantitative PCR assays were performed with the PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix ROXTM (Quanta). The final volumes of all reactions were 20 µl, and the amplification mix was composed of 10 µl of PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix, 0.4 µl of each primer (40 pmoles; Supplementary Table S2), 4.2 µl of RNA-free water and 5 µl of cDNA (25 ng). All reactions were performed in a Rotor-Gene 6000 real-time PCR machine (Corbett Life science). PCR began with an initial denaturation step of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95°C, 15 s at 60°C, and 20 s at 72°C. To confirm the purity of the amplified products, a melting curve was performed by increasing the temperature from 65 to 95°C in increments of 1°C per step with a pause of 5 s for each step. The reference genes used were *dnaG* (primase; locus tag: Q7A_342), *rpoD* (sigma factor, Q7A_343) and *rpoB* (RNA polymerase β subunit, Q7A_2329; Supplementary Table S2). These genes were retrieved from the strain JAM1 genome sequence (GenBank accession number CP003390). All genes for each sample were tested in a single run. The amplification efficiency was tested for each set of primer pairs by qPCR with a dilution of strain JAM1 DNA as the template. The amplification efficiencies for all primer pairs varied between 0.9 and 1.1.

6.4.7 Relative Quantification

Relative quantifications were performed according to the $\Delta\Delta C_T$ method (Livak *et al.*, 2001). For each quantification calculation, only one reference gene was used as a control. The reference gene was chosen from among the three genes tested based on the lowest variability according to geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), Normfinder (Andersen *et al.*, 2004), BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) and the comparative $\Delta\Delta C_T$ method (Silver *et al.*, 2006). A final recommended comprehensive ranking was created from the geometrical means of the weights assigned by the four tests to allow for the selection of the appropriate control gene. The Prism software (version 5.00) was used for the statistical analyses, and significance was determined according to Student t-tests of the ΔC_T s (α value = 0.05).

6.4.8 Fnr and NarL DNA-Binding Motifs

The genomic sequence of *M. nitratireducenticrescens* JAM1 was analyzed in the upstream sequence of the *narX*, *narK1*, *narG2*, and *narK12f* for potential transcription factor binding sites (TFBSs) of Fnr/Anr and NarL regulators using the Virtual Footprint software of PRODORIC (Munch *et al.*, 2005). Briefly, the software allowed the analysis of promoter sequences with position weight matrices (PWMs) of known TFBSs from the PRODORIC database². A score was assigned to hits depending on the degrees of matches with the PWM. Potential regulator binding sequence scores were calculated with PWM. Threshold scores of 3.7, 5.0, and 7.0 were considered according to mean scores of PWMs for NarL (*E. coli*), NarL (*Pseudomonas aeruginosa*), and Fnr (*E. coli*), respectively.

6.5 Results

6.5.1 The Chromosomic Arrangement of the Denitrification Genes and their Expression under Anaerobic Conditions

The two *narGHJI* operons (*nar[1]GHJI* and *nar[2]GHJI*) that encode the Nar1 and Nar2 systems, respectively, are in close proximity and in opposite directions (Figure 6.1). Two ORFs encoding NarK transporters were found upstream of the *nar[1]GHJI* operon, and they corresponded, respectively, to the *NarK1*-type and *NarK2*-type transporters. *NarK1* is a nitrate/proton symporter that uses the proton motive force to transport nitrate molecules into the cytoplasm, whereas *NarK2* is a nitrate/nitrite antiporter that is able to uptake a nitrate molecule into the cytoplasm by releasing a nitrite molecule into the periplasm (Moir *et al.*, 2001). The *narK* genes can be found upstream of the *narGHJI* operon in a large number of denitrifiers, and some species have a pair of *narKs* at this position, as in strain JAM1 (Schreiber *et al.*, 2007). Another ORF encoding a fused *NarK1-NarK2* transporter (here named *narK12f*) is located downstream of the *nar[2]GHJI* operon (Goddard *et al.*, 2008). Between the *narK12f* and the *nar[2]GHJI* operons is an ORF encoding a parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase (*ppi*). This type of protein is known to be involved in protein folding (Gothel *et al.*, 1999). To highlight the potential co-transcription of *narK1narK2* and *nar[1]GHJI*, of *nar[2]GHJI* and *ppi*, and of

ppi and *narK12f*, pairs of primers were designed to target the intergenic sequences of *narK2-narG1* (40 nt), *narI2-ppi* (17 nt) and *ppi-narK12f* (18 nt) with RT-PCR. RT-PCR products were obtained for the intergenic regions of *narK2-narG1* but not for the intergenic region of *narI2-ppi* and of *ppi-narK12f* (Supplementary Image S2), which suggests co-transcription of *narK1narK2* with *nar[1]GHJI*. Upstream of *narK1narK2nar[1]GHJI* are two ORFs that encode a two-component system similar to the nitrate/nitrite sensor system NarXL. The expressions of many genes are under control of this two-component system in *E. coli*, including the nitrate transporter *narK* and *narGHJI* (Li *et al.*, 1994). NarL potential binding sites were found upstream of *narK1narK2nar[1]GHJI*, *nar[2]GHJI*, and *narXL* (Table 6.1). Strain JAM1 contains, in addition to the two *nar* gene clusters, two gene clusters predicted to encode two nitric oxide reductases (Nor) and one nitrous oxide reductase (Nos; Figure 6.1). Based on automated annotation, we reported previously that a small ORF (Q7A_474) encodes a truncated NirK (Villeneuve *et al.*, 2013). Scrupulous analyses of this sequence revealed that it encodes a 137 amino acid protein with a cytochrome c binding site (CXXCH). Among the most related sequences are some NirK that contain this domain (Ellis *et al.*, 2007). However, we did not find any related domains (e.g., copper binding sites) specific to NirK, which suggested that this ORF encodes cytochrome c. Sequence homology analyses in databases were negative for potential NirS/NirK in the strain JAM1 genome.

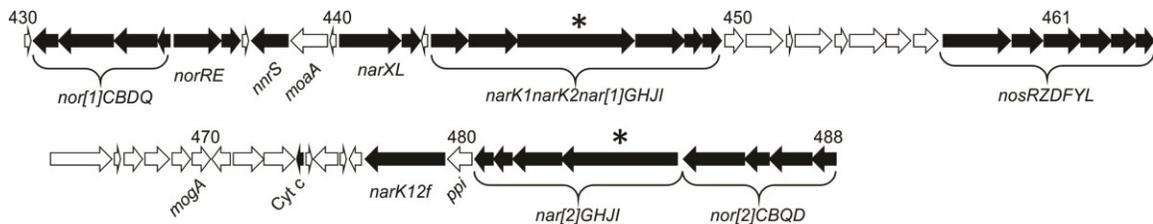


Figure 6.1: Gene arrangement of the 67 kbp region containing all of the denitrification genes
Sequences and annotations are from GenBank accession number CP003390.2. The numbers above the gene arrangement are the tag locus numbers (Q7A_0430 to Q7A_488).
* The corresponding *narG* that were mutated to derive the knockout mutants. See Supplementary Table S3 for the description of the 58 genes and the relative level of transcript reads.

Based on the transcriptome analysis, the gene expression level of the *nar1* gene cluster under anaerobic conditions is approximately eightfold higher than the *nar2* gene cluster and *narK12f* (Table 6.2). Despite the absence of a gene encoding nitrite reductase to generate NO, gene clusters encoding Nor1 and Nos were expressed at higher levels than the two *nar* gene clusters (Table 6.2). These results suggested that strain JAM1 can reduce NO and N₂O. Indeed, strain JAM1 cultured under anaerobic conditions with nitrate and N₂O can completely reduce N₂O in 24 h (Figure 6.2). Genes involved in the NO stress response, *nsrR* (two ORFs), *nnrS* (three ORFs) and *dnrN*, were found (Table 6.2), and all were expressed. NsrR is a transcriptional repressor from the Rrf2 family and it regulates the expression of multiple genes, such as *norB* in response to NO (Spiro, 2011, Wang *et al.*, 2008). NnrS and DnrN are involved in protection against NO damage (Heurlier *et al.*, 2008, Stern *et al.*, 2013). These results suggested that strain JAM1 possesses different mechanisms, already expressed under anaerobic conditions, in response to potential NO damage.

Table 6.1: Sequences of potential NarL and ANR binding sites

Upstream sequence	Site	Distance (nt)*	Score	Sequence
<i>narK1nar</i>	NarL	40	3.87	TACCGTT
<i>K2nar[1]GHJI</i>	NarL	57	3.76	TACTCTA
	NarL	34	3.72	TACATCA
<i>nar[2]</i>	NarL	129	5.25	TACCGAT
	<i>GHJI</i>	NarL	71	5.02
<i>narXL</i>	NarL	274	3.98	TACCGAT
	NarL	38	3.88	TACACCT
	NarL	134	3.79	TACTGTT
	NarL	232	5.35	TGCCGCT
	FNR/ANR	92	7.62	TTGATCAGGATCAA

*Upstream sequence were analyses with position weight matrices of known NarL binding sequence in Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli from the PRODORIC database. *Distance from the start codon.*

6.5.2 Effects of the Knockout Mutations of *narG1* and *narG2* on Growth and on Nitrate Reduction

The investigation of the importance of each Nar system in strain JAM1 was possible by establishing a knockout mutation protocol. The construction of single gene knockout mutants of the two *narGs* and a *narG1narG2* double mutant was achieved. The effects of each mutation on growth and nitrate reduction were investigated under three different conditions: aerobic without nitrate, aerobic with nitrate and anaerobic with nitrate (Figure 6.3). Under aerobic conditions with nitrate (Figures 6.3A–C), strain JAM1 and the three mutants exhibited similar growth patterns (Figure 6.3A). Only the JAM1 Δ *narG1narG2* double mutant cultures presented with a higher growth yield in the stationary phase. This growth yield was also reached by all strains when they were cultured under aerobic conditions without nitrate (Figure 6.3A). The deletion of *narG1* (JAM1 Δ *narG1*) resulted in an 81% decrease in the nitrate specific reduction rate relative to strain JAM1, and the deletion of *narG2* (JAM1 Δ *narG2*) resulted in a 36% reduction.

In contrast to the observations under aerobic conditions, strain JAM1 and the three mutants exhibited distinct growth patterns when cultured under anaerobic conditions (Figure 6.3D). The JAM1 Δ *narG1narG2* double mutant exhibited a minimal level of growth which was also observed in the anaerobic nitrate-free culture controls (Figure 6.3D). Therefore, this growth was likely the result of residual O₂ contained in the complement solution or introduced during sampling. The lack of the *narG2* gene led to a lower growth rate of the JAM1 Δ *narG2* mutant, but the growth yield reached by this mutant was similar to that of strain JAM1. The JAM1 Δ *narG1* mutant also exhibited a much lower growth rate, and did not reach the same maximum growth yield reached by the JAM1 Δ *narG2* mutant and strain JAM1 after 55 h of culture. All cultures reached the stationary phase after 31 h of incubation.

The nitrate consumption of each strain appeared to be correlated to growth (Figure 6.3E). Strain JAM1 reduced all of the nitrate contained in the medium within only 40 h with no delay, although the precultures were grown under aerobic conditions without nitrate. The JAM1 Δ *narG2* mutant only began to reduce nitrate after 20 h of incubation, which corresponded to the beginning of its exponential growth phase. Total nitrate reduction was achieved after 55 h of incubation. The JAM1 Δ *narG1* mutant also exhibited a delay in nitrate reduction, which began after 23 h of incubation. The reduction of nitrate was still occurring during the late stationary phase. In all conditions,

nitrite accumulated proportionally to nitrate reduction (Figures 3C,F). Finally, no reduction of nitrate or the production of nitrite was observed for the *JAM1ΔnarG1narG2* double mutant under aerobic or anaerobic conditions, which demonstrated that no other dissimilatory nitrate reduction enzymes were active in strain *JAM1*, as predicted by the genome sequence.

Table 6.2: Relative level of transcriptomic reads of the denitrification genes

Reads: Number of normalized reads

*based on *mxnF* (10130 normalized reads) set at 100

NnrS: protein involved in response to NO; NsrR: Nitrite-sensitive transcriptional repressor;

Anr: transcriptional regulator; DnrN or NorA: Nitric oxide-dependent regulator

Information was based on GenBank annotations (CP003390)

Locus tag	Reads	Relative to <i>mxnF</i> *	Gene name	Locus tag	Reads	Relative to <i>mxnF</i> *	Gene name
Nitrate reductase (Nar1), regulator and transporter				Nitrate reductase (Nar2) and transporter			
Q7A_0441	589	5.8	<i>narX</i>	Q7A_0479	101	1.0	<i>narK12f</i>
Q7A_0442	511	5.0	<i>narL</i>	Q7A_0480	81	0.8	<i>ppi</i>
Q7A_0444	959	9.5	<i>narK1</i>	Q7A_0481	70	0.7	<i>narI</i>
Q7A_0445	591	5.8	<i>narK2</i>	Q7A_0482	117	1.2	<i>narJ</i>
Q7A_0446	871	8.6	<i>narG</i>	Q7A_0483	99	1.0	<i>narH</i>
Q7A_0447	697	6.9	<i>narH</i>	Q7A_0484	164	1.6	<i>narG</i>
Q7A_0448	948	9.4	<i>narJ</i>				
Q7A_0449	794	7.8	<i>narI</i>				
Nitric oxide reductase (Nor1)				Nitric oxide reductase (Nor2)			
Q7A_0431	188	1.9	<i>norQ</i>	Q7A_0485	59	0.6	<i>norD</i>
Q7A_0432	268	2.7	<i>norD</i>	Q7A_0486	116	1.1	<i>norQ</i>
Q7A_0433	1432	14.1	<i>norB</i>	Q7A_0487	121	1.2	<i>norB</i>
Q7A_0434	1618	16.0	<i>norC</i>	Q7A_0488	195	1.9	<i>norC</i>
Q7A_0435	482	4.8	<i>norR</i>				
Q7A_0436	455	4.5	<i>norE</i>				
Nitrous oxide reductase (Nos)				Genes related to denitrification			
Q7A_0458	994	9.8	<i>nosR</i>	Q7A_0438	511	5.0	<i>nnrS</i>
Q7A_0459	1473	14.5	<i>nosZ</i>	Q7A_0066	830	8.2	<i>nnrS</i>
Q7A_0461	490	4.8	<i>nosD</i>	Q7A_1801	426	4.2	<i>nnrS</i>
Q7A_0462	280	2.8	<i>nosF</i>	Q7A_0067	2315	22.8	<i>nsrR</i>
Q7A_0463	262	2.6	<i>nosY</i>	Q7A_0409	138	1.4	<i>nsrR</i>
Q7A_0464	311	3.1	<i>nosL</i>	Q7A_0068	3481	34.4	<i>dnrN</i>
				Q7A_0307	401	4.0	<i>anr</i>

Mass balance analysis of nitrate reduction and nitrite accumulation in strain JAM1 and the single mutants cultured under anaerobic conditions (Figure 6.3) showed 7% decrease in average nitrite concentration over 55 days ($0.05 \text{ mM NO}_3\text{-NO}_2$ reduced h^{-1}), with no apparent decrease in the abiotic controls. This slight decrease could be the result of the nitrate assimilation pathway present in strain JAM1 genome, and concurred with the low number of reads corresponding to this pathway present in the transcriptome (data not shown).

Strain JAM1 and the *JAM1 Δ *narG1** and *JAM1 Δ *narG2** mutants were cultured under anaerobic conditions with different concentrations of nitrate to derive the maximum specific growth rates and the half-saturation constants of nitrate for growth (μ_{max} and K_s ; Figure 6.4). The μ_{max} of the *JAM1 Δ *narG1** and *JAM1 Δ *narG2** mutants were 3.2 and 2.2 times lower than the μ_{max} of strain JAM1, respectively (Table 6.3), which suggest additive effect of both Nar systems for growth. To assess the affinities of strain JAM1 and the mutants toward nitrate for growth, the μ_{max}/K_s ratios were calculated (Healey, 1980). These ratios were in same order of magnitude ranging from 1.0 to 3.1.

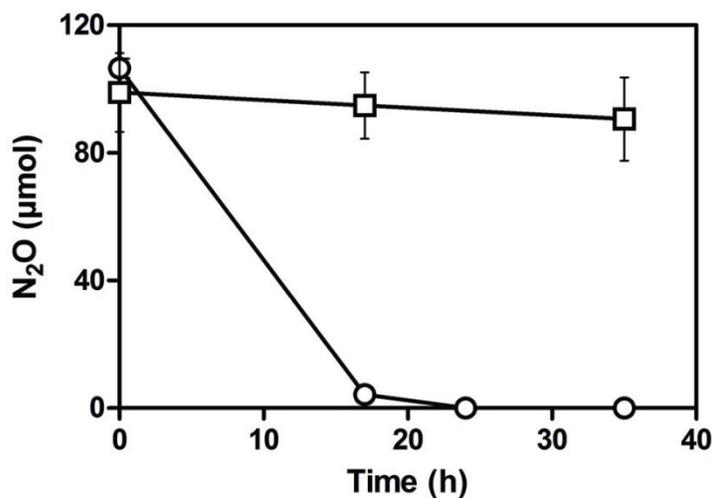


Figure 6.2: N₂O reduction by strain JAM1

Strain JAM1 was cultured in triplicate under anaerobic conditions with nitrate (40 mM) and N₂O (circle). A control with no biomass was also conducted (square).

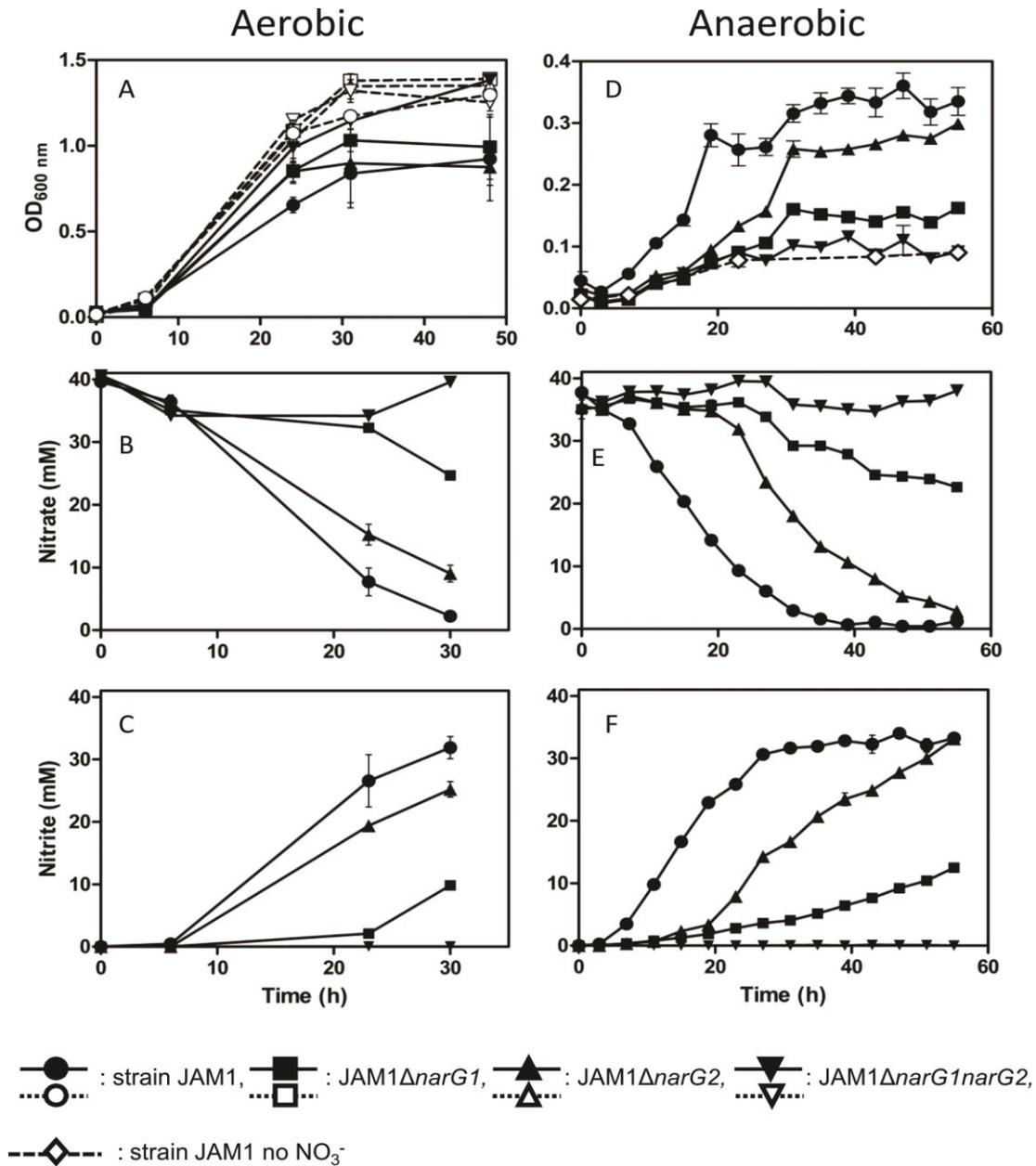


Figure 6.3: Growth, nitrate reduction and nitrite production in cultures of strain JAM1 and the derivative narG mutants.

Strain JAM1 and the narG mutants were cultured under aerobic conditions without nitrate (A, dot lines), under aerobic conditions with nitrate (A–C, solid lines) or under anaerobic conditions with nitrate (D–F, solid lines). Control with strain JAM1 and no nitrate was also conducted under anaerobic conditions (D, diamond with dash line). (A) and (D) : Growth. (B) and (E): nitrate reduction. (C) and (F): nitrite production

6.5.3 Relative Expression Levels of *narG1*, *narG2*, *narK1*, and *narK12f*

Strain JAM1 and the JAM1 Δ *narG1* and JAM1 Δ *narG2* mutants were cultivated under aerobic conditions with or without nitrate and under anaerobic conditions, and the biomasses were collected at the end of the exponential phase when nitrate reduction activity was present in all strains. RT-qPCR assays were then performed to measure the relative transcript levels of the two *nar* gene clusters and *narK1* and *narK12f*. The transport of nitrate into the cytoplasm is a key parameter in nitrate reduction by membrane-bound nitrate reductases because the efficiency of nitrate reduction depends on their presence (Bonnefoy *et al.*, 1992, Clegg *et al.*, 2006, Ferguson, 1994, Moir *et al.*, 2001, Sohaskey *et al.*, 2003).

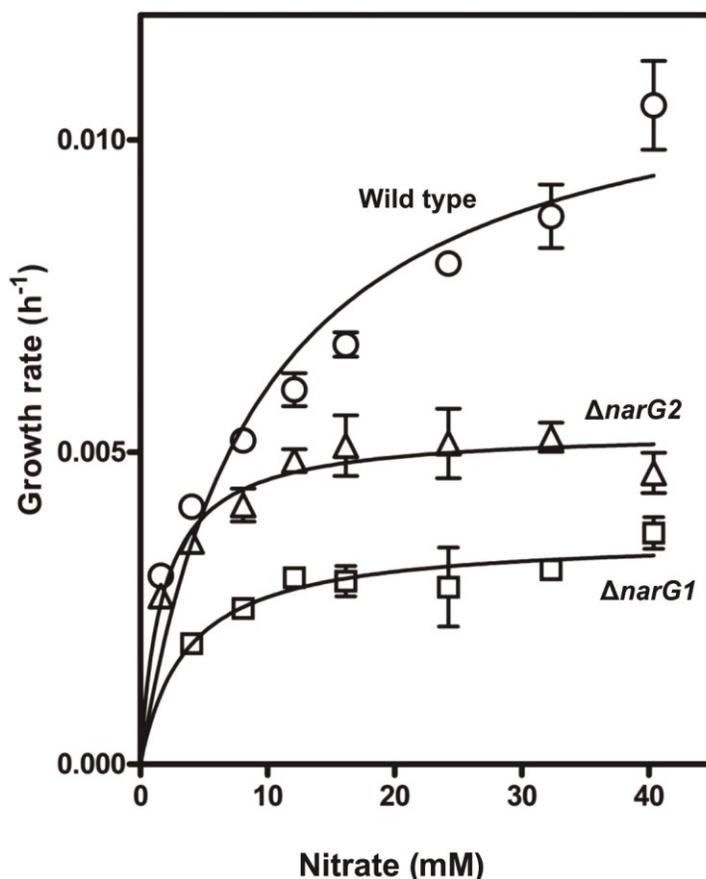


Figure 6.4: Specific growth rates

The specific growth rates of strain JAM1 and the *narG* mutants were derived from triplicate cultures of the same inoculum under anaerobic conditions.

The cultivation of strain JAM1 under aerobic conditions with nitrate led to a fourfold decrease in *narG1* and *narK1* expression (Figure 6.5A) relative to aerobic conditions without nitrate (reference culture set at one), whereas *narG2* and *narK12f* were expressed at a significantly greater level (eight and sevenfold increase, respectively) under anaerobic conditions. There were no significant differences in *narG2* expression levels between strain JAM1 and JAM1 Δ *narG1* under any of the culture conditions (Figure 6.5B), whereas slight significant variations occurred in the expression of *narK12f*. The *narK1* expression in JAM1 Δ *narG1* cultivated under anaerobic conditions with nitrate decreased by 11-fold relative to strain JAM1 cultivated under the same conditions. In JAM1 Δ *narG2* cultivated under aerobic conditions with or without nitrate, the level of *narG1* and *narK1* transcripts was much lower (25- and 27-fold decrease for *narG1* and 20- and 4-fold decrease for *narK1*, respectively) than those in strain JAM1 cultivated under the same conditions (Figure 6.5C). Finally, no significant change was observed in the expression levels of *narK12f* between JAM1 Δ *narG2* and strain JAM1 cultivated under any conditions (Figure 6.5C).

Table 6.3: Kinetics of growth and nitrate reduction under denitrifying conditions

μ_{\max} : maximum specific growth rates. K_s : half-saturation constants of nitrate for growth. Values between parentheses are standard deviation of triplicates.

	Strain JAM1	JAMI Δ <i>narG1</i>	JAMI Δ <i>narG2</i>
Specific growth rates			
$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	0.0116 (0.0008)	0.0036 (0.0003)	0.0053 (0.0002)
K_s (mM)	9.2 (1.9)	3.6 (1.2)	1.7 (0.4)
$\mu_{\max}/K_s(\text{mM}^{-1} \text{h}^{-1})$	1.3 (0.3)	1.0 (0.6)	3.1 (0.6)

6.6 Discussion

Genetic tools are essential for deciphering the different mechanisms of action of organisms. These tools are rarely readily available with new environmental bacterial species and they have to be derived from other systems or developed entirely. In this study, the investigation of the importance of the two Nar systems in strain JAM1 were possible by establishing a knockout mutation protocol. The strategy of building the *narG* gene knockout mutants was derived from that of Hoang *et al.* (1998), and this strategy has been successfully applied in *P. aeruginosa* (Colvin *et al.*, 2011, Deziel *et al.*, 2004, Jain *et al.*, 2014). This study is the first report of *Methylophaga* gene knockout mutants. The targeting strategy developed in our study will certainly allow for the determination of the involvements of different *Methylophaga* genotypes in future studies. However, other genetic tools such as integrative vectors for gene complementation or autonomous plasmids for gene regulation studies have still to be developed.

The presence of the two Nar systems could allow strain JAM1 to reduce more nitrate in a defined time, which produces more energy for the cells and thus allows faster growth. The inactivation of each of the two Nar systems clearly showed that both systems contributed to the growth of strain JAM1 under anaerobic conditions, but at different levels. The differences between the two mutants in growth rate and nitrate reduction could be explained by differences in specific activity of the two nitrate reductases, by higher concentration of the Nar1 system in the membrane, or both. The calculated μ_{max}/K_s ratios of the two mutants suggest that both Nar systems have similar specific activity toward nitrate for growth. On the other hand, the transcriptome of strain JAM1 cultivated under anaerobic conditions showed that the *nar1* gene cluster was eight times more expressed than the *nar2* gene cluster, suggesting higher concentration of the Nar1 system during these growth conditions. Interestingly, the Nar2 system seems to have another effect to the nitrate reduction dynamics as the lack of Nar2 action in JAM1 $\Delta narG2$ induced the 20-h lag time prior to nitrate reduction that occurred in this mutant by the Nar1 system when cultured under anaerobic conditions.

Strain JAM1 demonstrated a large capacity in nitrate reduction, even under aerobic conditions. This would suggest a constitutive expression of genes involved in nitrate reduction or the lack of a functional oxygen regulation response. The single mutants and the wild strain cultured under aerobic conditions without nitrate reached

higher growth yield than under aerobic conditions with nitrate (Figure 6.3A). These observations suggest that the nitrate and oxygen respiration systems in strain JAM1 compete with each other. This has also been suggested for *P. aeruginosa* (F. Chen *et al.*, 2003). This would explain the highest growth yield reached by the JAM1 Δ *narG1narG2* double mutant in aerobic cultures with or without nitrate (Figure 6.3A) as, without functional nitrate respiration, the oxygen respiration produced energy more efficiently. Competition between both respiration systems may explain the significant decrease of the *narG1* transcripts in strain JAM1 cultured under aerobic conditions with nitrate. Another suggestion would be that nitrite toxicity limits the growth of strain JAM1. Indeed, Auclair *et al.* (2010) showed a fourfold decrease in biomass when strain JAM1 was cultured aerobically in presence of 0.36 mM nitrite (no nitrate) at the beginning of the culture, and no growth occurred in the presence of 0.71 mM nitrite.

Oxygen and nitrate are known to regulate Nar expression in several bacteria. Fumarate and nitrate reductase regulation (FNR) protein family, an oxygen responsive transcription regulator, is known to be a major nitrate reductase regulator in several bacteria (Gunsalus *et al.*, 1994, Jordan *et al.*, 1997, Philippot *et al.*, 1999). Strain JAM1 encodes in its genome an ANR protein (Table 6.2), and one potential ANR binding site was found upstream of *narXL* (Table 6.1). Transcriptional regulation consistent with the presence of ANR/NarL was observed with the *nar2* gene cluster and *narK12f* under anaerobic conditions in strain JAM1, with an eightfold increase of their transcriptional level relative to the aerobic conditions (Figure 6.5A). Such a pattern was not observed with the *nar1* gene cluster, where *narG1* and *narK1* were not upregulated under anaerobic conditions compared to the aerobic conditions without nitrate. The high nitrate reduction capacity of strain JAM1 under both aerobic and anaerobic conditions suggests high level of the basal expression of nitrate reductases, in particular the Nar1 system (Table 6.2). However, in absence of the Nar2 system (JAM1 Δ *narG2*), gene expression of *narG1* and *narK1* (both are co-transcribed) was deeply affected (ca. 25-fold decrease) by the presence of oxygen. In presence of oxygen and nitrate, gene expression of *narG1* and *narK1* of strain JAM1 was also down regulated but at a lower extend (fourfold decrease). These results suggest that the Nar2 system contributes in the regulation of the expression of the Nar1 system in the presence of oxygen in strain JAM1. How this regulation occurs (directly or indirectly) is unknown. There is still the possibility that this effect is an artifact created by the gene deletion. Regulation by cis- or trans-regulatory elements from the vector was excluded, because the three mutants were generated by

double recombination and that no trace of the vector was found. Attempts to generate complement strains failed with three integrative vectors that were successfully used with other *Gammaproteobacteria*.

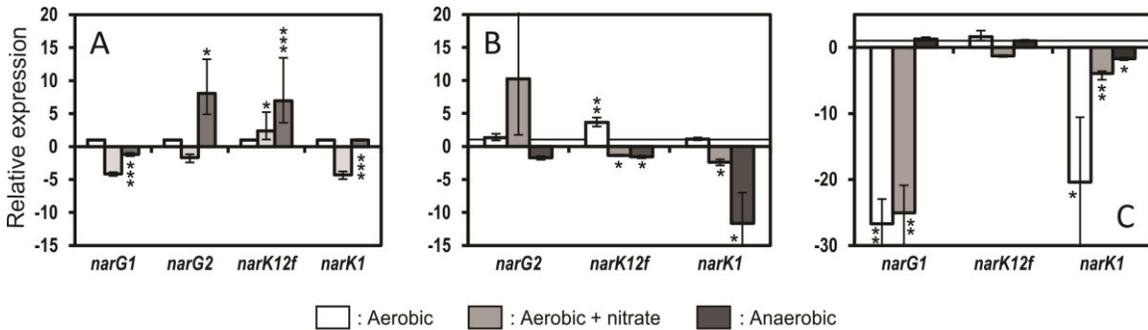


Figure 6.5: Relative expressions of *narG1*, *narG2*, *narK12f*, and *narK1*

Strain JAM1 (A), JAM1 Δ *narG1* (B) and JAM1 Δ *narG2* (C) were cultured in triplicate of the same inoculum under aerobic conditions with or without nitrate and under anaerobic conditions with 40 mM nitrate. Biomass was collected during the exponential phase, and total RNA was extracted for RT-qPCR assays. (A) Changes in the levels of *narG1*, *narG2*, *narK12f*, and *narK1* transcripts in strain JAM1 cultures under aerobic with nitrate and anaerobic conditions were calculated relative to their expressions under aerobic conditions without nitrate (set to one, white column). (B,C) Changes in the levels of *narG1*, *narG2*, *narK12f*, and *narK1* transcripts in the JAM1 Δ *narG1* and JAM1 Δ *narG2* cultures under the three conditions were calculated relative to their expressions in the strain JAM1 cultures under the respective conditions. Error bar represents standard deviation of triplicate values.

* 0.05 < P < 0.01; ** 0.01 < P < 0.001; *** P << 0.001

While it is not infrequent to find multiple nitrate reductases in a single bacterial species, the presence of multiple nitrate reductases of the same type has been reported only rarely in previous studies (Bonnefoy *et al.*, 1994, Chang *et al.*, 1999, Y. Chen *et al.*, 2011, Hartsock *et al.*, 2011, Potter *et al.*, 1999b). For instance, *E. coli* expresses two different cytoplasmic membrane nitrate reductases, nitrate reductase A (NRA) and nitrate reductase Z (NRZ), which are encoded by two different operons, *narGHJI* and *narZYWV*, respectively (Bonnefoy *et al.*, 1994). The roles of these two Nar systems in the cell appear to be distinct because NRA reduction activity accounts for 98% of all of the nitrate reduction activity of *E. coli*. The expression of *narGHJI* is positively controlled by nitrate concentration through the NarXL two-component system and is strongly repressed by oxygen. Unlike what was observed in strain JAM1, growth of the *E. coli* Δ *narZ* mutant expressing only the NRA system is similar to that of the wild type strain in minimal medium in which nitrate is the sole final electron acceptor, while the *E. coli* Δ *narG* mutant expressing only the NRZ system is unable to grow under these conditions

(Potter *et al.*, 1999b). In *Hyphomicrobium zavarzinii* that also encodes two Nar systems, the expression of only one *nar* gene cluster was deeply downregulated by oxygen (Martineau *et al.*, 2015).

Although in pure culture, strain JAM1 accumulated nitrite, in the denitrifying biofilm, where it was isolated, nitrite is most likely processed by other denitrifying bacteria such as *H. nitrativorans* NL23, the second most represented bacteria in the biofilm (Auclair *et al.*, 2012, N. Labbé *et al.*, 2007, Martineau *et al.*, 2013b). Both bacteria are methylotroph, but assimilate differently the carbon. *Methylophaga sp.* process methanol via the RuMP pathway, whereas *Hyphomicrobium sp.* via the serine pathway. Other denitrifying bacteria were found in the biofilm but they represented less than 1% of total bacteria (data not shown). One model is that syntrophy was established in the biofilm between *M. nitratireducenticrescens* JAM1 and *H. nitrativorans* NL23 for denitrification. Also, because *Methylophaga sp.* are known to produce the osmo-protectant ectoine (Doronina *et al.*, 2010), strain NL23 would have been protected against osmotic stress as it is intolerant to seawater in pure culture (Martineau *et al.*, 2015, Martineau *et al.*, 2013b). Genes involved in the production of ectoine were found among the most expressed in strain JAM1 pure culture (*ectABC*: 35–49 relative to *mxoF*).

6.7 Conclusion

The transcriptional level of *nar1* was higher than *nar2* in strain JAM1 cultured under anaerobic conditions. The absence of the Nar1 system had a more negative effect on the growth rate and nitrate reduction rate than the absence of Nar2. These results suggested that the Nar1 system is the major nitrate reductase in strain JAM1. However, the Nar2 system appears to contribute in the regulation of the expression of the Nar1 system. Its absence induced a 20-h lag time in nitrate reduction. At the gene level, the *nar1* gene cluster is deeply downregulated by oxygen in the absence of the Nar1 system. In contrast, the absence of the Nar1 system did not affect the level of the *nar2* transcripts. New knowledge generated in this study about the importance of the two dissimilatory (Nar) nitrate reductases in *M. nitratireducenticrescens* JAM1 could allow for

a better understanding of the denitrification pathway within the biofilm microbial population where strain JAM1 was isolated.

6.8 Funding

This project was financially supported by a grant to RV from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and by scholarships to CM from the Fondation Universitaire Armand-Frappier and the Fonds de Recherche du Québec Nature et Technologies. Supercomputer infrastructure of Calcul Québec and Compute Canada was funded by the Canada Foundation for Innovation, Ministère de l'Économie, de l'Innovation et des Exportations du Québec and the Fonds de Recherche du Québec - Nature et technologies (FRQ-NT).

6.9 Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6.10 Acknowledgment

We thank Karla Vasquez and Marie-Christine Groleau for their technical assistance.

7. Présentation de l'article 2

Reduction of nitric oxide (NO) and nitrous oxide (N₂O) by the methylotrophic, marine bacterium *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1

Réduction de l'oxyde nitrique (NO) et de l'oxyde nitreux (N₂O) par la bactérie marine et méthylotrophe *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1

Florian Mauffrey, Philippe Constant, and Richard Villemur

FM : contribution principale à l'élaboration et la réalisation des expériences et à la rédaction de l'article.

PC : aide sur l'élaboration des expériences et conseils.

RV : élaboration des expériences et rédaction de l'article.

Soumis après corrections à *Applied and Environmental Microbiology*

7.1 Résumé

Methylophaga nitratireducentescens JAM1 est une bactérie marine isolée à partir d'un biofilm marin. Elle peut croître en conditions anaérobies en réduisant le nitrate en nitrite. Le nitrite produit n'est pas réduit en oxyde nitrique (NO), ce qui est corrélé avec l'absence d'une nitrite réductase dissimilatoire. Par contre, le matériel génétique nécessaire à la réduction de l'oxyde nitrique (Nor1 et Nor2) et de l'oxyde nitreux (N₂O; Nos) est présent dans son génome. Dans cette étude, nous avons démontré que la souche JAM1 était capable de réduire le NO et le N₂O en conditions aérobies et anaérobies. De plus, la souche JAM1 était aussi capable de croître en conditions anaérobies avec du N₂O comme seule source d'énergie. Pendant l'étude, nous avons observés la capacité de la souche JAM1 à produire du N₂O en phase stationnaire quand elle est mise en culture avec du nitrate. Nous avons trouvé que le nitrite était un intermédiaire clé de cette production. De même, de l'hydroxylamine est produite par la souche JAM1 et est liée à la production de N₂O. Des expériences de marquage isotopique avec des cultures supplémentées en ¹⁵NO₃⁻ ou ¹⁵NH₄⁺ que plus de 95 % du N₂O produit par la souche JAM1 provenait du nitrite. Par ailleurs, nous avons démontré que la succession des phases de production et de consommation du N₂O en conditions anaérobies est corrélée avec des changements dans les niveaux d'expression des gènes *nor* et *nos*. Nos résultats suggèrent que *M. nitratireducentescens* JAM1 peut participer à la réduction du NO et du N₂O dans le biofilm.

7.2 Summary

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 is a marine methylotrophic bacterium isolated from a denitrifying biofilm. It can sustain growth under anaerobic conditions by reducing nitrate into nitrite. Nitrite is not reduced in nitric oxide (NO), which correlates with the absence of dissimilatory nitrite reductase. However, the genetic material necessary for the reduction of nitric oxide (Nor1 and Nor2) and of nitrous oxide (N₂O; Nos) is present in its genome. In this study, we demonstrated that the reduction of NO and N₂O occurred in strain JAM1 cultures under both aerobic and anaerobic conditions. Furthermore, strain JAM1 was also able to grow under anaerobic conditions using N₂O as the sole energy source. During the investigation, we observed the ability of strain JAM1, when cultured with nitrate, to produce N₂O during the stationary phase. Nitrite was found to be the key intermediate of this production. Additionally, hydroxylamine was produced by strain JAM1 cultures and was linked to N₂O production. Isotopic labeling assays with ¹⁵NO₃⁻- or ¹⁵NH₄⁺-supplemented cultures revealed that more than 95 % of N₂O produced by strain JAM1 originated from nitrite. Furthermore, we demonstrated that the succession of N₂O-production and -consumption phases under anaerobic conditions correlated with changes in *nor* and *nos* gene expression levels. Our results suggest that *M. nitratireducenticrescens* JAM1 can participate in the reduction of NO and N₂O in the biofilm.

7.3 Introduction

Denitrification describes the successive reduction of nitrate (NO_3^-) into nitrite (NO_2^-), nitric oxide (NO), nitrous oxide (N_2O), and nitrogen (N_2) (Van Spanning *et al.*, 2005). This dissimilatory process is used by bacteria for respiration in environments with low oxygen concentration and NO_3^- as the electron acceptor. The process is driven by the metalloenzymes NO_3^- reductase (Nar), NO_2^- reductase (Nir), NO reductase (Nor), and N_2O reductase (Nos) (Einsle *et al.*, 2004). As a facultative trait, denitrification is widespread across environments and performed by bacteria with diverse origins (Zumft, 1997). Although complete denitrification pathways exist in many organisms, some bacterial species are only capable of partial or incomplete denitrification. For example, *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 can reduce all nitrogen oxides, except NO_2^- , while *Neisseria meningitidis* can only reduce NO_2^- and NO (Van Spanning *et al.*, 2005). Other bacteria, such as *Nitrosomonas europaea*, have N_2O as the final product of denitrification, which can be problematic in the environment, as N_2O is a powerful greenhouse gas (K. A. Smith, 2010). The significance of an incomplete pathway is unclear and may depend upon the original habitat and environment of each bacterial strain. The intermediate NO is also a problem in denitrification because the molecule is highly toxic to microorganisms, inducing nitrosative stress in the cell (Poole, 2005). The reduction of NO is a key step in denitrification and is highly regulated by diverse sensors and regulators. No energy is usually produced from this reaction, and bacteria usually reduce NO for detoxification purposes (Mancinelli *et al.*, 1983), although recent studies revealed that Nor could be coupled to proton transfer pathway and be electrogenic (Al-Attar *et al.*, 2015, Matsumoto *et al.*, 2012).

We have studied for many years the microbial ecology of a naturally occurring, multispecies-denitrifying biofilm that developed in a methanol-fed, fluidized denitrification system treating NO_3^- -contaminated sea water. This biofilm is composed at least 15 bacterial species (among the most abundant) and numerous protozoan (N. Labbé *et al.*, 2003a, Laurin *et al.*, 2008). Among these bacteria, *Methylophaga* spp. and *Hyphomicrobium* spp. composed more than 70% of the biofilm (N. Labbé *et al.*, 2007). Two strains affiliated to these genera were isolated, characterized, and their genome sequenced. *Hyphomicrobium nitratorans* NL23 is a methylotrophic Alphaproteobacterium that can perform complete reduction of NO_3^- into N_2 (Martineau *et al.*, 2013b). This correlates with the complete set of gene clusters found in its genome to

perform denitrification (Martineau *et al.*, 2015, Martineau *et al.*, 2013a). *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1 is a marine methylotrophic Gammaproteobacterium that can grow under anaerobic conditions by the reduction of nitrate into nitrite (Villeneuve *et al.*, 2013). Two Nar gene clusters are present in its genome, which we showed they both contribute to the nitrate reduction during strain JAM1 growth (Mauffrey *et al.*, 2015). Nitrite reduction was never recorded in strain JAM1 cultures, which correlates with the absence of gene cluster encoding NO-forming nitrite reductase (*nirK* or *nirS*) in its genome (Auclair *et al.*, 2010, Villeneuve *et al.*, 2012). However, strain JAM1 genome contains gene clusters encoding the assimilatory, cytoplasmic NAD(P)H-NO₃⁻ and -NO₂⁻ reductases (NasA-NirBD), for the reduction of NO₃⁻ into ammonium (NH₄⁺). In addition to NO₃⁻-reduction systems, the strain JAM1 genome contains the genetic material required for NO and N₂O reduction via two cNor (*norQDBCRCRE* and *norCBQD* clusters) and a Nos (*nosRZDFYYL* cluster). These gene clusters were shown to be transcribed (Mauffrey *et al.*, 2015). These data suggest that *M. nitratireducenticrescens* JAM1 can reduce NO and N₂O into N₂.

In this study, we investigated more thoroughly the capacity of strain JAM1 to reduce NO and N₂O in pure culture, and use N₂O as a source of energy for its growth. During this investigation, we noticed that strain JAM1 cultures generated N₂O during the stationary phase. We further analyzed this phenomenon and found that NO₂⁻ is a key intermediate of this production. Finally, we assessed the influence of N₂O reduction and production on the gene expression level of the two *norB*, *nosZ* and *nnrS*, which encoded for a NO-sensitive regulator. Our results pointed out for the capacity of *M. nitratireducenticrescens* JAM1 to participate in the reduction of NO and N₂O in the original denitrifying biofilm.

7.4 Materials and methods

7.4.1 Bacterial growth conditions

M. nitratireducenticrescens JAM1 and the JAM1 Δ *narG1narG2* double mutant were cultured in the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) *Methylophaga* medium 1403 (Mauffrey *et al.*, 2015, Villeneuve *et al.*, 2013). When needed, NO₃⁻ (NaNO₃; Fisher, Ottawa, ON, Canada), NO₂⁻ (NaNO₂; Fisher, Ottawa, ON, Canada), or hydroxylamine (NH₂OH · HCl; Fisher, Ottawa, ON, Canada) were added to the medium. Medium (40 mL) was dispensed in a 720-mL bottle (680-mL head space), screwed with caps equipped with septum and autoclaved. After autoclaving, these filter-sterilized solutions were added in the bottles: 120 μ L methanol (final concentration 0.3%; 74.3 mM), 800 μ L solution T [composed per 100 mL: 0.7 g KH₂PO₄, 10 g NH₄Cl, 10 g Bis-Tris, 0.3 g ferric ammonium citrate (pH 8)], 400 μ L Wolf's mineral solution (ATCC; pH 8), and 40 μ L vitamin B₁₂ (0.1 mg/mL). The final concentration of ammonium (NH₄⁺) in the regular 1403 medium was 21 mg-N vial⁻¹ (20.9 mg-N.vial⁻¹ from NH₄Cl and 0.1 mg-N vial⁻¹ from ferric ammonium citrate). For anaerobic cultures, bottles were flushed with nitrogen for 20 min prior to autoclaving. When needed, N₂O (purity 99.9%, Praxair, Mississauga, ON, Canada) and acetylene (10% vol/vol of headspace; (Praxair, Mississauga, ON, Canada)) were injected in headspace before autoclaving. Acetylene is an inhibitor of nitrous oxide reductase and has been extensively used in N₂O studies in order to observe N₂O production in cells (Fedorova *et al.*, 1973). Inoculum was made of fresh aerobic culture without NO₃⁻ to reach an optical density (OD₆₀₀) of 0.025. Culture bottles were shaken at 150 rpm and 30°C in the dark.

The capacity of strain JAM1 to reduce NO was tested with sodium nitroprusside (Sodium NitroPrusside hypochloride (SNP), purity \geq 99.0 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as the NO source. Strain JAM1 was cultured in *Methylophaga* 1403 medium under aerobic conditions without NO₃⁻, for 24 h. The cells were then centrifuged (8000 X g 5 min) and dispersed in fresh medium supplemented with 2 mM, 5 mM, or no SNP. Culture medium with 5 mM SNP and no biomass was also performed as control. Cultures were incubated under aerobic conditions, and N₂O production was monitored. To investigate the potential role of NH₄⁺ in N₂O production, NH₄Cl-free cultures were carried out under aerobic and anaerobic conditions using solution T containing no NH₄Cl. Prior to inoculation, cells from start-up cultures were centrifuged and washed

three times with saline solution in order to remove any residual traces of NH_4^+ .

Bacterial growth was monitored by spectrophotometry (OD_{600}). Bacterial flocs were dispersed with a Potter homogenizer prior to measurements, especially under aerobic conditions.

Oxygen concentration in the headspace was monitored in cultures under aerobic conditions by gas chromatography equipped with a temperature conductivity detector (7890B series GC Custom, SP1 option 7890-0504/0537; Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada).

7.4.2 ^{15}N -labeling of N_2O

Strain JAM1 cultures were made with $22 \text{ mg-N.vial}^{-1} \text{Na}^{15}\text{NO}_3$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in NH_4Cl -free medium or with $22 \text{ mg-N.vial}^{-1} \text{Na}^{14}\text{NO}_3$ and $20.7 \text{ mg-N.vial}^{-1} \text{}^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Sigma-Aldrich). Both cultures were carried out under anaerobic conditions, and 10% acetylene was added to allow N_2O to accumulate. Cultures were made in triplicate. After 14 days of incubation, the headspace of each replicate was pooled, and 100 mL of the gaseous phase was sampled in Tedlar bags. N_2O -isotope measurement was performed at the Environmental Isotope Laboratory (Earth & Environmental Sciences; University of Waterloo, ON, Canada) using a Trace Gas-GVI IsoPrime-Isotope Ratio Mass Spectrometry (TG-IRMS). Commercial N_2O (purity 99.9%; Praxair, Mississauga, ON, Canada) was also analyzed as a control.

Isotopic ratios of $^{45}[\text{N}_2\text{O}]/^{44}[\text{N}_2\text{O}]$ and $^{46}[\text{N}_2\text{O}]/^{44}[\text{N}_2\text{O}]$ were calculated for the condition with $22 \text{ mg-N.vial}^{-1} \text{Na}^{14}\text{NO}_3$ and $20.7 \text{ mg-N.vial}^{-1} \text{}^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ according to the peak intensity measured for $^{46}[\text{N}_2\text{O}]$, $^{45}[\text{N}_2\text{O}]$ and $^{44}[\text{N}_2\text{O}]$. Isotopic ratio of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ was derived from the previous results with Eq. 1.

$$R_s = \frac{^{15}\text{N}_{45} + 2[^{15}\text{N}_{46}]}{2[^{14}\text{N}_{44}] + ^{14}\text{N}_{45}} \quad (1)$$

where R_s is the sample isotopic ratio (%), $^{14}\text{N}_{45}$ is the quantity of ^{14}N in $^{45}[\text{N}_2\text{O}]$ (mole),

$^{15}\text{N}45$ is the quantity of ^{15}N in $^{45}[\text{N}_2\text{O}]$ (mole), $^{14}\text{N}44$ is the quantity of ^{14}N in $^{44}[\text{N}_2\text{O}]$ (mole) and $^{15}\text{N}46$ is the quantity of ^{15}N in $^{46}[\text{N}_2\text{O}]$ (mole).

7.4.3 Measurements of nitrogenous compounds

NO_3^- and NO_2^- concentrations were determined by ion chromatography using the 850 Professional IC (Metrohm, Herisau, Switzerland) with a Metrosep A Supp 5 analytical column (250 mm \times 4.0 mm).

N_2O concentration was determined by gas chromatography. Headspace samples (10 mL) were collected with a Pressure Lok gastight glass syringe (VICI Precision Sampling Inc., Baton Rouge, LA, USA) and injected through the injection port of a gas chromatograph equipped with an electron-capture detector (7890B series GC Custom, SP1 option 7890-0504/0537; Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). Reproducibility of the N_2O analyses was assessed before each set of measurements by repeated analysis of certified N_2O standard gas with standard deviations <5%. N_2O standards (500 ppm and 250 ppm) were made by dilutions from 10,000 ppm N_2O stock standard. The 10,000 ppm stock standard was obtained by injecting 1% of pure N_2O (Praxair) in a 720 mL gastight bottle. Detection limit of the N_2O was <10 ppbv, corresponding to 0.3 nmol/vial in our bioassays. No significant N_2O production was observed for blank experiments involving sterile media or empty glass bottles. The total quantity of N_2O in the culture bottle (aqueous phase and headspace) ($X_{\text{N}_2\text{O}}$ in $\mu\text{mole vial}^{-1}$) was calculated according to Eq. 2.

$$X_{\text{N}_2\text{O}} = HaPaV_l + \frac{V}{V_n} V_g \quad (2)$$

where Ha is the Henry constant for N_2O (0.025 M/atm), Pa is the N_2O partial pressure (atm), V_l is the volume of the liquid phase (0.04 L), V is the partial volume of N_2O , V_n is the specific molar volume of the gas at atmospheric pressure and 20°C (24.055 L/mol), and V_g is the volume of the gaseous phase (0.68 L). $X_{\text{N}_2\text{O}}$ was then converted (eq.3) in

mg-N vial⁻¹ for easier calculation of mass balance with the other nitrogenous compounds:

$$X_N = X_{N_2O} \times \frac{2N}{N_2O} \quad (3)$$

Hydroxylamine concentration was measured using the indirect kinetic spectrophotometric determination technique from Afkhami *et al.* (2006). NH₄⁺ concentration was determined by spectrophotometry with the following reaction: 100 µL sample, 1.7 mL deionized water, 0.1 mL 6% EDTA, 0.4 mL sodium salicylate/SNP solution (3.9 g NaC₇H₅O₃ and 0.05 g Na₂Fe(CN)₅NO.2H₂O in 100 mL deionized water), and 0.2 mL buffered hypochlorite [0.74 g NaOH, 1.3 g Na₂HPO₄, and 1.2 mL NaOCl 5% in 25 mL deionized water (pH 13)]. After 20-min incubation at 37°C, absorbance was read at 667 nm.

7.4.4 RNA extraction

Anaerobic cultures of strain JAM1 were made in an NH₄Cl-free 1403 medium supplemented with 22 mg-N.vial⁻¹ NO₃⁻. Cells were harvested at specific times, and RNA was immediately extracted using the PureLink RNA mini kit (Ambion Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). RNA extracts were treated twice with TurboDNase (Ambion), and RNA quality was verified by agarose gel electrophoresis. Absence of remaining DNA was checked by end-point polymerase chain reaction (PCR) amplification of the 16S rRNA gene using RNA extracts as the template.

7.4.5 Gene expression

cDNAs samples were generated from the RNA using hexameric primers and the Reverse Transcription System from Promega (Madison, WI, USA) with 1 µg of RNA. Real-time quantitative PCR (qPCR) assays were performed with the Faststart SYBR Green Master (Roche, Basel, Switzerland) according to manufacturer instructions. All

reactions were performed in a Rotor-Gene 6000 real-time PCR machine (Corbett Life Science, Concorde, New South Wales, Australia), and each reaction contained 25 ng of cDNA and 300 nM of primers (Table 7.1). Genes tested were *norB1* and *norB2* (encoding the catalytic sub-units of nitric oxide reductase 1 and 2, respectively), *nosZ* (encoding the catalytic sub-unit of nitrous oxide reductase) and *nnrS* (encoding the NO-sensitive regulator). PCR began with an initial denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 10 s at 95°C, 15 s at 60°C, and 20 s at 72°C. To confirm the purity of the amplified products, a melting curve was performed by increasing the temperature from 65°C to 95°C in increments of 1°C per step with a pause of 5 s for each step. All genes for each sample and standard were tested in a single run. The amplification efficiency was tested for each set of primer pairs by qPCR using a dilution of strain JAM1 genomic DNA as the template. The amplification efficiencies for all primer pairs varied between 0.9 and 1.1. Copy number of each gene was calculated according to standard curves using dilutions of strain JAM1 genomic DNA. In order to normalize gene expression of the different growth phases, results were expressed as copy number per *dnaG* copy number in each sample. Based on previous study (Mauffrey *et al.*, 2015) *dnaG* had the lowest variability among the reference genes tested (*dnaG*, *rpoD* and *rpoB* in strain JAM1. *dnaG* encodes for a DNA primase and is present in one copy in strain JAM1 genome. RNA extraction and qPCR were performed with three independent biological replicates. The significance of the results was tested for each phase against pre-culture phase with a Student t-test.

Table 7.1: PCR primers

Primers	Target gene	Sequence (3'-5')	Source
norB1-510f	<i>norB1</i>	CCTGATCGGTTTGGCTCTC	Mauffrey <i>et al.</i> , 2015
norB1-635r		CCCATGATCAATTCCCAGAC	
norB2-334f	<i>norB2</i>	GGCAACAAGCTATTGGAGCA	Mauffrey <i>et al.</i> , 2015
norB2-449r		GTGGTGGTAAAGCGACCAGA	
nosZ-826f	<i>nosZ</i>	GAGCGTGACTGGGTAGTCGT	Mauffrey <i>et al.</i> , 2015
nosZ-952r		GTGTCAACTCGCTCCCTTTG	
dnaG-774f	<i>dnaG</i>	CATCCTGATCGTGGAAGGTT	Mauffrey <i>et al.</i> , 2015
dnaG-894r		GCTGCGAATCAACTGACGTA	
nnrs-749f	<i>nnrS</i>	TGTTCCGCCATTTTCAGCAATA	This study
nnrs-848r		TAACCGATGTGCAAAGACCA	

7.5 Results

7.5.1 Reduction of NO and N₂O by *M. nitratireducenticrescens* JAM1

Strain JAM1 was cultured with N₂O under aerobic conditions with or without NO₃⁻, or under anaerobic conditions in the presence of NO₃⁻ (Fig. 7.1A). A complete consumption of N₂O was observed within 24 h of incubation in all cultures. Growth pattern of the two types of aerobic cultures was similar and reached a maximum OD_{600nm} of ~1.3, whereas the anaerobic cultures reached a maximum OD_{600nm} of ~0.35 (Fig. 7.1B). Although vials were capped in the aerobic cultures, the O₂ concentration in the headspace (680 ml) did not show a significant decrease (T0hr = 20.4 ± 0.3 %; T100hr = 19.7 ± 0.9 %). Strain JAM1 was also cultured under anaerobic conditions without NO₃⁻ and with high level of N₂O as the sole energy source. Growth was observed, reaching a maximum OD₆₀₀ of 0.22 ± 0.03 after 24 h of incubation (Fig. 7.1B). Control cultures under anaerobic conditions without NO₃⁻ showed a slight growth with a maximum OD_{600nm} of ~0.09 (Fig 7.1B).

In order to verify NO reduction by strain JAM1, N₂O generation was monitored in aerobic cultures without NO₃⁻ supplemented with SNP used as the NO donor (Fig. 7.2). N₂O started to accumulate in both 2 mM and 5 mM SNP-supplemented media after 24 h of incubation, reaching 7.9 ± 0.5 µg-N vial⁻¹ and 14.5 ± 0.4 µg-N vial⁻¹, respectively, after 168 h. Almost no N₂O production was observed in strain JAM1 cultures without SNP or in the controls with non-inoculated culture medium supplemented with SNP or inoculated with autoclaved biomass.

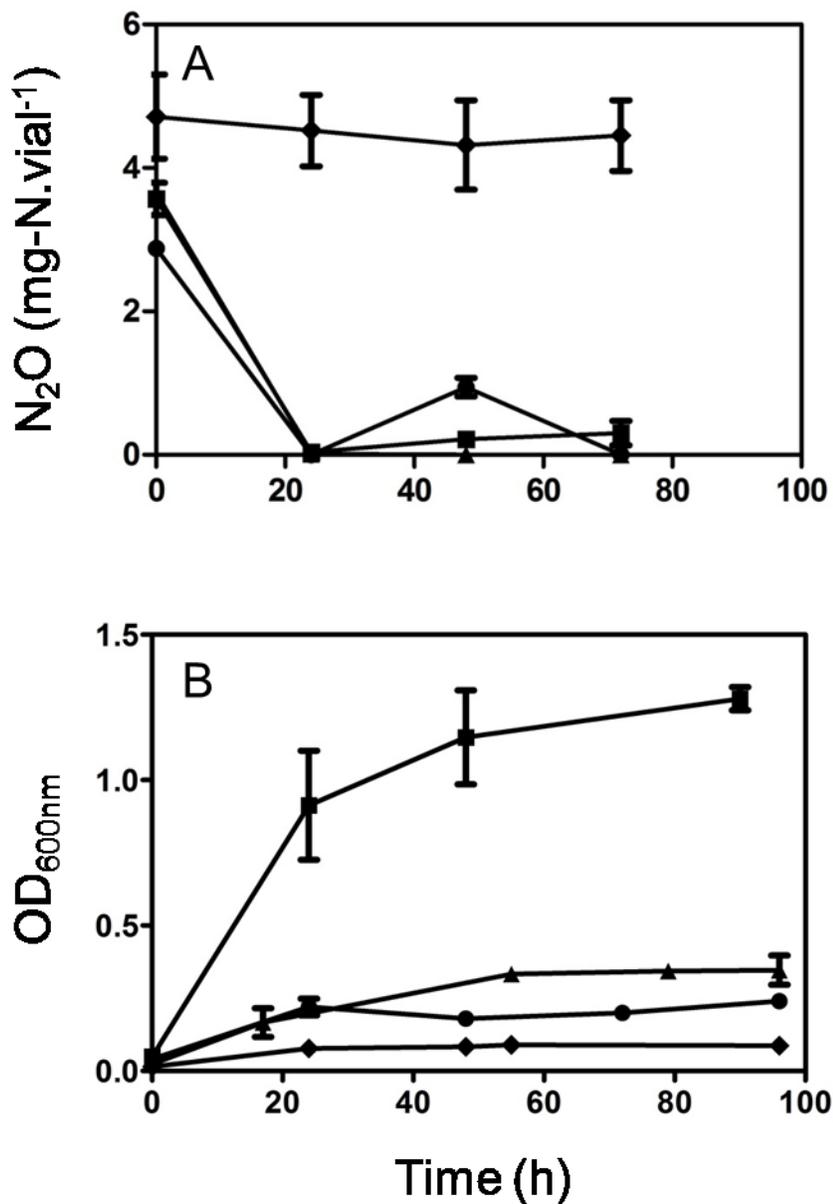


Figure 7.1: Reduction of N₂O by *M. nitratireducentiscrescens* JAM1 and its growth on N₂O.

(A) Strain JAM1 was cultured with ~3-5 mg-N vial⁻¹ N₂O under aerobic conditions with (22 mg-N vial⁻¹; square) or without (triangle) NO₃⁻, or under anaerobic conditions with NO₃⁻ (circle). N₂O concentration was measured at different time intervals. Controls were performed with non-inoculated culture medium (diamond). (B) Strain JAM1 was cultured under (i) aerobic conditions with NO₃⁻ (22 mg-N vial⁻¹; square), (ii) anaerobic conditions with NO₃⁻ (triangle), (iii) anaerobic conditions without NO₃⁻ but with N₂O-saturated atmosphere (circle), and (iv) anaerobic conditions without NO₃⁻ (diamond). Optical density was measured at different time intervals. Results were from triplicate cultures

7.5.2 Production of N₂O by *M. nitratireducenticrescens* JAM1

After total consumption of N₂O in 24 h in all cultures described in Figure 7.1, a net production of N₂O was observed under aerobic and anaerobic conditions when NO₃⁻ was present. Under anaerobic conditions and after a period of N₂O accumulation, net N₂O consumption was observed again. Under aerobic conditions, N₂O slowly and gradually accumulated. No N₂O production was observed when NO₃⁻ was absent. To further investigate this phenomenon, *M. nitratireducenticrescens* JAM1 was cultured under aerobic or anaerobic conditions with 22 mg-N vial⁻¹ NO₃⁻ for 4–5 days. Under aerobic conditions, N₂O was detected during the stationary phase after 24 h of incubation and slowly accumulated in the medium afterward (Fig. 7.3A). No net N₂O reduction was observed during this phase (production could have been higher than reduction), and the final concentration reached 0.14 mg-N vial⁻¹ after 96 h of incubation. Under anaerobic conditions, N₂O production started at the beginning of the stationary growth phase (~30 h) and reached 0.79 mg-N vial⁻¹ after 60 h of incubation (Fig. 7.3B). Unlike aerobic cultures, N₂O was completely reduced after 120 h. No significant reduction of NO₂⁻ was observed under these conditions. In the presence of 10% acetylene, no further N₂O reduction was observed in anaerobic cultures due to the inhibition by acetylene, and N₂O accumulated. However, the N₂O production rate was lower relative to that observed in acetylene-free cultures, with a N₂O production of 0.66 mg-N vial⁻¹ after 250 h (Fig. 7.4).

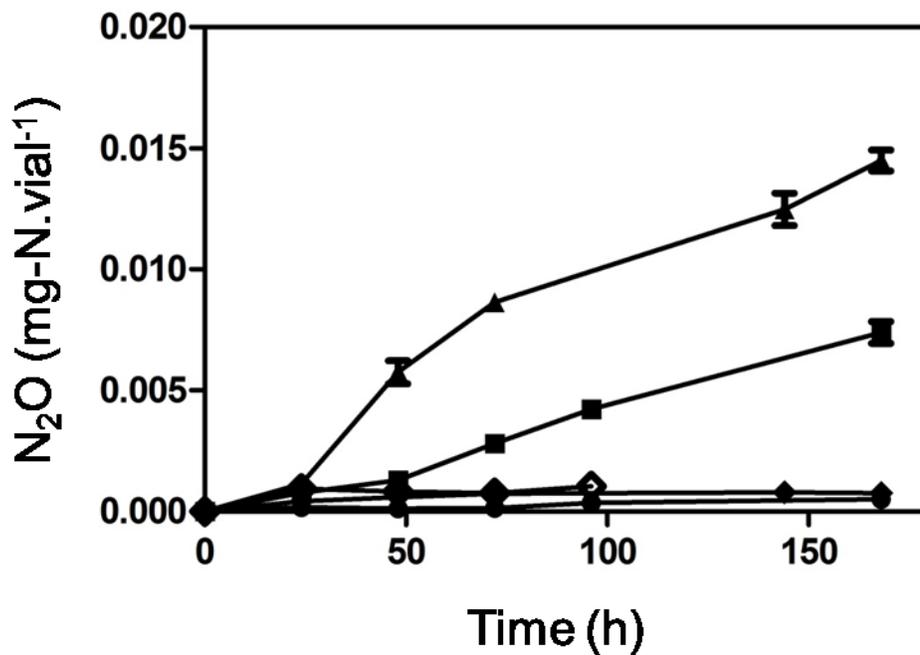


Figure 7.2: Reduction of NO by *M. nitratireducentescens* JAM1

Strain JAM1 was cultured under aerobic conditions without NO₃⁻ and with 2 mM (square), 5 mM (triangle), or no (circle) sodium nitroprusside. N₂O concentration was measured at different time intervals. Controls with 5 mM SNP in non-inoculated culture medium (diamond) and in culture medium inoculated with autoclaved biomass (white diamond) were also performed. Results were from triplicate cultures.

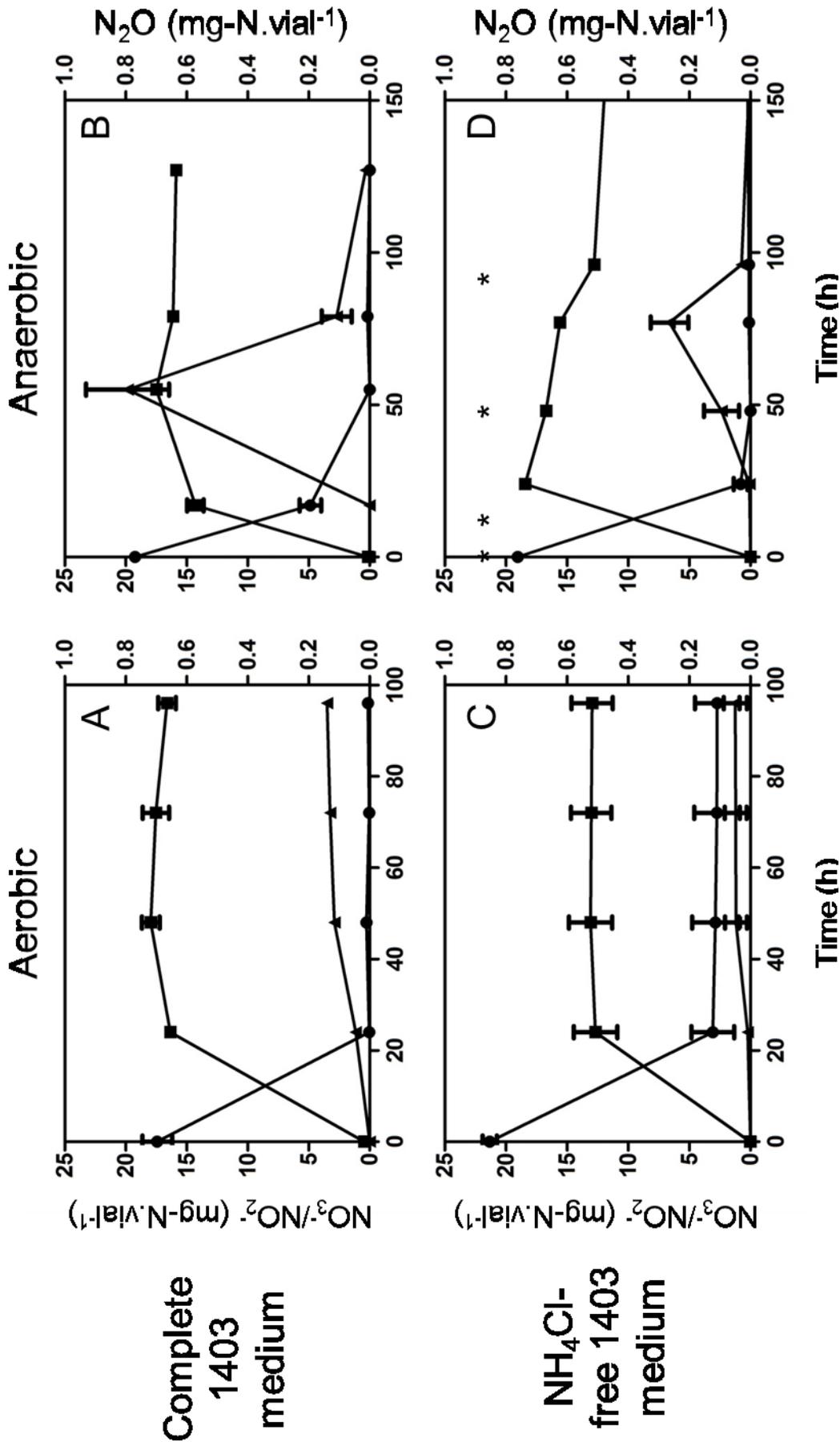


Figure 7.3: Production of N_2O by *M. nitratireducentiscrensens* JAM1.

Strain JAM1 was cultured under aerobic or anaerobic conditions with NO_3^- (22 mg-N vial⁻¹) in regular 1403 medium (A, B) or in NH_4Cl -free 1403 medium (C, D). NO_3^- (circle), NO_2^- (triangle), and N_2O (square) concentrations were measured at different time intervals. Growth patterns were similar to that observed in Figure 1B under the same conditions. Results were from triplicate cultures. In panel D, asterisks indicate the sampling times for RNA extraction (see Figure 7).

7.5.3 Role of NO_3^- and NO_2^- in N_2O production

Strain JAM1 and the JAM1 Δ *narG1narG2* double mutant were cultured with 16.8 mg-N vial⁻¹ NO_3^- under aerobic conditions. The JAM1 Δ *narG1narG2* mutant lacks functional Nar-type NO_3^- reductases and cannot grow under anaerobic conditions (Mauffrey *et al.*, 2015). Growth of strain JAM1 and the mutant was similar to that observed for strain JAM1 in Figure 7.1B under the same conditions. After 96 h of incubation, strain JAM1 completely reduced NO_3^- into NO_2^- and produced 0.14 mg-N vial⁻¹ of N_2O (Table 7.2). As expected, NO_3^- was not reduced, and NO_2^- was not produced by JAM1 Δ *narG1narG2*. Contrary to the wild type strain, the mutant did not produce N_2O .

The influence of NO_2^- was also tested. Because toxicity of NO_2^- was attested from 0.36 mM (0.2 mg-N vial⁻¹) for strain JAM1 (Auclair *et al.*, 2010), strain JAM1 and the mutant were cultured without NO_3^- under aerobic conditions to allow biomass growth. After 24 h, 4.7 mg-N vial⁻¹ NO_2^- was added to the cultures and incubated for another 72 h. Both strains produced 0.11 mg-N vial⁻¹ and 0.18 mg-N vial⁻¹ of N_2O , respectively, which was similar to N_2O concentrations produced by strain JAM1 under aerobic conditions with NO_3^- (Table 7.2).

Table 7.2: Reduction of nitrate, nitrite and production of N_2O by strain JAM1 and the JAM1 Δ *narG1narG2* double mutant.

Concentrations of nitrate, nitrite and nitrous oxide (mg-N vial⁻¹) were measured after 96 h ($\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 1.2$) of incubation in strain JAM1 and JAM1 Δ *narG1narG2* cultures under aerobic conditions with (A) 16.8 mg-N vial⁻¹ NO_3^- added at T0h or (B) 4.7 mg-N vial⁻¹ NO_2^- added at T24h. Results are from triplicate cultures.

Strain	Conditions	Nitrate	Nitrite	N_2O
JAM1	A	0.17 ± 0.06	16.6 ± 0.7	0.14 ± 0.01
JAM1 Δ <i>narG1narG2</i>	A	17.1 ± 0.1	0.22 ± 0.22	0.004 ± 0.002
JAM1	B	0	4.25 ± 0.09	0.11 ± 0.03
JAM1 Δ <i>narG1narG2</i>	B	0	4.87 ± 0.39	0.18 ± 0.02

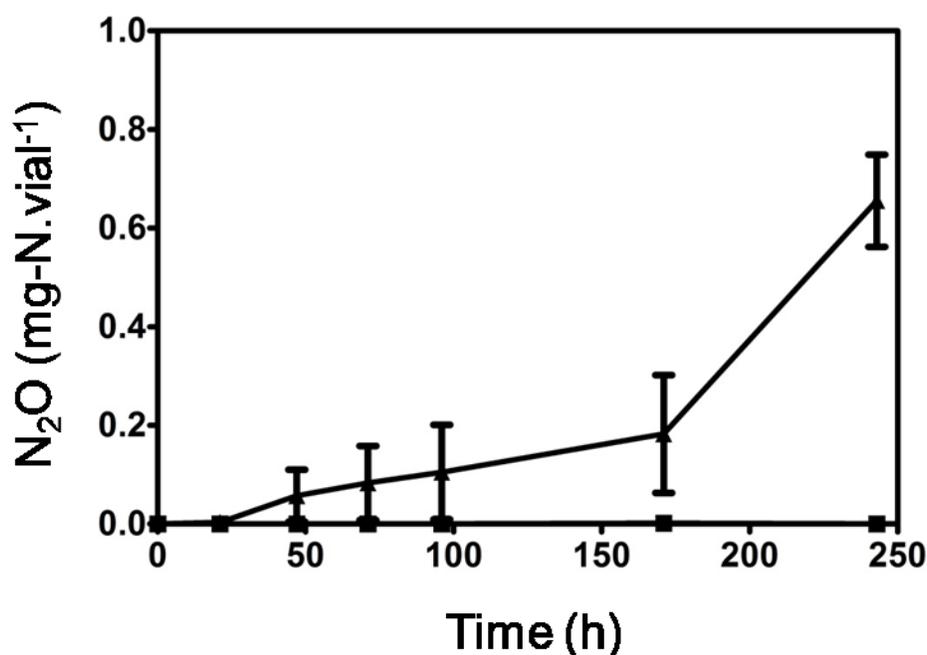


Figure 7.4: Production of N₂O by *M. nitratireducenticrescens* JAM1 in presence of acetylene.

Strain JAM1 was cultured under anaerobic conditions with NO₃⁻ (22 mg-N vial⁻¹) and 10% acetylene in regular 1403 medium (triangle), and N₂O concentrations were measured at different time intervals. Controls were performed with non-inoculated culture medium (square). Results were from triplicate cultures.

7.5.4 Influence of NH₄⁺ in N₂O production

The original 1403 medium recommended by the ATCC for culturing *Methylophaga* spp. contained 20.9 mg-N vial⁻¹ NH₄Cl. In order to investigate the influence of NH₄⁺ on N₂O production, strain JAM1 was cultured with 22 mg-N vial⁻¹ NO₃⁻ under aerobic or anaerobic conditions in 1403 medium containing no NH₄Cl. The only other source of NH₄⁺ in the medium was from ferric ammonium citrate (0.13 mg-N vial⁻¹). Even in absence of NH₄Cl in the culture medium, growth in both conditions was similar to that observed in Figure 7.1B. Under aerobic conditions, N₂O was observed after 48 h of incubation in NH₄Cl-free cultures (Fig. 7.3C), after which it slowly accumulated and reached a concentration of 0.05 mg-N vial⁻¹. Unlike regular cultures (Fig. 7.3A), NO₃⁻ was not completely reduced under NH₄Cl-free conditions, and N₂O production was 67% lower. No significant reduction of NO₂⁻ was observed. Nitrogen assimilation by the

biomass could account for the difference in mass balance between nitrate (22 mg-N vial⁻¹) and nitrite (13 mg-N vial⁻¹), as nitrate was the only nitrogen source in the medium.

Under anaerobic conditions, NH₄Cl-free cultures showed a net N₂O production and reduction profile similar to the N₂O profile observed in regular cultures (Fig. 7.3D), although with lower N₂O concentrations being detected during the accumulating phase. NO₂⁻ reduction was observed in NH₄Cl-free cultures, contrary to the regular cultures, with 37% reduction after 168 h.

NH₄⁺ concentration was measured in strain JAM1 cultures under aerobic or anaerobic conditions in NH₄Cl-free medium (Fig. 7.5). No measurements were performed on the regular 1403 medium, as NH₄⁺ is present in excess in this medium. No NH₄⁺ was present after 24 h of incubation under anaerobic conditions, and decreased from 0.07 mg-N vial⁻¹ to 0.04 mg-N vial⁻¹ in 24 h under aerobic conditions. Under aerobic conditions, NH₄⁺ concentration increased from 24 h to 48 h to reach a level of ~0.16 mg-N vial⁻¹ after 100 h of incubation. Under anaerobic conditions, NH₄⁺ concentration increased from 24 h to 48 h and was maintained at ~0.07 mg-N vial⁻¹ until the end of the experiment.

The concentration of hydroxylamine (NH₂OH) was measured in strain JAM1 cultured in the regular 1403 medium under different conditions. Barely any NH₂OH was detected when strain JAM1 was cultured under aerobic conditions without NO₃⁻ (Fig. 7.6). In the presence of 22 mg-N vial⁻¹ NO₃⁻ (and eventually NO₂⁻), both aerobic and anaerobic conditions led to the production of NH₂OH up to 0.81 and 0.96 mg-N vial⁻¹, respectively. This represented approximately 3.7% and 4.4% of the starting NO₃⁻ concentration. Then, NH₂OH concentrations stabilized with ~0.8 and ~0.65 mg-N vial⁻¹ for aerobic and anaerobic conditions, respectively. Strain JAM1 was then cultured with 8 mg-N vial⁻¹ NH₂OH under aerobic conditions in the regular 1403 medium without NO₃⁻. Under these conditions, N₂O was produced, with an accumulation of 0.25 mg-N vial⁻¹ after 72 h (data not shown).

Isotopic labeling with ¹⁵NH₄⁺ was performed to assess the involvement of NH₄⁺ in the generation of N₂O under anaerobic conditions, as suggested by the results with hydroxylamine. Strain JAM1 was cultured under anaerobic conditions with 22 mg-N vial⁻¹ NO₃⁻, 20.7 mg-N vial⁻¹ ¹⁵NH₄⁺, and acetylene to block the reduction of N₂O into N₂. Unfortunately, strain JAM1 cannot be cultured without NO₃⁻ under anaerobic conditions. The ⁴⁵[N₂O]/⁴⁴[N₂O] and ⁴⁶[N₂O]/⁴⁴[N₂O] ratios were 0.008 and 0.0165, respectively; with

the isotopic ratio of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ of 0.020418. As nitrate was provided in the medium, the proportion of labeled N_2O that originated from $^{15}\text{NO}_3^-$ naturally present in sodium nitrate was calculated. We considered the preferential reduction of $^{14}\text{N}\text{-NO}_x$ by denitrification enzymes as negligible in our calculations (delta values ranging from -10 ‰ and -40 ‰) (Snider *et al.*, 2009). By subtracting the natural isotopic ratio of the supplemented NO_3^- ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0.0036765$) from that of the culture ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0.020418$), the isotopic ratio issued from $^{15}\text{NH}_4^+$ is 0.0167415, which represent 1.65% of total N_2O . As control, strain JAM1 cultured under anaerobic conditions with $^{15}\text{NO}_3^-$ in NH_4Cl -free medium with acetylene showed, as expected, all N_2O recovered in $^{46}[\text{N}_2\text{O}]$.

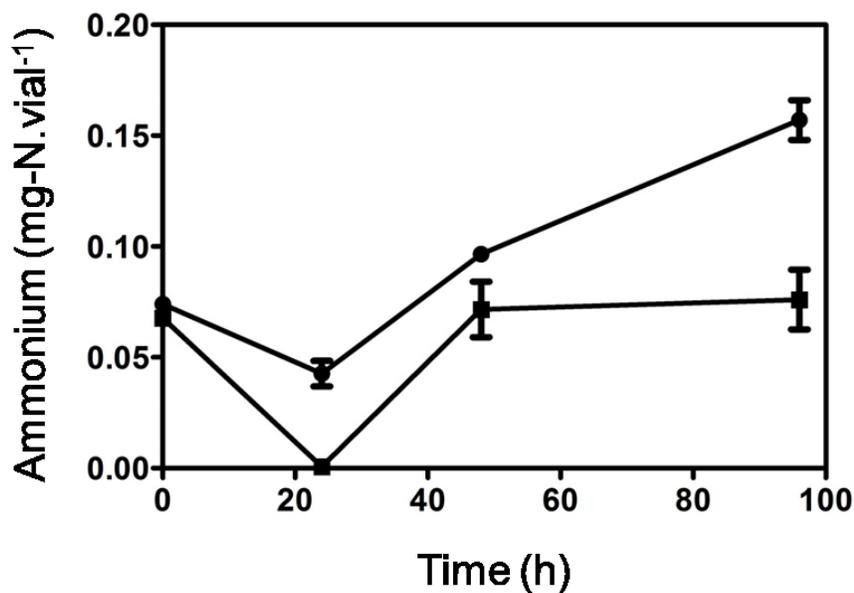


Figure 7.5: NH_4^+ concentration in *M. nitratireducentiscrecens* JAM1 cultures.

Strain JAM1 was cultured under aerobic (circle) or anaerobic (square) conditions in NH_4Cl -free 1403 medium, and NH_4^+ concentration was determined at different time intervals. Results were from triplicate cultures.

7.5.5 Gene expression

Strain JAM1 was cultured in NH_4Cl -free medium with $22 \text{ mg-N vial}^{-1} \text{ NO}_3^-$ and under anaerobic conditions. For RNA extraction, cells were harvested at four different phases (Fig. 7.3B): 1) T0 in the pre-cultures, 2) during the growth phase with no N_2O production, 3) during the N_2O -production phase, and 4) during the N_2O -consumption phase (Fig. 7.3D). The relative transcript levels of *norB1*, *norB2*, *nrrS*, and *nosZ* were quantified in these samples. NnrS is a NO-sensitive regulator implicated in the regulation of NO-response proteins such as nitric oxide reductases (Bartnikas *et al.*, 2002, Stern *et al.*, 2013). The *norB1* and *nrrS* expression patterns were similar, with the highest expression levels being observed during the N_2O -production phase (Fig. 7.7). The *norB2* expression level was stable, except during the initial phase, where it was significantly lower. Except for the pre-cultures, the *norB2* transcript level was always lower than those detected for *norB1*. The most highly expressed gene among the four tested in the pre-culture and during the initial phase was *nosZ*, but no significant changes in its expression level were reported.

7.6 Discussion

Our results demonstrated that *M. nitratireducenticrescens* JAM1 can reduce NO and N_2O , as predicted by the genome sequence (Mauffrey *et al.*, 2015, Villeneuve *et al.*, 2013) and by the detection of *norB* and *nosZ* transcripts using qPCR or transcriptome analysis (Mauffrey *et al.*, 2015). N_2O reduction occurred under both aerobic and anaerobic conditions during the growth phase, and strain JAM1 was also able to grow under anaerobic conditions using N_2O as the sole energy source. Many bacteria grow on N_2O , including *Wolinella succinogenes* and *Pseudomonas denitrificans* being the first bacterium reported to grow with N_2O as the sole electron acceptor (Bazylnski *et al.*, 1986, Koike *et al.*, 1975, Yoshinari, 1980). *M. nitratireducenticrescens* JAM1 was thought to participate uniquely in the reduction of NO_3^- into NO_2^- in the denitrifying biofilm portion of the denitrification system. It was previously proposed that NO_2^- reduction to N_2 was carried out by *H. nitrativorans* NL23, the second most represented bacterium in the biofilm (Auclair *et al.*, 2012, N. Labbé *et al.*, 2007). The ability of strain JAM1 to reduce NO and N_2O and to grow on N_2O suggests that the bacterium could

participate in the reduction of NO and N₂O during the denitrification process occurring in the biofilm.

During the investigation of N₂O reduction by strain JAM1 under anaerobic conditions and in the presence of NO₃⁻, we observed the resurgence of N₂O during the stationary phase after its complete reduction during the growth phase. This production also occurred when NO₃⁻ was present in the culture medium in absence of N₂O during the stationary phase under both aerobic and anaerobic conditions. This characteristic was found in several other N₂O-producing bacteria, such as *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* (Bleakley *et al.*, 1982). Contrary to the anaerobic cultures with NO₃⁻, where the produced N₂O was subsequently reduced, such reduction did not occur under aerobic conditions during the stationary phase, and N₂O slowly accumulated in the aerobic cultures. However, the N₂O production was lower under aerobic conditions relative to anaerobic conditions, suggesting that oxygen could inhibit both N₂O production and reduction during the stationary phase. The successive reduction of NO₃⁻, NO₂⁻, NO, and N₂O during the denitrification process is highly regulated by oxygen and nitrogen oxides concentration in the environment, and especially by NO₃⁻/NO₂⁻ and NO (Zumft, 1997).

Gilberthorpe *et al.* (2008) demonstrated that *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* produced significant levels of NO from NO₂⁻ under anaerobic conditions and that the Nar system (*narGHJI*) was involved under the control of the oxygen sensor FNR. This has also been demonstrated for other bacteria, including *E. coli* (Corker *et al.*, 2003, Ji *et al.*, 1988). This mechanism seems unlikely in strain JAM1, as the double-knockout mutant JAM1Δ*narG1narG2*, lacking the two dissimilatory NO₃⁻ reductases, was still able to produce N₂O under aerobic conditions when only NO₂⁻ was added to the cultures. Rowley *et al.* (2012) suggested that N₂O could be produced during NO₃⁻ reduction into NO₂⁻ by the Nar system in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. This mechanism could occur in strain JAM1 but would represent a minor source of N₂O. Indeed, the level of N₂O production in the cultures supplemented with nitrate was similar to that supplemented with only nitrite (Table 7.2). Our results suggest that, NO₃⁻ is not directly involved in the N₂O production process unlike NO₂⁻ which appears essential for N₂O production.

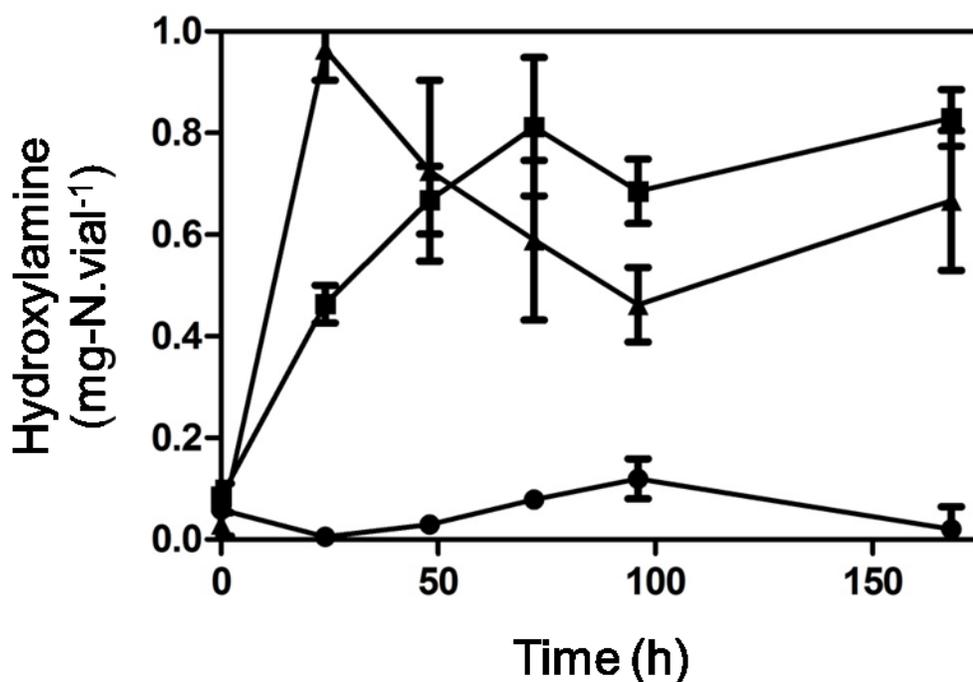


Figure 7.6: Hydroxylamine production in *M. nitratireducentiscrescens* JAM1 cultures.

Strain JAM1 was cultured under aerobic conditions without (circle) or with NO₃⁻ (square), and under anaerobic conditions with NO₃⁻ (triangle), and hydroxylamine concentration was measured at different time intervals. Results were from triplicate cultures.

NH₄⁺ is also present in the Methylophaga 1403 medium and could have influenced the production of N₂O. Production and reduction of N₂O was similar in NH₄Cl-free cultures to that observed in regular cultures under aerobic and anaerobic conditions, although N₂O production was lower in the NH₄Cl-free cultures, suggesting that NH₄⁺ may influence this production. The reduction of NO₂⁻ in NH₄Cl-free medium under anaerobic conditions could be explained by the activities of the assimilatory, cytoplasmic NAD(P)H-NO₃⁻ and -NO₂⁻ reductases (NasA-NirBD), which are encoded in strain JAM1 genome. Indeed, NH₄⁺ accumulation was observed in the stationary phase in NH₄Cl-free cultures. NO₂⁻ reduction was not observed in strain JAM1 cultured in the regular 1403 medium probably because this medium contains high level of NH₄⁺, which is known to inhibit the assimilatory pathway (Flores *et al.*, 2005).

We observed NH₂OH production under both anaerobic and aerobic growth conditions when NO₂⁻ (from NO₃⁻ reduction) was present, and N₂O was produced when

NH₂OH was added to the medium without the presence of NO₂⁻. N₂O can be generated as a by-product of hydroxylamine oxydoreductase (HAO) activities in ammonia oxidizing bacteria (Stein, 2011). We did not expect strain JAM1 to exhibit nitrification activities because it required aerobic conditions, and information from the strain JAM1 genome did not reveal the presence of gene clusters encoding putative HAO. Furthermore, the isotopic labeling assays with ¹⁵NH₄⁺ clearly showed that NH₄⁺ is not a preferential intermediate of N₂O production. However, a small proportion (1.65%) of labeled N₂O originated from ¹⁵NH₄⁺. Tanimoto *et al.* (1992) described a biotic phenomenon called co-denitrification, involving inorganic NH₄⁺ and NO₂⁻ to form N₂O. This occurs in the strict presence of NO₃⁻ or NO₂⁻ and leads to hybrid N₂O, where the N atoms are derived from NH₄⁺ and NO₂⁻. Such reactions could have occurred in strain JAM1 cultures, as the ⁴⁵[N₂O]/⁴⁴[N₂O] ratio was 0.008. However, other types of NH₄⁺ transformation into N₂O were occurring, given that the ⁴⁶[N₂O]/⁴⁴[N₂O] ratio at 0.0165 was considerably higher than the natural isotopic signature of nitrogen and two-fold higher than the ⁴⁵[N₂O]/⁴⁴[N₂O] ratio. Therefore, the production of N₂O by strain JAM1 appeared to occur through a combination of different pathways, with NO₂⁻ serving as an obligate reagent.

NO₂⁻ can be reduced into NH₄⁺ via the assimilatory, cytoplasmic NAD(P)H- or ferredoxin- NO₂⁻ reductase. In this process, NO and hydroxylamine are intermediates during the reduction. As mentioned before, the strain JAM1 genome contains a gene cluster encoding the NAD(P)H-NO₃⁻ and -NO₂⁻ reductases (NasA-NirBD). NO and hydroxylamine could have been produced in strain JAM1 cultures by incomplete NO₂⁻ reduction into NH₄⁺ by the NasA-NirBD system (Kuznetsova *et al.*, 2004, Stach *et al.*, 2000). However, we cannot rule out that unknown oxidoreductases carry these activities in strain JAM1 (Maia *et al.*, 2015).

The expression of genes of interest was monitored during four different phases under anaerobic culture conditions. NnrS is a protein involved in defense against nitrosative stress in cells and is positively regulated by the presence of NO (Bartnikas *et al.*, 2002, Stern *et al.*, 2012, Stern *et al.*, 2013). Therefore, *nnrS* expression reflects NO concentration in the medium and can be used as a marker of NO presence. Higher expression of *nnrS* during N₂O production strongly suggests that NO is produced during this phase. This correlated with higher expression of *norB1*, which can also be regulated by NO-sensitive regulators such as NnrS or NorR (Spiro, 2012). Moreover, the increase in *norB1* expression can be directly linked to the observed N₂O production. During the

N₂O-reduction phase, only *norB1* expression was decreased and could have changed the balance between N₂O production and reduction. As *nosZ* expression is mainly triggered by the presence of O₂, the stable expression of this gene under constant anaerobic conditions was not surprising (Spiro, 2012). Interestingly, *norB2* expression was not affected by the presence of NO, unlike *norB1*. This suggests a putative different regulation mechanism for this gene, such as observed with *narG1* and *narG2* in a previous study (Mauffrey *et al.*, 2015). Finally, the succession of the different phases of N₂O production/reduction correlates with the presence of NO through an increased expression of *nnrS*, which strongly suggest that NO is an intermediate in N₂O production in strain JAM1.

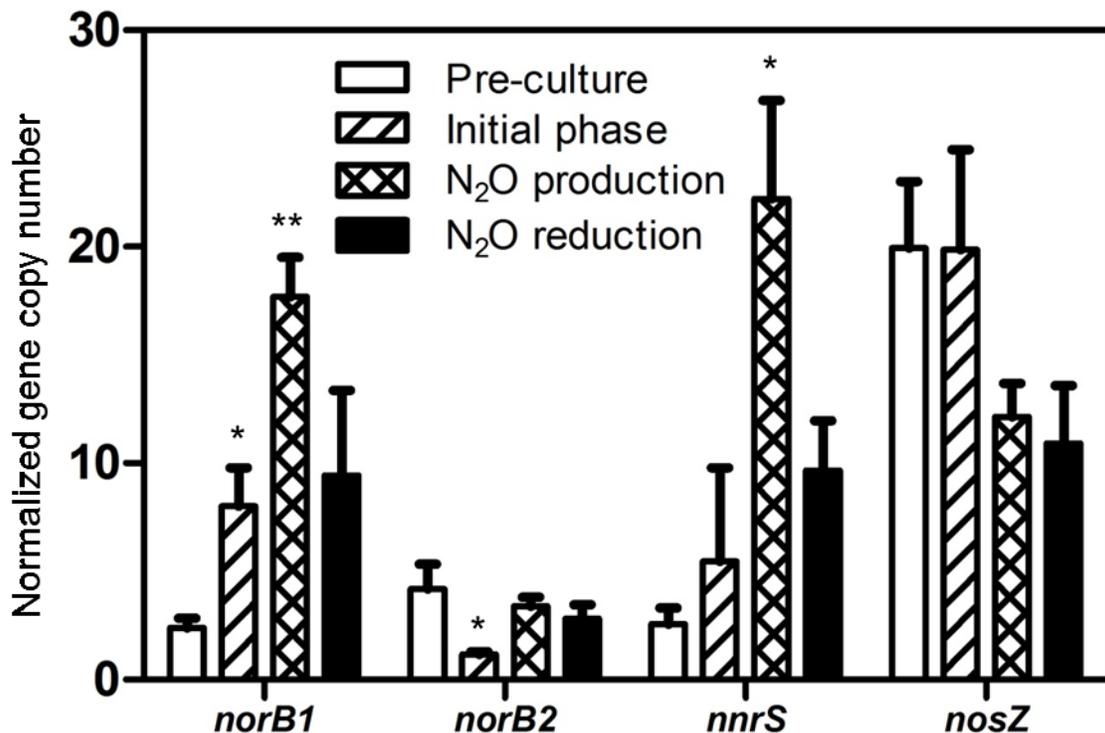


Figure 7.7: Relative transcript levels of *norB1*, *norB2*, *nnrS*, and *nosZ*.

Strain JAM1 was cultured under anaerobic conditions in NH₄Cl-free 1403 medium with 22 mg-N vial⁻¹ NO₃⁻. Growth patterns were similar to that observed in Figure 1B under the same conditions with regular 1403 medium. Samples were taken from the pre-culture and during the growth phase (no N₂O production), the N₂O-production phase, and the N₂O-consumption phase (see Figure 3D), from which total RNA was extracted. Gene expression levels of *norB1*, *norB2*, *nnrS* and *nosZ* were reported as gene copy number per copy of *dnaG* (reference gene). Student tests were performed for each phase in comparison to pre-culture phase. *: 0.05<P<0.01; **: 0.01<P<0.001. Results were from triplicate cultures from different inoculum.

7.7 Conclusion

In addition to reduced NO_3^- into NO_2^- , *M. nitratireducenticrescens* JAM1 is capable of NO and N_2O reduction. N_2O production in strain JAM1 could originate from abiotic transformations of NO_2^- into NO or by incomplete NO_2^- reduction into NH_4^+ by the assimilatory, cytoplasmic NAD(P)H- NO_2^- reductase. Nevertheless, a small portion of the N_2O produced appeared to originate from NH_4^+ ; however, the actors in this pathway remain unknown. Our results enable a better understanding of the ecophysiology role of *M. nitratireducenticrescens* JAM1 in the original denitrifying biofilm. *H. nitrativorans* NL23 was believed to be the main actor in the sequential reduction of NO_2^- to N_2 . With the present results, it appears that *M. nitratireducenticrescens* JAM1 had a more important role in the denitrification process by participating in the reduction of NO_3^- , NO and N_2O in the biofilm.

Funding information

This project was financially supported by a grant to RV from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (#155558).

Acknowledgment

We thank Karla Vasquez for her technical assistance.

8. Résultats supplémentaires

M. nitratireducenticrescens JAM1 est la bactérie dominante du biofilm. Elle possède donc un grand rôle dans son fonctionnement, que ce soit au niveau de la dénitrification ou d'autres voies métaboliques. Les articles précédents s'appuient sur des cultures axéniques et ciblent la voie de dénitrification en particulier. Or le comportement d'une bactérie (par rapport à l'expression de ses gènes) n'est pas le même d'une culture pure à une vie en communauté dans un biofilm. De plus, il est supposé que la souche JAM1 ait un rôle important dans la défense contre le stress osmotique grâce à la synthèse d'ectoïne et dans la production d'EPS servant de matrice au biofilm. Grâce aux méthodes de transcriptomiques décrites précédemment, il est possible d'étudier la transcription des gènes de la souche JAM1 parmi toutes les espèces bactériennes présentes dans le biofilm et de la comparer à la transcription de ses gènes en culture pure.

8.1 Matériels et méthodes

8.1.1 Cultures et conditions de croissance

Les conditions de culture axénique sont décrit dans Mauffrey *et al.* (2015). Le protocole de transcriptomique est détaillé dans les annexes.

Pour les cultures en biofilm, le milieu de culture utilisé était le milieu d'eau de mer artificiel (ASW; 1L de milieu) : 27.5 g NaCl, 10.68 g MgCl₂*6H₂O, 2 g MgSO₄*7H₂O, 1 g KCl, 0.5 g CaCl₂, 456 µL de FeSO₄*7H₂O 4 g/L, 5 mL de KH₂PO₄ 51,2 g/L, 5 mL de Na₂HPO₄ 34 g/L. Des éléments (FeSO₄*7H₂O 0.9 g/L, CuSO₄*5H₂O 0.03 g/L et MnSO₄*H₂O 0.2 g/L) ont été ajoutés et le pH ajusté à 8. Du méthanol filtré et stérilisé (Fisher Scientific) a été ajouté dans chaque culture de manière à respecter un ratio C/N de 1.5. Soixante ml de milieu stérile furent distribués dans des vials sérologiques stériles contenant 20 supports neufs « Bioflow 9 mm » (Rauschert, Steinwiessen, Allemagne) préalablement lavés avec du HCl 10% (v/v) pendant 3 heures puis rincés avec de l'eau et autoclavés. Les vials ont été purgés de tout oxygène présent pendant 10 min avec de l'azote gazeux (Praxair) et scellés avec des bouchons stériles munis de septums.

De la biomasse a été prélevée sur des supports à biofilm provenant du Biodôme et dispersée dans le milieu ASW à 0.08 g (poids sec)/mL. Celle-ci (5 mL/vial, 0.4 g de biofilm) a été ensuite distribuée à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 18_G1^{1/2} dans les vials contenant les 60 mL d'ASW et les 20 supports à biofilm. Les vials furent ensuite cultivés selon les conditions de culture suivantes : milieu S3 (300 mg-N, 23°C), milieu S4 (900 mg-N, 30°C) et milieu S5 (300 mg-N, 30°C, 0% NaCl). En moyenne une fois par semaine, les 20 supports furent prélevés, lavés avec précaution afin de retirer l'excès de milieu et les bactéries non attachées au biofilm, puis transférés dans un vial contenant du milieu frais avec les mêmes conditions. Du méthanol et du nitrate furent ajoutés quand nécessaire si le nitrate était complètement consommé.

8.1.2 Extraction de l'ARN et analyses bioinformatiques

Pour la condition de culture axénique, l'ARN a été extrait de 3 cultures différentes tel que décrit dans Mauffrey *et al.* (2015). Pour la condition de culture en biofilm, la biomasse a été prélevée de 3-4 supports, pour chaque condition de culture, après 5 étapes de repiquages et dispersée dans une solution d'extraction. Chaque condition de culture du biofilm présente donc un seul réplicat. Les étapes d'extractions sont décrites dans Mauffrey *et al.* (2015). L'ARN extrait a été envoyé pour séquençage par Illumina (Genome Quebec Innovation Center, Montreal QC, Canada). L'analyse bioinformatique a été réalisée sur le serveur Briarée de l'Université de Montréal, géré par Calcul Québec et Compute Canada. L'alignement sur génome ainsi que la standardisation (RPKM) a été réalisé selon le protocole le pipeline situé en annexe. Pour la condition en culture axénique, les reads de chaque gène ont été moyennés entre les 3 réplicats afin de n'avoir qu'un réplicat que l'on puisse comparer avec les conditions de culture en biofilm. Le test statistique NOISeq-SIM a été utilisé afin de comparer les expressions des différentes conditions en simulant des réplicats. Le protocole est décrit dans le pipeline situé en annexe. Un facteur q de 0,9 a été choisi comme limite pour la significativité des expressions différentielles. Finalement, KeggArray a été utilisé afin de déterminer le nombre de gène surexprimés ou sous-exprimés dans différents métabolismes. Un facteur d'expression différentielle supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 a été choisi afin de considérer la différence d'expression biologiquement significative.

8.2 Résultats et discussion

Les expressions relatives des gènes d'intérêts sont listées dans le Tableau 1. La condition « culture axénique » a été considérée comme référence. On peut voir que de manière générale, la voie de réduction du nitrate était surexprimée dans les trois conditions de culture en biofilm. Seul l'opéron *narK1K2GHJI[1]* était 4.5 fois moins exprimé dans la condition S4 par rapport à la culture pure. Par contre, *narXL* était environ 2 fois moins exprimé dans toutes les conditions de culture des biofilms. La baisse d'expression de *narXL* est probablement due à une faible concentration en nitrate au moment du prélèvement de biomasse. Cela est contradictoire avec l'augmentation d'expression observé pour les nitrate réductases et suggère que d'autres facteurs de régulation interviennent dans le biofilm. La voie d'assimilation du nitrite par NirBD était très fortement surexprimée dans toutes les conditions de culture. L'ammonium, essentiel à la croissance bactérienne, est présent en grande quantité dans le milieu 1403 utilisé dans les cultures pures. Dans le milieu ASW, aucun NH_4^+ n'est ajouté, obligeant les bactéries à chercher leurs NH_4^+ dans une autre source azotée comme le nitrate et le nitrite. Il n'est donc pas étonnant de voir *nirBD* fortement surexprimé dans ces conditions. Une légère surexpression a été observée pour le système de réduction de l'oxyde nitrique alors que les régulateurs *nnrS* et *norR* ont présenté une légère baisse d'expression. Cela suggère que le NO ne s'accumule pas plus dans le biofilm que dans la souche JAM1. Cependant, la souche JAM1 semble avoir une activité plus forte de réduction du NO, ce qui suggère à nouveau la présence d'un régulateur présent dans le biofilm et pas dans la culture pure. Cela conforte également l'hypothèse stipulant que la souche JAM1 participe à la réduction du NO dans le biofilm. *nosZ* a présenté une faible baisse d'expression, ce qui est en accord avec une plus faible expression de *nnrS*, qui est un régulateur connu de la réduction du N_2O . Aucun changement significatif n'a été observé dans la voie de synthèse de l'EPS. Cela suggère que la souche JAM1 ne synthétiserait pas plus d'EPS en biofilm qu'en culture pure. Cependant, les extractions ont été réalisées sur des biofilms matures dont la croissance était plus ou moins achevée. Il est donc possible que la souche JAM1 participe plus activement à la mise en place de la matrice extracellulaire lors de la croissance du biofilm. La méthanol déshydrogénase présente une expression similaire dans les biofilms et dans la souche sauvage, démontrant une utilisation identique du méthanol dans toutes ces conditions. Le gène de l'ectoïne-L-synthase est moins exprimé dans toutes les conditions de culture

du biofilm par rapport à la culture pure mais présente une forte variabilité. Cela est logique, car l'ectoïne est une molécule ayant des effets osmo-protecteurs. Or le milieu 1403 et le milieu AW sont deux milieux concentrés en sels, ce qui signifie que la souche JAM1 a le même besoin d'ectoïne dans les deux cas. La légère baisse d'expression peut être attribuée à une protection supplémentaire apportée par la structure même du biofilm. Par contre, il est surprenant d'observer une plus forte expression dans le milieu S5 (0% NaCl) par rapport aux milieux S3/S4 (concentration normale en NaCl).

On peut également considérer le nombre de gènes surexprimés ou sous-exprimés afin d'avoir une vision plus générale de l'impact des conditions de culture sur la bactérie (Fig. 8.1). Globalement, on peut voir que les métabolismes liés à l'azote, au carbone, les transporteurs ABC et les systèmes à deux composants sont plus exprimés en conditions biofilm qu'en cultures pures. Cela démontre une plus grande activité de la bactérie dans le biofilm, potentiellement liée à des interactions spécifiques avec son milieu et avec les autres membres de la communauté microbienne. Étant issu du biofilm à l'origine, il est possible que des facteurs présents dans ce milieu, et pas en culture pure, stimulent différents métabolismes chez la souche JAM1. À l'inverse, on peut voir que le métabolisme des peptides et la maintenance cellulaire étaient sous-régulés dans les biofilms. Ces deux métabolismes étant reliés à la croissance bactérienne, il n'est pas surprenant d'observer cette différence, étant donné que de la biomasse mature fut prélevée pour le biofilm (peu ou pas de croissance), alors que pour la culture pure, le prélèvement fut effectué en fin de période de croissance. On peut également remarquer un plus grand nombre de gènes surexprimés dans le milieu S5 par rapport à S3 et S4, au niveau du métabolisme de l'azote, mais surtout au niveau du système de sécrétion. *Hyphomicrobium nitratorans* NL23 est une bactérie ne tolérant pas les fortes concentrations de sel (Martineau *et al.*, 2013b) et s'est donc mieux développé dans le milieu S5 (0% NaCl). Il y a donc une plus grande production d'oxydes d'azote dans ce milieu (N₂O mais surtout NO), ce qui pourrait stimuler plus fortement tout le métabolisme lié à l'azote de la souche JAM1. Le système de sécrétion est sûrement stimulé à cause du manque de sel, le manque inhabituel de sel obligeant la souche JAM1 à sécréter des molécules dans son milieu pour compenser.

Table 8.1 : Ratio d'expression de différents gènes d'intérêt de JAM1 pour les cultures en biofilm par rapport à la culture pure.

Fonctions	Protéines	Milieux biofilm		
		S3	S4	S5
Nitrate				
NarK1K2GHJI[1]	Q7A_444 a Q7A_449	1,06	0,22	2,66
NarK12f	Q7A_479	2,38	2,59	2,20
NarGHJI[2]	Q7A_481 a Q7A_484	3,51	3,52	2,85
NarXL	Q7A_441, Q7A_442	0,59	0,58	0,63
Nitrite				
NirBD	Q7A_2620, Q7A_2621	17,8	31,0	41,3
NsrR	Q7A_409	2,73	1,90	2,13
NsrR	Q7A_67	1,27	1,47	0,17
Oxyde nitrique				
NorBC[1]	Q7A_433, Q7A_434	1,11	1,24	0,23
NorBC[2]	Q7A_487, Q7A_488	3,25	4,72	2,76
NnrS	Q7A_438	0,87	0,87	0,87
NorR	Q7A_435	0,63	0,64	0,13
Oxyde nitreux				
NosZ	Q7A_459	0,60	0,55	0,39
Carbone				
Méthanol déshydrogénase	Q7A_2765	1.15	0.98	0.94
EPS				
Conversion du glucose	Q7A_2032	0,90	0,98	0,83
Synthèse d'UDP-Glc	Q7A_678, Q7A_792, Q7A_1018, Q7A_1023, Q7A_1062, Q7A_1085, Q7A_1138, Q7A_1140, Q7A_2895, Q7A_219	1,27	1,34	1,17
Transfert des sucres	Q7A_791, Q7A_1016, Q7A_1093, Q7A_1094, Q7A_1104, Q7A_1108, Q7A_1109, Q7A_1411, Q7A_1413, Q7A_1417, Q7A_1420, Q7A_1421, Q7A_1424, Q7A_1425, Q7A_1432, Q7A_1435, Q7A_1436, Q7A_2382, Q7A_2388, Q7A_2434, Q7A_705	0,93	1,40	1,52
Polymérisation sucre	Q7A_2356, Q7A_2893, Q7A_153, Q7A_2302, Q7A_2335	0,61	0,64	0,48
Ectoine				
Ectoine-L-synthase	Q7A_1477	0,14	0,26	0,74

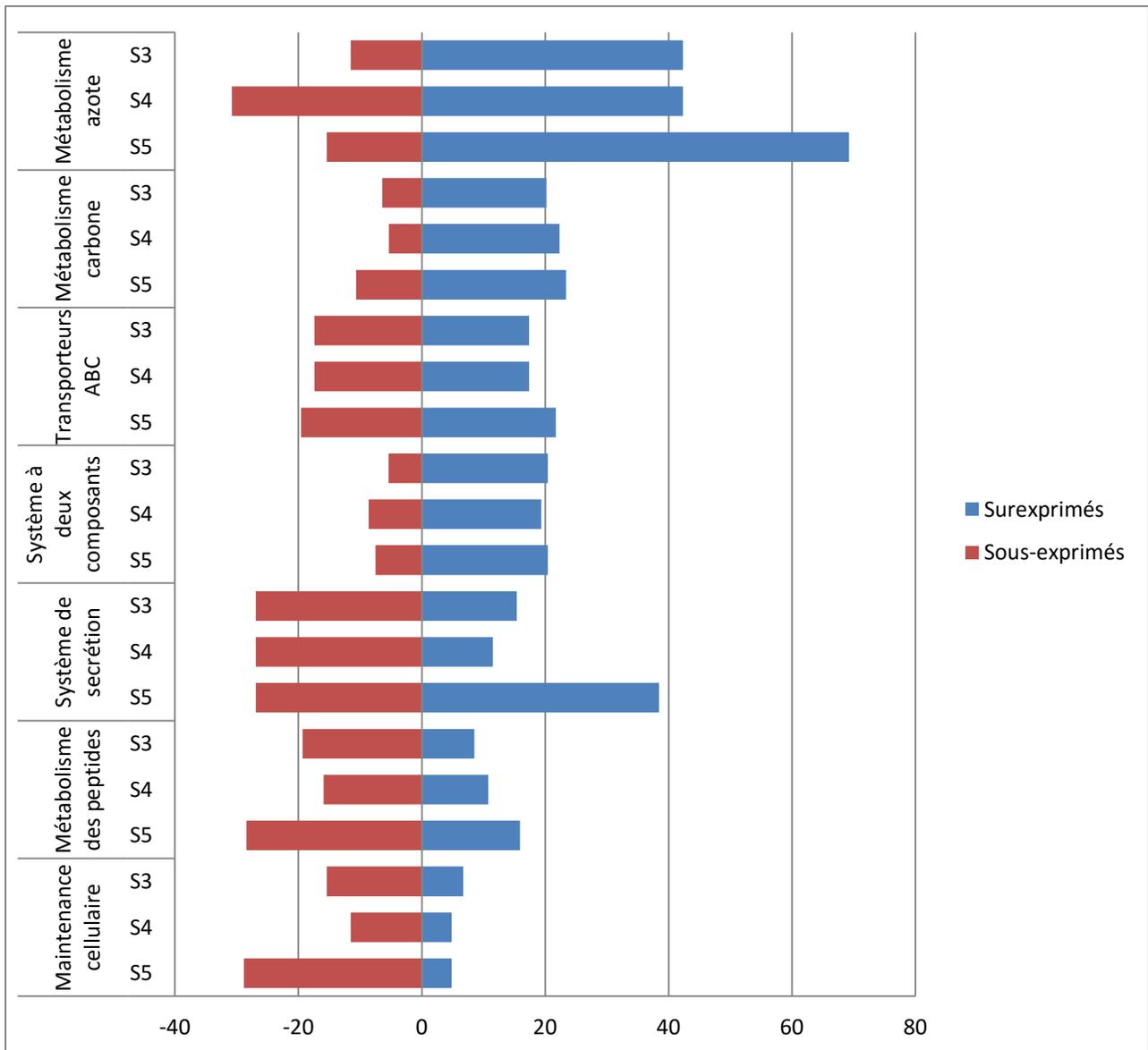


Figure 8.1 : Nombre de gènes dont la régulation est significativement différente ($q > 0,9$; NOISeq-SIM) chez JAM1 dans les cultures en biofilms par rapport à la culture pure.

9. Discussion

Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1 est une bactérie qu'on ne peut pas qualifier de dénitrifiante car elle est incapable de réduire le nitrite en NO, coupant ainsi sa voie de dénitrification en deux parties. Elle possède néanmoins une grande capacité à réduire le nitrate et à pouvoir croître grâce à cette réaction, ce qui (entre autres choses) fait d'elle une espèce unique du genre *Methylophaga*. Les mutants *knockout* de *narG1* et *narG2* ont permis d'en apprendre plus sur le rôle particulier de chacune des nitrate réductases de la souche JAM1 (*article 1*). Malheureusement l'étude n'est pas complète car il fut impossible de compléter les souches mutantes du fait de l'incompatibilité des plasmides testés, mais aussi de la taille de l'opéron à intégrer. Néanmoins, il est permis de penser que la complémentation de ces souches n'aurait pas apporté beaucoup d'informations complémentaires, les nitrate réductases étant très bien caractérisées (Einsle *et al.*, 2004, Zumft, 1997). La seule information utile qu'il aurait été possible de retirer d'une complémentation est l'impact des transporteurs dans le taux de réduction du nitrate. En effet, la mutation du gène *narG1* pourrait potentiellement affecter la transcription des transporteurs *narK1K2* situés en amont dans le même opéron (Maloy *et al.*, 1993). Malgré cela, d'autres transporteurs sont également présents dans le génome, et leur nombre pourrait être suffisant pour assurer une efficacité maximale au niveau du transport du nitrate et du nitrite (Moir *et al.*, 2001).

Les différences d'efficacité entre les deux nitrate réductases soulignent leurs probables origines différentes (Fig. 6.3). Elles contribuent néanmoins toutes les deux à la croissance cellulaire. Si on regarde le taux de croissance spécifique (μ_{\max}/k_s) de chaque mutant, on retrouve des valeurs similaires à celles de la souche sauvage (Table 6.3). Cette différence d'efficacité peut finalement s'expliquer par un plus grand nombre de Nar1 que de Nar2 dans la cellule, comme démontré par l'étude transcriptomique (Table 6.2). Il est aussi très probable que Nar1 et Nar2 agissent à différents niveaux dans la bactérie et ne soient pas équivalentes. C'est ce que l'on retrouve chez d'autres bactéries comme *E. coli* et *Hyphomicrobium zavarzinii* ayant aussi plusieurs copies d'une nitrate réductase, où les deux enzymes n'agissent pas de la même manière sur la réduction du nitrate (Bonney *et al.*, 1994, Chang *et al.*, 1999, Y. Chen *et al.*, 2011, Hartsock *et al.*, 2011, Potter *et al.*, 1999a). Par contre, il est certain que Nar1 et Nar2 ont une synergie dans la bactérie car l'association des deux enzymes semble plus efficace

que l'addition des effets des enzymes séparées (Fig. 6.4). Chez les bactéries citées précédemment, les nitrate réductases similaires ont également une régulation propre à chacune, et chacune ne permet pas toujours la croissance de la bactérie.

Le système de réduction du nitrate de la souche JAM1 réagit également de façon particulière aux facteurs environnementaux. De manière générale, *nar[2]* et *narK12f* ont une régulation conforme au schéma classique FNR/NarL, alors que ce n'est pas le cas de *nar[1]*. Il est curieux de constater que seuls des sites de régulation NarL sont présents dans les séquences promotrices de *nar[1]* et *nar[2]* (Table 6.1). On peut voir que l'oxygène ne réprime l'expression que de l'opéron *nar[2]* malgré l'absence de sites de type FNR/ANR dans le promoteur, et que le nitrate ne joue le rôle d'activateur ni pour *nar[1]* ni pour *nar[2]*, alors que des sites NarL sont présents (Fig. 6.5-A). Le nitrate semble même avoir un effet de répression sur *nar[1]* en conditions aérobies. Cela est difficilement explicable car cet effet va à l'encontre de la régulation connue pour les nitrate réductases et ne semble être présent qu'en milieu aérobie (Gunsalus *et al.*, 1994). Il est possible que cette baisse d'expression soit induite par le nitrite produit par la réduction du nitrate. Auclair *et al.* (2010) montra qu'avec 0.36 mM de nitrite dans le milieu de départ, la croissance de la souche JAM1 était grandement diminuée du fait de la toxicité du nitrite. Cette concentration augmente jusqu'à 30 mM dans les cultures de la souche JAM1 (Fig. 6.3). La toxicité du nitrite pourrait alors être responsable de la baisse d'expression de *narG1*, en accord avec l'observation d'une croissance plus faible de la souche JAM1 en conditions aérobies avec nitrate par rapport aux conditions aérobies sans nitrate (Fig. 6.3-A). Cela reste cependant très peu probable car les autres gènes étudiés (*narG2* et *narK12f*) ne présentent pas de baisse significative de leurs expressions dans ces conditions (Fig. 6.5-A). La baisse d'expression de *narG1* en l'absence de *narG2* n'est pas explicable non plus (Fig. 6.5-C). Cela suggère une régulation de l'expression de *narG1* par *narG2*, un phénomène jamais décrit dans la littérature à ce jour. De plus, ce mécanisme semble se mettre en place uniquement en présence d'oxygène. Il est possible que *narG2* agisse sur une voie de régulation indirecte impliquant l'oxygène.

De manière absolue, *narG1* est 5 fois plus exprimé que *narG2* dans la culture pure (Table 6.2). Cette donnée est en accord avec l'impossibilité de détecter des ARNm de *narG2* dans le biofilm (Auclair *et al.*, 2011), amenant l'hypothèse d'une régulation différente entre *narG1* et *narG2*. Les données de transcriptomiques récentes ne sont

pas totalement en accord avec les résultats trouvés précédemment. On peut voir que dans les conditions de culture S3 et S4, *nar[1]* est moins ou, au mieux tout autant, exprimé qu'en culture pure, alors que *nar[2]* est plus de 3 fois plus exprimé en biofilm qu'en culture pure (Table 8.1). Cela ramène *nar[1]* et *nar[2]* à des niveaux d'expression absolue plus proches dans le biofilm. Ces données mettent en avant une régulation particulière de *nar[2]* dans le biofilm et potentiellement un rôle spécifique de cette nitrate réductase. La communication intercellulaire et inter-espèce est un facteur contrôlant grandement la régulation de l'expression de nombreux gènes (Toyofuku *et al.*, 2016). Le biofilm est un milieu propice à une proximité élevée entre différentes espèces bactériennes et influence le comportement de ces dernières. Il se peut donc que *nar[2]* soit régulé en partie par la communication intercellulaire et inter-espèce. Cette différence d'expression pourrait également être causée par un facteur environnemental dû au changement du milieu de culture. En effet, la culture pure est réalisée avec le milieu 1403, alors que les cultures de biofilm sont faites dans le milieu ASW, un milieu d'eau de mer artificielle. Par exemple, on peut voir que l'expression de *nirBD* est plus de 17 fois plus élevée dans le biofilm par rapport à la culture normale. Ceci s'explique par l'absence de NH_4^+ dans le milieu ASW, alors que le milieu 1403 est supplémenté avec une grande quantité de NH_4^+ . De tels facteurs pourraient également influencer l'expression de *nar[2]*, tel que le nitrite qui s'accumule en culture pure mais pas dans le biofilm. Seul le milieu S5 montre une surexpression similaire pour *nar[1]* et *nar[2]*, gardant les rapports d'expression absolue des deux opérons au même niveau (Table 8.1). On observe une situation équivalente pour *nor[1]* et *nor[2]*. En effet, *nor[1]* est affilié aux gammaprotéobactéries alors que *nor[2]* est affilié aux betaprotéobactéries. En culture pure, *nor[1]* est exprimé environ 9 fois plus que *nor[2]*, suggérant un rôle et une régulation différente pour ces deux opérons (Table 6.2). En présence de NO dans le milieu, on peut voir que *nor[1]* est fortement surexprimé alors que *nor[2]* ne l'est pas, indiquant clairement une différence de régulation entre les deux opérons (Fig. 7.7). Finalement, de la même manière que *nar[1]* et *nar[2]*, *nor[2]* est en moyenne 3,5 fois plus exprimé dans le biofilm par rapport à la culture pure, alors que l'expression de *nor[1]* reste la même (Table 8.1). *nar[2]* et *nor[2]* ont donc une régulation différente dans le biofilm par rapport à la culture pure. Un facteur de régulation absent chez la souche JAM1 est potentiellement présent dans le biofilm et agirait sur l'expression de ces 2 opérons. Il est possible que ce facteur de régulation soit produit chez une autre bactérie

du biofilm et secrété dans le milieu, ayant pour conséquence l'activation de ces opérons chez la souche JAM1.

La souche JAM1 est capable de réduire le nitrate en nitrite avec toutes les particularités liées à ses nitrate réductases comme on l'a vu précédemment. Elle est également capable de réduire le NO et le N₂O (Fig. 7.1-A et 7.2). La réduction du NO est cependant déduite de manière indirecte par la détection du N₂O produit à partir de la réduction de ce NO, l'appareillage pour la mesure directe du NO n'étant pas disponible. Le NO n'étant pas facilement manipulable, l'introduction de NO dans les cultures de JAM1 est réalisée à l'aide de nitroprusside de sodium qui se dégrade naturellement et relâche du NO dans le milieu. Afin de voir l'apparition de N₂O dans le milieu, les cultures ont été réalisées en conditions aérobies car la réduction du N₂O s'arrête en phase stationnaire en conditions aérobies (Fig. 7.1-A). L'acétylène, un bloqueur naturel de la réduction du N₂O, peut également être utilisé en conditions anaérobies. Cette production de N₂O, bien que significative, est lente et pourrait être due seulement à la toxicité du nitroprusside (Joannou *et al.*, 1998) ou à de faibles taux de dégradation de cette molécule dans le milieu 1403. La capacité de réduire le NO et le N₂O de la souche JAM1 implique qu'elle est très probablement un des acteurs de ces réductions dans le biofilm. La capacité de la souche JAM1 à croître en utilisant le N₂O comme seul accepteur d'électron renforce cette idée (Fig. 7.1-B). La croissance maximale atteinte dans ces conditions est plus faible qu'avec du nitrate en tant qu'accepteur final d'électrons malgré la saturation de la phase gazeuse en N₂O. La réduction du N₂O est productrice d'énergie pour la cellule malgré la nature soluble de l'enzyme Nos (Zumft, 1997). Cependant, elle l'est moins qu'une nitrate réductase. De plus, la souche JAM1 possède deux Nar et une seule Nos. Il n'est donc pas surprenant que la croissance de la souche JAM1 avec du N₂O soit plus lente qu'avec du nitrate.

Une production de N₂O a été également observée chez la souche JAM1 en phase stationnaire, que ce soit en conditions aérobies ou anaérobies (Fig. 7.1-A). Différentes bactéries, comme *Serratia marcescens* ou *E. coli*, sont capables de produire du N₂O sans passer par la voie de la dénitrification (Bleakley *et al.*, 1982). Cette production s'effectue par la voie de nitrification grâce à la présence d'ammonium/méthane monooxygénase et d'hydroxylamine oxydoréductase codés par les gènes *amo* et *hao*, respectivement. Ces gènes ne sont pas présents chez la souche JAM1; pourtant la production de NH₂OH a été confirmée et ne peut se faire qu'en

présence de nitrite (Fig. 7.6). Le délai d'apparition du nitrite et de l'hydroxylamine dans le milieu n'est certainement responsable de la production du N₂O qu'en phase stationnaire. L'activation du gène *nnrS* pendant la phase de production du N₂O met en avant la présence de NO pendant cette phase, démontrant que le N₂O est produit à partir du NO grâce aux Nor, eux aussi actifs dans cette phase (Fig. 7.7). Les cultures dans les milieux sans NH₄Cl démontrent quant à eux que l'ammonium faisait bien partie du processus de production du N₂O (Fig. 7.3). Des tests de marquage au ¹⁵N ont montré que le N₂O était majoritairement produit à partir du NO₂⁻ accumulé dans le milieu, mais également un peu à partir du NH₂OH. Une production abiotique du N₂O est l'hypothèse la plus probable, mettant en jeu des réactions de chimio-dénitrification et d'oxydation de l'hydroxylamine (Butterbach-Bahl *et al.*, 2013, Chalk *et al.*, 1983). Par contre, l'oxydation de l'ammonium par la souche JAM1 reste inexpliquée, car aucune réaction abiotique oxydant l'ammonium en hydroxylamine n'est connue dans la littérature de microbiologie. Il est possible que la réaction conduisant l'ammonium à être oxydé en NH₂OH soit causée par du co-métabolisme.

La souche JAM1 est la bactérie dominante du biofilm dénitrifiant et a donc un rôle important à jouer, que ce soit au niveau de la dénitrification mais aussi au niveau d'autres métabolismes. Une caractéristique majeure d'un biofilm est sa matrice d'EPS qui constitue le milieu dans lequel évoluent les bactéries (De Beer *et al.*, 2006). La souche JAM1 possède dans son génome les gènes nécessaires à la synthèse d'EPS et forme des floccs en culture liquide qui sont, entre autres, constitués de biopolymères comme l'EPS. Ainsi, il est possible que la souche JAM1 soit la principale responsable de la mise en place de la matrice d'EPS dans le biofilm et que la voie de synthèse de l'EPS soit surexprimée dans ces conditions de culture. Pourtant, les niveaux d'expression des gènes participant à cette synthèse sont à peu près les mêmes entre la culture pure et le biofilm (Table 8.1). Alors que le transcriptome de la culture pure a été réalisé sur des bactéries en pleine croissance, celui du biofilm a été réalisé sur des biofilms mûrs afin de récolter assez de biomasse. De manière générale, la production d'EPS est régulée par des facteurs liés à la communication cellulaire comme le quorum sensing (Nadell *et al.*, 2008). Certaines bactéries synthétisent plus d'EPS pendant la phase de croissance, alors que d'autres le feront plutôt en phase stationnaire (Sutherland, 2001). L'aération de la culture est également un facteur pouvant influencer cette production. En culture pure, on peut observer que la souche JAM1 possède une plus grande tendance à flocculer en présence d'oxygène et pendant sa phase de croissance. Les floccs se

désagrègent généralement en phase stationnaire. Ceci pourrait expliquer pourquoi on retrouve des expressions similaires pour les gènes liés à la synthèse de l'EPS entre le biofilm mature et la culture pure en croissance.

Un autre aspect important du biofilm dénitrifiant est sa protection contre les niveaux élevés de sel du milieu. Cet aspect est mis en avant par la simple présence d'*Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 dans le biofilm (Auclair *et al.*, 2011). Cette bactérie ne peut croître dans un milieu avec une salinité supérieure à 1% (Martineau *et al.*, 2013b). Elle est pourtant une des espèces bactériennes majoritaires du biofilm, alors que le milieu de culture ASW utilisé pour le cultiver possède un taux de salinité de 2.75%. L'ectoïne est une molécule ayant des propriétés osmoprotectantes (Jebbar *et al.*, 1992). La souche JAM1, qui possède le gène de synthèse de l'ectoïne, participe potentiellement à la protection des espèces sensibles aux sels dans le biofilm en sécrétant de l'ectoïne dans le milieu. Mais on peut voir que l'expression ce gène est plus faible dans les cultures en biofilm par rapport aux cultures pures (Table 8.1). Tel que pour l'EPS, les stades de croissance différents entre les deux conditions pourraient être à l'origine de cette baisse d'expression. De plus, on peut remarquer que l'expression de ce gène est plus élevée dans le milieu S5 (0% NaCl) que dans les milieux S3 et S4, alors qu'il serait plus logique d'observer le contraire.

Finalement, on peut voir que les gènes liés aux métabolismes du carbone et de l'azote, aux transporteurs ABC et aux systèmes à deux composants sont en majorité plus exprimés dans le biofilm par rapport à la culture pure (Fig. 8.1). Cela suggère que la souche JAM1 est plus stimulée par les conditions abiotiques et biotiques dans le biofilm que dans la culture pure malgré les différences au niveau des phases de croissance évoquées précédemment. À l'inverse, les gènes liés aux systèmes de sécrétion, au métabolisme des peptides et à la maintenance cellulaire sont majoritairement moins exprimés dans le biofilm. Cela suggère que la souche JAM1 possède une croissance plus lente dans le biofilm, ce qui est en accord avec la nature mature du biofilm par rapport à la culture pure en pleine phase de croissance. Il n'est pas surprenant que la souche JAM1 soit plus active dans le biofilm car c'est son milieu d'origine. Cela souligne une nouvelle fois son importance dans le fonctionnement du biofilm de manière globale.

10. Conclusion

Methylophaga nitratireducentiscrescens JAM1 est une espèce singulière par bien des aspects. Elle possède une place importante dans un biofilm dénitrifiant et y joue un rôle fondamental. Sa voie de dénitrification est également particulière. La souche JAM1 semble être la bactérie responsable de la réduction du nitrate dans le biofilm, étape clé étant donné que le rôle premier du biofilm est la réduction du nitrate. Cette capacité à réduire le nitrate repose sur la présence de deux nitrate réductases. Nar1, probablement acquise par transfert horizontal de gènes, est la plus efficace et la plus exprimée chez la souche JAM1. Nar2 ne permet pas une croissance et une réduction du nitrate aussi efficace que Nar1, mais régule l'expression de cette dernière. Un tel mécanisme n'a jamais été observé chez une autre espèce bactérienne et est donc une particularité propre à la souche JAM1. De plus, son système de réduction du nitrate ne semble pas être régulé par les facteurs environnementaux de manière classique. La réduction du nitrite en NO est impossible chez la souche JAM1, mais cette dernière est capable de réduire le nitrite en ammonium par une voie de réduction assimilative. Toutefois, les capacités de réduction du NO et du N₂O de la souche JAM1 ont été démontrées ainsi que la capacité à croître sur le N₂O. La réduction du NO est une étape clé de la dénitrification car cette molécule est extrêmement toxique pour les bactéries. En réduisant le NO et le N₂O, la souche JAM1 apparaît une nouvelle fois à une place importante dans le biofilm. Elle possède deux oxyde nitrique réductases afin de réduire le NO, maximisant l'efficacité de la réaction. Nor1 est l'oxyde nitrique réductase la plus exprimée et est particulièrement surexprimée en présence de NO, certainement par l'intermédiaire du senseur de NO NnrS lui aussi surexprimé dans les mêmes conditions. À l'inverse, Nor2, acquise par transfert horizontal, ne réagit pas à la présence de NO. Son rôle est certainement différent de celui de Nor1, tout comme Nar1 et Nar2. Participant au début et à la fin de la dénitrification et étant la plus abondante, la souche JAM1 peut être considérée comme une des bactéries la plus importante pour la dénitrification du biofilm. Elle ne peut cependant compléter seule cette réaction et s'appuie sur la présence d'autres espèces du biofilm afin de la compléter, notamment *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23. L'importance de la souche JAM1 dans le biofilm est soulignée par la grande activité de ses différents métabolismes. Au-delà de la dénitrification, la souche JAM1 joue certainement un rôle primordial dans d'autres

aspects du biofilm, comme ses mécanismes d'assimilation du méthanol qu'elle partage avec d'autres membres du biofilm. Elle est également capable de synthétiser de l'EPS qui est la structure même du biofilm alors que la souche NL23 n'en est pas capable. Cela suggère que la souche JAM1 serait l'espèce formant structurellement le biofilm dans lequel elle se trouve. Finalement, sa grande tolérance aux sels est due à sa capacité à produire de l'ectoïne. Très sensible aux fortes concentrations de sels, la souche NL23 se développe néanmoins aisément dans le biofilm qui évolue dans un milieu marin. Il est possible, qu'en plus de la structure même du biofilm, la souche JAM1 apporte une protection aux bactéries sensibles aux sels en excréant son ectoïne dans le biofilm, soulignant une fois de plus l'importance de la souche JAM1 dans le biofilm.

11. Perspectives

La dénitrification est une partie importante du cycle biogéochimique de l'azote et impacte notre société à plusieurs niveaux (agriculture, pollution des sols et de l'atmosphère). La compréhension de ce processus dans son ensemble revêt donc un grand intérêt. Les données apportées par cette thèse ont permis de mettre en évidence une voie de dénitrification particulière et des mécanismes de régulation nouveaux. Cependant, la nature de ces mécanismes est encore inconnue et seule l'implication de *narG2* a été mise à jour. De plus profondes études sur cette régulation pourraient conduire à la découverte de nouveaux régulateurs des nitrate réductases et ainsi parfaire la compréhension de la dénitrification.

Cette étude apporte également une meilleure compréhension du phénomène de dénitrification chez les bactéries marines, domaine peu étudié et couvert dans la littérature. Elle permet également une meilleure compréhension des systèmes à double nitrate réductases qui sont peu communs parmi les bactéries dénitrifiantes. La souche JAM1 possède également deux oxides nitriques réductases, ce qui participe au caractère unique de la bactérie. Généralement, la réduction du NO est très efficace et rapide compte tenu du caractère très toxique du composé. La présence de deux oxides nitriques réductases est d'autant plus surprenante. Une étude équivalente à celle faite sur les nitrate réductases pourrait être réalisée afin de comprendre le rôle de chaque enzyme.

Finalement, cette thèse apporte une meilleure compréhension du fonctionnement du biofilm dénitrifiant, en étudiant un de ses principaux acteurs. Ces connaissances pourront servir à l'amélioration des systèmes de dénitrification biologique d'eau de mer et potentiellement à l'élaboration de nouveaux systèmes reposant en partie sur *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1. Pour cela, l'étude des relations entre les différentes bactéries peuplant le biofilm est primordiale car le processus de dénitrification repose sur une syntrophie entre plusieurs bactéries. Ainsi, une étude des interactions entre la souche JAM1 et NL23 pour faire la dénitrification pourrait servir à identifier des facteurs favorisant le processus. Les espèces minoritaires du biofilm peuvent également revêtir une grande importance pour le bon fonctionnement du biofilm et leur étude permettrait d'achever le portrait général du biofilm.

Annexe

Script - alignement sur génome

Tous les calculs ont été effectués sur le serveur Briarée de Calcul Québec en utilisant les modules disponibles. Le pipeline suivant a été créé en suivant les conseils et indications présents à l'adresse <http://rnaseq.uoregon.edu/#analysis>

Module fastx_tools/0.0.13

Transformation des séquences de l'ensemble R2

```
fastx_reverse_complement -Q33 -v -i sequenceR2.fastq -o  
sequenceR2_revcomp.fastq
```

Réunion des deux ensembles

```
cat sequenceR1.fastq sequenceR2_revcomp.fastq > sequence.fastq
```

Filtrage des reads par qualité

```
fastq_quality_filter -Q33 -q 20 -p 90 -i sequence.fastq -o sequence.filtered.fastq
```

- **sequenceR1.fastq** et **sequenceR2.fastq** : fichiers de séquençage Illumina contenant les reads.

Module bowtie/2.2.3

Construction du répertoire et alignement sur le génome

```
bowtie2-build $SCRATCH/repertoire/genome.fasta nom_bactérie
```

```
bowtie2 -x nom_bactérie -U sequence.filtered.fastq -S alignement.sam
```

- **génome.fasta** : génome de la bactérie (NCBI)
- **sequence.filtered.fastq** : fichier de reads généré précédemment

Module SAMtools/0.1.18

Conversion de .sam en .bam

```
samtools view -S -b alignement.sam > alignement.bam
```

Tri et indexation

```
samtools sort alignement.bam alignement.sorted
```

```
samtools index alignement.sorted.bam
```

- **alignement.sam** : fichier d'alignement généré précédemment.

Module BEDTools/2.20.1

Annotation

```
bedtools multicov -bams alignement.sorted.bam -bed annotation.gff > fichier.txt
```

Calcul du contenu GC

```
bedtools nuc -fi genome.fasta -bed annotation.gff > resultats.txt
```

- **alignement.sorted.bam** : fichier d'alignement généré précédemment.
- **annotation.gff** : fichier d'annotation des gènes correspondant au génome étudié (NCBI)

Script – Normalisation avec R (NOIseq)

Ce script a été réalisé selon les recommandations décrites dans le document disponible à l'adresse suivante :

<https://www.bioconductor.org/packages/3.3/bioc/vignettes/NOISeq/inst/doc/NOISeq.pdf>

Les informations sur les types de fichier à utiliser et le fonctionnement du package sont dans ce document.

Installation des packages requis

```
source("http://bioconductor.org/biocLite.R")  
biocLite()  
source("http://bioconductor.org/biocLite.R")  
biocLite(NOISeq)
```

Chargement des packages nécessaires

```
library(BiocGenerics)  
library(Biobase)  
library(splines)  
library(NOISeq)
```

Définition du répertoire de travail

```
setwd("C:\\Users\\Name\\Desktop\\Dossier\\NOIseq analysis")
```

Création des différents fichiers de données

```
data <- read.table(file = "fichier.txt", header = FALSE)  
Qcounts = data.frame(counts1 = data[,2], counts2 = data[,3], row.names = data[,1])  
Qfactors = data.frame(Condition = c("condition1", "condition2"))  
Qlength = data.frame(length = data[,5], row.names = data[,1])
```

```
QLvector = as.vector(t(Qlength))  
QGC = data.frame(length = data[,4], row.names = data[,1])
```

Création du Read data

```
Qdata <- readData(data = Qcounts, factors = Qfactors, length = Qlength, gc = QGC,  
biotype = NULL, chromosome = NULL)
```

Analyse de la qualité des séquences

```
Qsaturation = dat(Qdata, k=0, ndepth = 7, type = "saturation" )  
explo.plot (Qsaturation, toplot = 1, samples = 1:2, yrightlim = NULL)
```

Analyse des biais de longueur

```
Qlengthbias = dat(Qdata, factor = "Condition", type = "lengthbias" )  
explo.plot(Qlengthbias, sample = NULL, toplot = "global")  
show(Qlengthbias)
```

Analyse des biais GC

```
QGCbias = dat(Qdata, factor = "Condition", type = "GCbias")  
explo.plot(QGCbias, sample = NULL, toplot = "global")
```

Standardisation

```
QRPKM = rpkm(assayData(Qdata)$exprs, long = QLvector, k = 0, lc = 1)
```

Filtrage pour enlever les transcrits peu présents

```
sink("C:\\Users\\ Name\\Desktop\\Dossier\\NOIseq analysis\\Expression_report.txt",  
append=FALSE, split=FALSE)
```

```
Qfilt = filtered.data(Qcounts, factor = Qfactors$Condition, norm = FALSE, depth = NULL,
method = 1, cv.cutoff = 100, cpm = 1)

sink()
```

NOISeq-sim (test statistique avec réplicats simulés)

```
Qresults = noiseq(Qdata, factor = "Condition", k=NULL, norm = "n", pnr = 0.2, nss = 5,
v=0.02, lc = 1, replicates = "no")

head(Qresults@results[[1]])

DE.plot(Qresults, q=0.9, graphic="expr", log.scale=TRUE)
```

```
Rapport d'expression après NOISeq-simsink("C:\\Users\\
Name\\Desktop\\Dossier\\NOIseq analysis\\Expression_report.txt", append=TRUE,
split=FALSE)

Qresults.deg = degenes(Qresults, q = 0.9, M = NULL)

Qresults.deg = degenes(Qresults, q = 0.9, M = "up")

Qresults.deg = degenes(Qresults, q = 0.9, M = "down")

sink()
```

Exportation des résultats dans un fichier texte (Bazylinski et al., 1986)

```
write.table(Qresults@results[[1]], file = "Myresults.txt", append = FALSE, quote = TRUE,
sep = "\t", eol = "\n", na = "NA", dec = ".", row.names = TRUE, col.names = TRUE,
qmethod = c("escape", "double"), fileEncoding = "")
```

Références

- Adman ET, Godden J & Turley S (1995) The structure of copper-nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* at five pH values, with NO⁻ 2 bound and with type II copper depleted. *Journal of Biological Chemistry* 270(46):27458-27474.
- Afkhami A, Madrakian T & Maleki A (2006) Indirect kinetic spectrophotometric determination of hydroxylamine based on its reaction with iodate. *Analytical Sciences* 22(2):329-331.
- Al-Attar S & de Vries S (2015) An electrogenic nitric oxide reductase. *FEBS letters* 589(16):2050-2057.
- Allison DG, Gilbert P, Lappin-scott HM & Wilson J (2000) Community structure and co-operation in biofilms. in *Fifty-ninth symposium of the society for general microbiology*, Édité Allison DG, Gilbert P, Lappin-scott HM & Wilson J (The press syndicate of the university of Cambridge, University of Exeter).
- Andersen CL, Jensen JL & Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64(15):5245-5250.
- Anderson DM, Glibert PM & Burkholder JM (2002) Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25(4b):704-726.
- Anderson IC, Poth M, Homstead J & Burdige D (1993) A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(11):3525-3533.
- Anthony C (1982) *Biochemistry of methylotrophs*. Academic Press,
- Anthony C (2004) The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Archives of biochemistry and biophysics* 428(1):2-9.
- Antony CP, Doronina NV, Boden R, Trotsenko YA, Shouche YS & Murrell JC (2012) *Methylophaga lonarensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic methylotroph isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(Pt 7):1613-1618.
- Arai H, Mizutani M & Igarashi Y (2003) Transcriptional regulation of the nos genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 149:29-36.
- Arp DJ, Sayavedra-Soto LA & Hommes NG (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of microbiology* 178(4):250-255.
- Auclair J, Lepine F, Parent S & Villemur R (2010) Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a *Methylophaga* strain containing two highly divergent *narG* sequences. *ISME Journal* 4(10):1302-1313.
- Auclair J, Parent S & Villemur R (2011) Functional diversity in the denitrifying biofilm of the methanol-fed marine denitrification system at the Montreal Biodome. *Microbial Ecology* 10.1007/s00248-011-9960-2.
- Auclair J, Parent S & Villemur R (2012) Functional diversity in the denitrifying biofilm of the methanol-fed marine denitrification system at the Montreal Biodome. *Microbial Ecology* 63(4):726-735.

- Baikalov I, Schröder I, Kaczor-Grzeskowiak M, Grzeskowiak K, Gunsalus RP & Dickerson RE (1996) Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* 35(34):11053-11061.
- Baker SC, Ferguson SJ, Ludwig B, Page MD, Richter O-MH & van Spanning RJM (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(4):1046-1078.
- Ballard AL & Ferguson SJ (1988) Respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*. *European Journal of Biochemistry* 174(1):207-212.
- Bamford VA, Angove HC, Seward HE, Thomson AJ, Cole JA, Butt JN, Hemmings AM & Richardson DJ (2002) Structure and spectroscopy of the periplasmic cytochrome c nitrite reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 41(9):2921-2931.
- Bartnikas TB, Wang YS, Bobo T, Veselov A, Scholes CP & Shapleigh JP (2002) Characterization of a member of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 encoding a haem-copper protein. *Microbiology* 148:825-833.
- Barton LL (2005) Metabolism of nitrogen and sulfur. *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*:680-720.
- Bazylnski DA, Soohoo CK & Hollocher TC (1986) Growth of *Pseudomonas aeruginosa* on nitrous oxide. *Applied and Environmental Microbiology* 51(6):1239-1246.
- Bedzyk L, Wang T & Rick WY (1999) The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *Journal of bacteriology* 181(9):2802-2806.
- Bergaust L, van Spanning RJM, Frostegård Å & Bakken LR (2011) Expression of nitrous oxide reductase in *Paracoccus denitrificans* is regulated by oxygen and nitric oxide through FnrP and NNR. *Microbiology*:826-834.
- Berks BC, Ferguson SJ, Moir JWB & Richardson DJ (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1232(3):97-173.
- Betlach MR (1982) Evolution of bacterial denitrification and denitrifier diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 48(6):585-607.
- Beutel MW, Newton CD, Brouillard ES & Watts RJ (2009) Nitrate removal in surface-flow constructed wetlands treating dilute agricultural runoff in the lower Yakima Basin, Washington. *Ecological Engineering* 35(10):1538-1546.
- Blasco F, Iobbi C, Ratouchniak J, Bonnefoy V & Chippaux M (1990) Nitrate reductases of *Escherichia coli* - Sequence of the 2nd nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJ* operon. *Molecular & General Genetics* 222(1):104-111.
- Blasco F, Nunzi F, Pommier J, Brasseur R, Chippaux M & Giordano G (1992) Formation of active heterologous nitrate reductases between nitrate reductases A and Z of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 6(2):209-219.
- Bleakley BH & Tiedje JM (1982) Nitrous-oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology* 44(6):1342-1348.
- Bock E & Koops H (1992) The genus *Nitrobacter* and related genera. Balows A, Tr€uper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, editors. *The prokaryotes*. New York: Springer:2302-2309.
- Boden R (2012) Emended description of the genus *Methylophaga* Janvier et al. 1985. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(7):1644-1646.
- Boden R, Kelly DP, Murrell JC & Schäfer H (2010) Oxidation of dimethylsulfide to tetrathionate by *Methylophaga thiooxidans* sp. nov.: a new link in the sulfur cycle. *Environmental Microbiology* 12(10):2688-2699.

- Bogardi I, Kuzelka RD & Ennenga W (1991) *Nitrate contamination*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1. 520 p
- Bonnefoy V & Demoss JA (1992) Identification of functional cis-acting sequences involved in regulation of *narK* gene-expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 6(23):3595-3602.
- Bonnefoy V & Demoss JA (1994) Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 66(1-3):47-56.
- Boogerd FC, Vanverseveld HW & Stouthamer AH (1983) Dissimilatory nitrate uptake in *paracoccus denitrificans* via a delta-mu-H⁺-dependent system and a nitrate-nitrite antiport system. *Biochimica Et Biophysica Acta* 723(3):415-427.
- Bothe H, Ferguson SJ & Newton WE (2006) *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier,
- Bouchard DC, Williams MK & Surampalli RY (1992) Nitrate combination of groundwater sources and potential health effects. *Journal of the American Medical Association* 7:85-90.
- Breton J, Berks BC, Reilly A, Thomson AJ, Ferguson SJ & Richardson DJ (1994) Characterization of the paramagnetic iron-containing redox centres of *Thiosphaera pantotropha* periplasmic nitrate reductase. *FEBS letters* 345(1):76-80.
- Brondijk THC, Fiegen D, Richardson D & Cole JA (2002) Roles of NapF, NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in ubiquinol oxidation. *Molecular microbiology* 44(1):245-255.
- Brondijk THC, Nilavongse A, Filenko N, Richardson D & Cole JA (2004) NapGH components of the periplasmic nitrate reductase of *Escherichia coli* K-12: location, topology and physiological roles in quinol oxidation and redox balancing. *Biochemical Journal* 379:47-55.
- Brown K, Tegoni M, Prudêncio M, Pereira AS, Besson S, Moura JJ, Moura I & Cambillau C (2000) A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nature Structural & Molecular Biology* 7(3):191-195.
- Burns RC & Hardy RW (1975) *Nitrogen fixation in bacteria and higher plants*. Springer Verlag.,
- Butterbach-Bahl K, Baggs EM, Dannenmann M, Kiese R & Zechmeister-Boltenstern S (2013) Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 368(1621).
- Camargo JA, Alonso A & Salamanca A (2005) Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58(9):1255-1267.
- Cartmell E, Clark L, Oakes D, Smith S & Wheeler H (1998) The feasibility of in situ bioremediation of groundwater nitrate. *Contaminated Soil '98, Vols 1 and 2:1117-1118*.
- Cartron M, Roldan M, Ferguson SJ, Berks B & Richardson D (2002) Identification of two domains and distal histidine ligands to the four haems in the bacterial c-type cytochrome NapC; the prototype connector between quinol/quinone and periplasmic oxido-reductases. *Biochemical Journal* 368:425-432.
- Castiglione N, Rinaldo S, Giardina G, Stelitano V & Cutruzzola F (2012) Nitrite and nitrite reductases: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 17(4):684-716.
- Castignetti D & Hollocher TC (1984) Heterotrophic nitrification among denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology* 47(4):620-623.
- Chalk PM & Smith CJ (1983) Chemodenitrification. *Gaseous Loss of Nitrogen from Plant-Soil Systems*, (Developments in Plant and Soil Sciences: 9), Freney JR & Simpson JR (Édit.) Springer Netherlands. p 65-89.

- Chang L, Wei LLC, Audia JP, Morton RA & Schellhorn HE (1999) Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. *Molecular microbiology* 34(4):756-766.
- Chen F, Xia Q & Ju LK (2003) Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology* 69(11):6715-6722.
- Chen Y, Wang F, Xu J, Mehmood MA & Xiao X (2011) Physiological and evolutionary studies of NAP systems in *Shewanella piezotolerans* WP3. *The ISME journal* 5(5):843-855.
- Cheng SY & Chen JC (2002) Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicology* 61(3-4):181-193.
- Chew CF & Zhang TC (1998) In-situ remediation of nitrate-contaminated ground water by electrokinetics iron wall processes. *Water Science and Technology* 38(7):135-142.
- Chistoserdova L (2011) Modularity of methylotrophy, revisited. *Environmental Microbiology* 13(10):2603-2622.
- Chistoserdova L, Kalyuzhnaya MG & Lidstrom ME (2009) The expanding world of methylotrophic metabolism. *Annual Review of Microbiology* 63:477-499.
- Chistoserdova L, Vorholt JA & Lidstrom ME (2005) A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea. *Genome Biology* 6(2):208.
- Chistoserdova L, Vorholt JA, Thauer RK & Lidstrom ME (1998) C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea. *Science* 281(5373):99-102.
- Cinar A, Parulekar SJ, Undey C & Birol G (2003) *Batch fermentation: modeling, monitoring, and control*. CRC Press,
- Clegg SJ, Jia W & Cole JA (2006) Role of the *Escherichia coli* nitrate transport protein, NarU, in survival during severe nutrient starvation and slow growth. *Microbiology* 152(7):2091-2100.
- Cole JA (1978) The rapid accumulation of large quantities of ammonia during nitrite reduction by *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* 4(6):327-329.
- Cole JA (1982) Independent pathways for the anaerobic reduction of nitrite to ammonia by *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions* 10(6):476-478.
- Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GCL & Parsek MR (2011) The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos Pathogens* 7(1).
- Conrad J (1990) *Nitrate pollution and politics*. Aldershot, Avebury
- Conrad R (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological reviews* 60(4):609-640.
- Corker H & Poole RK (2003) Nitric oxide formation by *Escherichia coli* - Dependence on nitrite reductase, the NO-sensing regulator FNR, and flavohemoglobin Hmp. *Journal of Biological Chemistry* 278(34):31584-31592.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR & Lappin-scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49:711-745.
- Coyle CL, Zumft WG, Kroneck PM, Körner H & Jakob W (1985) Nitrous oxide reductase from denitrifying. *European Journal of Biochemistry* 153(3):459-467.
- Cramm R, Pohlmann A & Friedrich B (1999) Purification and characterization of the single-component nitric oxide reductase from *Ralstonia eutropha* H16. *FEBS letters* 460(1):6-10.

- Cuypers H, Viebrock-Sambale A & Zumft WG (1992) NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of bacteriology* 174(16):5332-5339.
- Daiber A, Shoun H & Ullrich V (2005) Nitric oxide reductase (P450 nor) from *Fusarium oxysporum*. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(1):185-193.
- Dalton H (1977) Ammonia oxidation by the methane oxidising bacterium *Methylococcus capsulatus* strain Bath. *Archives of microbiology* 114(3):273-279.
- Davidson EA (1993) Soil water content and the ratio of nitrous oxide to nitric oxide emitted from soil. *Biogeochemistry of Global Change*, Springer. p 369-386.
- Davidson VL (2004) Electron transfer in quinoproteins. *Archives of biochemistry and biophysics* 428(1):32-40.
- De Beer D & Stoodley P (2006) Microbial biofilms. *The Prokaryotes*, Vol 1. p 904-937.
- De Graaff F (1964) Maintenance problems in large public aquaria. *Archives Néerlandaises de Zoologie* 16:142-143.
- de Zwart JM, Nelisse PN & Kuenen JG (1996) Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov.: an obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiology Ecology* 20(4):261-270.
- Delanghe B, Nakamura F, Myoga H & Magara Y (1994) Biological denitrification with ethanol in a membrane bioreactor. *Environmental Technology* 15(1):61-70.
- Deziel E, Lepine F, Milot S, He JX, Mindrinos MN, Tompkins RG & Rahme LG (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(5):1339-1344.
- Doronina NV, Darmaeva TD & Trotsenko YA (2003) *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(1):223-229.
- Doronina NV, Ezhov VA, Beschastnyi AP & Trotsenko YA (2010) Biosynthesis of the bioprotectant ectoin by aerobic methylotrophic bacteria from methanol. *Applied Biochemistry and Microbiology* 46(2):173-176.
- Doronina NV, Lee TD, Ivanova E & Trotsenko YA (2005) *Methylophaga murata* sp. nov.: a haloalkaliphilic aerobic methylotroph from deteriorating marble. *Microbiology* 74(4):440-447.
- Dwivedi UN, Mishra S, Singh P & Tripathi RD (2007) Nitrate pollution and its remediation. *Environmental Bioremediation Technologies*, Media SSB (Édit.). p 363-377.
- Einsle O (2011) Structure and function of formate-dependent cytochrome c nitrite reductase, NrfA. *Methods in Enzymology* 496:399-422.
- Einsle O & Kroneck PM (2004) Structural basis of denitrification. *Biological chemistry* 385(10):875-883.
- Einsle O, Stach P, Messerschmidt A, Simon J, Kröger A, Huber R & Kroneck PM (2000) Cytochrome c nitrite reductase from *wolinella succinogenes* structure at 1.6 Å resolution, inhibitors binding, and heme-packing motifs. *Journal of Biological Chemistry* 275(50):39608-39616.
- Ellis MJ, Grossmann JG, Eady RR & Hasnain SS (2007) Genomic analysis reveals widespread occurrence of new classes of copper nitrite reductases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12(8):1119-1127.
- EPA (1986) *Quality criteria for water*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards,

- EPA (1998) Permeable reactive barrier technologies for contaminant remediation.
- Ergas SJ & Rheinheimer DE (2004) Drinking water denitrification using a membrane bioreactor. *Water Research* 38(14-15):3225-3232.
- Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J & De Beer D (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464(7288):543-548.
- Ettwig KF, Shima S, De Pas-Schoonen V, Katinka T, Kahnt J, Medema MH, Op Den Camp HJ, Jetten MS & Strous M (2008) Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environmental Microbiology* 10(11):3164-3173.
- Evans LV (2003) *Biofilms: recent advances in their study and control*. CRC press,
- Fahrner S (2002) Groundwater nitrate removal using a bioremediation trench. *Honours, University of Western Australia*.
- Fauman EB, Yuvaniyama C, Schubert HL, Stuckey JA & Saper MA (1996) The X-ray crystal structures of *Yersinia* tyrosine phosphatase with bound tungstate and nitrate mechanistic implications. *Journal of Biological Chemistry* 271(31):18780-18788.
- Fedorova R, Milekhina E & Il'iukhina N (1973) Possibilities of the method of " gas exchange" for detecting extraterrestrial life--identification of nitrogen-fixing microorganisms. *Izvestiia Akademii nauk SSSR. Serii biologicheskaja* 6:797.
- Ferguson SJ (1994) Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek* 66(1-3):89-110.
- Ferguson SJ (1998) Nitrogen cycle enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology* 2(2):182-193.
- Flock U, Reimann J & Adelroth P (2006) Proton transfer in bacterial nitric oxide reductase. *Biochemical Society Transactions* 34(1):188-190.
- Flores E, Frías JE, Rubio LM & Herrero A (2005) Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research* 83(2):117-133.
- Fukuda M, Takeda H, Kato HE, Doki S, Ito K, Maturana AD, Ishitani R & Nureki O (2015) Structural basis for dynamic mechanism of nitrate/nitrite antiport by NarK. *Nature communications* 6.
- Fülöp V, Moir JW, Ferguson SJ & Hajdu J (1995) The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd1. *Cell* 81(3):369-377.
- Furchgott RF (1999) Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide (nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 38(13-14):1870-1880.
- Garber E & Hollocher TC (1982) Positional isotopic equivalence of nitrogen in N₂O produced by the denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri*. Indirect evidence for a nitroxyl pathway. *Journal of Biological Chemistry* 257(9):4705-4708.
- George GN, Hilton J, Temple C, Prince RC & Rajagopalan K (1999) Structure of the molybdenum site of dimethyl sulfoxide reductase. *Journal of the American Chemical Society* 121(6):1256-1266.
- Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR & Greenberg BM (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* 176(1):20-30.
- Gilberthorpe NJ & Poole RK (2008) Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium* - Roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 283(17):11146-11154.
- Gleick PH (1993) *Water in crisis: a guide to the world's fresh water resources*. Oxford University Press, New York, 1

- Glockner AB, Jüngst A & Zumft WG (1993) Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd 1-free background (NirS⁻) of *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of microbiology* 160(1):18-26.
- Goddard AD, Moir JWB, Richardson DJ & Ferguson SJ (2008) Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Molecular microbiology* 70(3):667-681.
- Godia F & Sola C (1995) Fluidized-bed bioreactors. *Biotechnology Progress* 11(5):479-497.
- Gonzalez PJ, Correia C, Moura I, Brondino CD & Moura JJ (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100(5-6):1015-1023.
- Goreau TJ, Kaplan WA, Wofsy SC, McElroy MB, Valois FW & Watson SW (1980) Production of NO₂⁻ and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* 40(3):526-532.
- Gothel SF & Marahiel MA (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55(3):423-436.
- Greenlee LF, Lawler DF, Freeman BD, Marrot B & Moulin P (2009) Reverse osmosis desalination: water sources, technology, and today's challenges. *Water Research* 43(9):2317-2348.
- Grossmann JG, Abraham ZH, Adman ET, Neu M, Eady RR, Smith BE & Hasnain SS (1993) X-ray scattering using synchrotron radiation shows nitrite reductase from *Achromobacter xylosoxidans* to be a trimer in solution. *Biochemistry* 32(29):7360-7366.
- Guest JR, Green J, Irvine AS & Spiro S (1996) The FNR modulon and FNR-regulated gene expression. *Regulation of gene expression in Escherichia coli*, Springer. p 317-342.
- Guidelines C- (2014) *Guidelines for canadian drinking water quality: guideline technical document*.
- Gunsalus RP & Park SJ (1994) Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli* - Control by the Arcab and Fnr regulons. *Research in Microbiology* 145(5-6):437-450.
- Hakemian AS & Rosenzweig AC (2007) The biochemistry of methane oxidation. *Annual Review Biochemistry* 76:223-241.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW & Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2(2):95-108.
- Hamlin HJ, Michaelis JT, Beaulaton CM, Graham WF, Dutt W, Steinbach P, Losordo TM, Schrader KK & Main KL (2008) Comparing denitrification rates and carbon sources in commercial scale upflow denitrification biological filters in aquaculture. *Aquacultural Engineering* 38(2):79-92.
- Harte J, C. H, Schneider B & Shirley C (1991) *Toxics A to Z: a guide to everyday pollution hazards*. University of California Press, Berkeley
- Hartsock A & Shapleigh JP (2011) Physiological roles for two periplasmic nitrate reductases in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4. 3 (ATCC 17025). *Journal of bacteriology* 193(23):6483-6489.
- Hayatsu M, Tago K & Saito M (2008) Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* 54(1):33-45.
- Hazes B, Magnus KA, Kalk KH, Bonaventura C & Hol WG (1996) Nitrate binding to Limulus polyphemus subunit type II hemocyanin and its functional implications. *Journal of molecular biology* 262(4):532-542.
- Healey F (1980) Slope of the Monod equation as an indicator of advantage in nutrient competition. *Microbial Ecology* 5(4):281-286.

- Heiss B, Frunzke K & Zumft WG (1989) Formation of the NN bond from nitric oxide by a membrane-bound cytochrome bc complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of bacteriology* 171(6):3288-3297.
- Hendrich MP, Petasis D, Arciero DM & Hooper AB (2001) Correlations of structure and electronic properties from EPR spectroscopy of hydroxylamine oxidoreductase. *Journal of the American Chemical Society* 123(13):2997-3005.
- Hendriks JH, Jasaitis A, Saraste M & Verkhovsky MI (2002) Proton and electron pathways in the bacterial nitric oxide reductase. *Biochemistry* 41(7):2331-2340.
- Heurlier K, Thomson MJ, Aziz N & Moir JW (2008) The nitric oxide (NO)-sensing repressor NsrR of *Neisseria meningitidis* has a compact regulon of genes involved in NO synthesis and detoxification. *Journal of bacteriology* 190(7):2488-2495.
- Hirsch P (1989) Genus *Hyphomicrobium*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins Baltimore-London, Vol 3. p 1895-1904.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ & Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212(1):77-86.
- Hoglen J & Hollocher T (1989) Purification and some characteristics of nitric oxide reductase-containing vesicles from *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Biological Chemistry* 264(13):7556-7563.
- Hommes NG, Sayavedra-Soto LA & Arp DJ (1996) Mutagenesis of hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea* by transformation and recombination. *Journal of bacteriology* 178(13):3710-3714.
- Horio T, Higashi T, Yamanaka T, Matsubara H & Okunuki K (1961) Purification and properties of cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* 236(3):944-951.
- Hou S, Makarova KS, Saw J, Senin P, Ly BV, Zhou Z, Ren Y, Wang J, Galperin MY & Omelchenko MV (2008) Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylophilum inferorum*, a representative of the bacterial phylum *Verrucomicrobia*. *Biology Direct* 3(11).
- Householder TC, Fozo EM, Cardinale JA & Clark VL (2000) Gonococcal nitric oxide reductase is encoded by a single gene, *norB*, which is required for anaerobic growth and is induced by nitric oxide. *Infection and immunity* 68(9):5241-5246.
- Howarth RW (1988) Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19:89-110.
- Howes BD, Abraham ZH, Lowe DJ, Bruser T, Eady RR & Smith BE (1994) EPR and electron nuclear double resonance (ENDOR) studies show nitrite binding to the type 2 copper centers of the dissimilatory nitrite reductase of *Alcaligenes xylosoxidans* (NCIMB 11015). *Biochemistry* 33(11):3171-3177.
- Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL & Lipson DA (2007) *Manual of environmental microbiology*. American Society for Microbiology Press,
- Hussain H, Grove J, Griffiths L, Busby S & Cole JA (1994) A seven-gene operon essential for formate-dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Molecular microbiology* 12:153-153.
- Hyman MR & Arp DJ (1995) Effects of ammonia on the *de novo* synthesis of polypeptides in cells of *Nitrosomonas europaea* denied ammonia as an energy source. *Journal of bacteriology* 177(17):4974-4979.

- Hyman MR & Daniel A (1988) Acetylene inhibition of metalloenzymes. *Analytical biochemistry* 173(2):207-220.
- Ikuma K, Decho AW & Lau BL (2013) The extracellular bastions of bacteria-A biofilm way of life. *Nature Education Knowledge* 4(2):2-19.10.
- Jain R & Kazmierczak BI (2014) A conservative amino acid mutation in the master regulator FleQ renders *Pseudomonas aeruginosa* aflagellate. *PLoS One* 9(5).
- James G, Beaudette L & Costerton J (1995) Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 15(4):257-262.
- Janvier M, Frehel C, Grimont F & Gasser F (1985) *Methylophaga marina* gen-nov, sp-nov and *Methylophaga thalassica* sp-nov, marine methylotrophs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35(2):131-139.
- Jebbar M, Talibart R, Gloux K, Bernard T & Blanco C (1992) Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *Journal of bacteriology* 174(15):5027-5035.
- Jensen FB (1996) Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacus astacus*). *Aquatic Toxicology* 34(2):95-104.
- Jepson BJ, Mohan S, Clarke TA, Gates AJ, Cole JA, Butler CS, Butt JN, Hemmings AM & Richardson DJ (2007) Spectropotentiometric and structural analysis of the periplasmic nitrate reductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 282(9):6425-6437.
- Ji XB & Hollocher TC (1988) Reduction of nitrite to nitric-oxide by enteric bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157(1):106-108.
- Jia W & Cole JA (2005) Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions* 33:159-161.
- Joannou CL, Cui X-Y, Rogers N, Vielotte N, Martinez CLT, Vugman NV, Hughes MN & Cammack R (1998) Characterization of the bactericidal effects of sodium nitroprusside and other pentacyanonitrosyl complexes on the food spoilage bacterium *Clostridium sporogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9):3195-3201.
- John P (1977) Aerobic and anaerobic bacterial respiration monitored by electrodes. *Journal of general microbiology* 98(1):231-238.
- Joo H-S, Hirai M & Shoda M (2005) Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(2):184-191.
- Jordan PA, Thomson AJ, Ralph ET, Guest JR & Green J (1997) FNR is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve. *FEBS letters* 416(3):349-352.
- Kalyuzhnaya MG, Martens-Habbena W, Wang T, Hackett M, Stolyar SM, Stahl DA, Lidstrom ME & Chistoserdova L (2009) Methylophilaceae link methanol oxidation to denitrification in freshwater lake sediment as suggested by stable isotope probing and pure culture analysis. *Environmental microbiology reports* 1(5):385-392.
- Kalyuzhnaya MG, Hristova KR, Lidstrom ME & Chistoserdova L (2008) Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. *Journal of bacteriology* 190(11):3817-3823.
- Kane SR, Chakicherla AY, Chain PS, Schmidt R, Shin MW, Legler TC, Scow KM, Larimer FW, Lucas SM & Richardson PM (2007) Whole-genome analysis of the methyl tert-butyl ether-degrading beta-proteobacterium *Methylibium petroleiphilum* PM1. *Journal of bacteriology* 189(5):1931-1945.

- Kern M & Simon J (2009) Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1787(6):646-656.
- Kesore K, Janowski F & Shaposhnik V (1997) Highly effective electro dialysis for selective elimination of nitrates from drinking water. *Journal of membrane science* 127(1):17-24.
- Killham K (1986) Heterotrophic nitrification.
- Kim HG, Doronina NV, Trotsenko YA & Kim SW (2007) *Methylophaga aminisulfivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylotrophic marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(9):2096-2101.
- Klotz MG & Norton JM (1998) Multiple copies of ammonia monooxygenase (amo) operons have evolved under biased AT/GC mutational pressure in ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. *FEMS microbiology letters* 168(2):303-311.
- Klotz MG & Stein LY (2008) Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS microbiology letters* 278(2):146-156.
- Knittel K & Boetius A (2009) Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology* 63:311-334.
- Knowles R & Topp E (1988) Some factors affecting nitrification and the production of nitrous oxide by the methanotrophic bacterium *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Current Perspectives in Environmental Biogeochemistry*:383-393.
- Koike I & Hattori A (1975) Energy yield of denitrification: an estimate from growth yield in continuous cultures of *Pseudomonas denitrificans* under nitrate-, nitrite- and nitrous oxide-limited conditions. *Microbiology* 88(1):11-19.
- Kraft B, Strous M & Tegetmeyer HE (2011) Microbial nitrate respiration - Genes, enzymes and environmental distribution. *Journal of Biotechnology* 155(1):104-117.
- Krämer M, Baumgärtner M, Bender M & Conrad R (1990) Consumption of NO by methanotrophic bacteria in pure culture and in soil. *FEMS microbiology letters* 73(4):345-350.
- Kruithof JC & Koppers HMM (1989) Experiences with ground water treatment and disposal of the eliminated substances in the Netherlands. *Aqua* 38(3):207-216.
- Kuenen JG & Robertson LA (1994) Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiology Reviews* 15(2):109-117.
- Kumita H, Matsuura K, Hino T, Takahashi S, Hori H, Fukumori Y, Morishima I & Shiro Y (2004) NO reduction by nitric-oxide reductase from denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* characterization of reaction intermediates that appear in the single turnover cycle. *Journal of Biological Chemistry* 279(53):55247-55254.
- Kuznetsova S, Knaff DB, Hirasawa M, Lagoutte B & Sétif P (2004) Mechanism of spinach chloroplast ferredoxin-dependent nitrite reductase: spectroscopic evidence for intermediate states. *Biochemistry* 43(2):510-517.
- Labbé N, Juteau P, Parent S & Villemur R (2003a) Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal biodome, Canada. *Microbial Ecology* 46(1):12-21.
- Labbé N, Laurin V, Juteau P, Parent S & Villemur R (2007) Microbiological community structure of the biofilm of a methanol-fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms. *Microbial Ecology* 53(4):621-630.
- Labbé N, Parent S & Villemur R (2003b) Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. *Water Research* 37(4):914-920.
- Laurin V, Labbé N, Parent S, Juteau P & Villemur R (2008) Microeukaryote diversity in a marine methanol-fed fluidized denitrification system. *Microbial Ecology* 56(4):637-648.

- Law CJ, Maloney PC & Wang D-N (2008) Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annual Review of Microbiology* 62:289.
- Lee JH (2013) An overview of phytoremediation as a potentially promising technology for environmental pollution control. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 18(3):431-439.
- Lemmer H, Zaglauer A, Neef A, Meier H & Amann R (1997) Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 2: Composition and ecology of the bacterial community in the biofilms. *Water Research* 31(8):1903-1908.
- Li J, Kustu S & Stewart V (1994) In-vitro interaction of nitrate-responsive regulatory protein NarI with DNA target sequences in the Fdng, Narg, Nark and Frda operon control regions of *Escherichia coli* K-12. *Journal of molecular biology* 241(2):150-165.
- Lin JT, Goldman B & Stewart V (1993) Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Journal of bacteriology* 175(8):2370-2378.
- Lin JT, Goldman BS & Stewart V (1994) The *nasFEDCBA* operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Journal of bacteriology* 176(9):2551-2559.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25(4):402-408.
- Luckmann M, Mania D, Kern M, Bakken LR, Frostegard A & Simon J (2014) Production and consumption of nitrous oxide in nitrate-ammonifying *Wolinella succinogenes* cells. *Microbiology* 160:1749-1759.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J & Brock TD (1997) *Biology of microorganisms*. prentice hall Upper Saddle River, NJ,
- Mahvi AH, Babaei AA & Nabizadeh R (2005) Agricultural activities impact on groundwater nitrate pollution. *International Journal of Environmental Science & Technology* 2(1):41 - 47.
- Maia LB & Moura JJ (2015) Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 20(2):403-433.
- Maier RM, Pepper IL & Gerba CP (2009) *Environmental microbiology*. Academic press,
- Maillard E, Payraudeau S, Faivre E, Gregoire C, Gangloff S & Imfeld G (2011) Removal of pesticide mixtures in a stormwater wetland collecting runoff from a vineyard catchment. *Science of the Total Environment* 409(11):2317-2324.
- Malkin R & Malmström BG (1970) The state and function of copper in biological systems. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Volume 33*:177-244.
- Maloy S & Stewart V (1993) Autogenous regulation of gene-expression. *Journal of bacteriology* 175(2):307-316.
- Mancinelli RL & McKay CP (1983) Effects of nitric-oxide and nitrogen-dioxide on bacterial-growth. *Applied and Environmental Microbiology* 46(1):198-202.
- Mandernack KW, Kinney CA, Coleman D, Huang YS, Freeman KH & Bogner J (2000) The biogeochemical controls of N₂O production and emission in landfill cover soils: the role of methanotrophs in the nitrogen cycle. *Environmental Microbiology* 2(3):298-309.
- Martineau C, Mauffrey F & Villemur R (2015) Comparative analysis of denitrifying activities of *Hyphomicrobium nitrativorans*, *Hyphomicrobium denitrificans*, and *Hyphomicrobium zavarzinii*. *Applied and Environmental Microbiology* 81(15):5003-5014.
- Martineau C, Villeneuve C, Mauffrey F & Villemur R (2013a) 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 Announcement* 2(1).

- Martineau C, Villeneuve C, Mauffrey F & Villemur R (2013b) *Hyphomicrobium nitratorans* sp nov., isolated from the biofilm of a methanol-fed denitrification system treating seawater at the Montreal Biodome. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:3777-3781.
- Masuko M, Iwasaki H, Sakurai T, Suzuki S & Nakahara A (1984) Characterization of nitrite reductase from a denitrifier, *Alcaligenes* sp. NCIB 11015. A novel copper protein. *Journal of biochemistry* 96(2):447-454.
- Mařchová I & Kuřera I (1991) Evidence for the role of soluble cytochrome c in the dissimilatory reduction of nitrite and nitrous oxide by cells of *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1058(2):256-260.
- Matsumoto Y, Toshi T, Pislakov AV, Hino T, Sugimoto H, Nagano S, Sugita Y & Shiro Y (2012) Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Nature Structural & Molecular Biology* 19(2):238-245.
- Mauffrey F, Martineau C & Villemur R (2015) Importance of the two dissimilatory (Nar) nitrate reductases in the growth and nitrate reduction of the methylotrophic marine bacterium *Methylophaga nitratreducens* JAM1. *Frontiers in microbiology* 6.
- Mazoch J & Kuřera I (2002) Control of gene expression by FNR-like proteins in facultatively anaerobic bacteria. *Folia microbiologica* 47(2):95-103.
- McCarty G (1999) Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* 29(1):1-9.
- McTavish H, Fuchs J & Hooper A (1993) Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of bacteriology* 175(8):2436-2444.
- Moews PC & Audrieth L (1959) The autoxidation of hydroxylamine. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* 11(3):242-246.
- Moir JWB & Wood NJ (2001) Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(2):215-224.
- Moura I, Bursakov S, Costa C & Moura JJ (1997) Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe* 3(5):279-290.
- Mulder A, Van de Graaf AA, Robertson L & Kuenen J (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16(3):177-183.
- Munch R, Hiller K, Grote A, Scheer M, Klein J, Schobert M & Jahn D (2005) Virtual footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* 21(22):4187-4189.
- Murrell JC & Holmes AJ (1996) Molecular biology of particulate methane monooxygenase. *Microbial Growth on C1 Compounds*, Springer. p 133-140.
- Nadell CD, Xavier JB, Levin SA & Foster KR (2008) The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol* 6(1):14.
- Neef A, Zaglauer A, Meier H, Amann R, Lemmer H & Schleifer K-H (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 62(12):4329-4339.
- Ni S-Q & Zhang J (2013) Anaerobic ammonium oxidation: from laboratory to full-scale application. *BioMed research international* 2013.
- Omata T, Andriessse X & Hirano A (1993) Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Molecular and General Genetics MGG* 236(2-3):193-202.

- Page L, Griffiths L & Cole JA (1990) Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Archives of microbiology* 154(4):349-354.
- Pal RR, Khardenavis AA & Purohit HJ (2015) Identification and monitoring of nitrification and denitrification genes in *Klebsiella pneumoniae* EGD-HP19-C for its ability to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Functional & integrative genomics* 15(1):63-76.
- Palmedo G, Seither P, Körner H, Matthews JC, Burkhalter RS, Timkovich R & Zumft WG (1995) Resolution of the nirD Locus for Heme d1, Synthesis of Cytochrome cd1, (Respiratory Nitrite Reductase) from *Pseudomonas Stutzeri*. *European Journal of Biochemistry* 232(3):737-746.
- Palmer K, Drake HL & Horn MA (2009) Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers. *Applied and Environmental Microbiology* 75(15):5170-5174.
- Parent S & Morin A (2000) N budget as water quality management tool in closed aquatic mesocosms. *Water Research* 34(6):1846-1856.
- Pauleta SR, Dell'Acqua S & Moura I (2013) Nitrous oxide reductase. *Coordination Chemistry Reviews* 257(2):332-349.
- Peyraud R, Kiefer P, Christen P, Massou S, Portais J-C & Vorholt JA (2009) Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway by using ¹³C metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(12):4846-4851.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C & Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26(6):509-515.
- Philippot L & Hojberg O (1999) Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1446(1-2):1-23.
- Pitois S, Jackson MH & Wood BJB (2001) Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae: An overview. *Journal of Environmental Health* 64(5):25-32.
- Poole R (2005) Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochemical Society Transactions* 33(1):176-180.
- Poret-Peterson AT, Graham JE, Gullede J & Klotz MG (2008) Transcription of nitrification genes by the methane-oxidizing bacterium, *Methylococcus capsulatus* strain Bath. *The ISME journal* 2(12):1213-1220.
- Postgate J (1998) *Nitrogen fixation*. Cambridge University Press, 3e
- Potter LC, Angove H, Richardson D & Cole JA (2001) Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria. *Advances in microbial physiology* 45:51-112.
- Potter LC & Cole JA (1999a) Essential roles for the products of the *napABCD* genes, but not *napFGH*, in periplasmic nitrate reduction by *Escherichia coli* K-12. *Biochemical Journal* 344:69-76.
- Potter LC, Millington P, Griffiths L, Thomas GH & Cole JA (1999b) Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth? *Biochemical Journal* 344:77-84.
- Prosser J (1986) Nitrification, Vols. 20. *Washington, DC: IRL*.
- Rabin RS, Collins LA & Stewart V (1992) In vivo requirement of integration host factor for *nar* (nitrate reductase) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(18):8701-8705.

- Rabin RS & Stewart V (1993) Dual response regulators (NarI and NarJ) interact with dual sensors (NarX and NarY) to control nitrate-regulated and nitrite-regulated gene-expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 175(11):3259-3268.
- Raghoebaring AA, Pol A, Van de Pas-Schoonen KT, Smolders AJ, Ettwig KF, Rijpstra WIC, Schouten S, Damsté JSS, den Camp HJO & Jetten MS (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440(7086):918-921.
- Ramos HC, Boursier L, Moszer I, Kunst F, Danchin A & Glaser P (1995) Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and-independent regulatory mechanisms. *The EMBO journal* 14(23):5984.
- Raskin I, Smith RD & Salt DE (1997) Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8(2):221-226.
- Reddy KJ & Lin JP (2000) Nitrate removal from groundwater using catalytic reduction. *Water Research* 34(3):995-1001.
- Reichl F-X (2010) *Guide pratique de la toxicologie. 2e*
- Richardson D, Berks B, Russell D, Spiro S & Taylor C (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58(2):165-178.
- Riester J, Zumft WG & Kroneck PM (1989) Nitrous oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. *European Journal of Biochemistry* 178(3):751-762.
- Robertson WD & Cherry JA (1995) In-situ denitrification of septic-system nitrate using reactive porous-media barriers - field trials. *Ground Water* 33(1):99-111.
- Rogalla F, de Larminat G, Coutelle J & Godart H (1991) Experience with nitrate-removal methods from drinking water. *Nitrate Contamination*, (NATO ASI Series, Bogárdi I, Kuzelka R & Ennenga W (Édit.) Springer Berlin Heidelberg, Vol 30. p 369-383.
- Roldán MD, Sears HJ, Cheesman MR, Ferguson SJ, Thomson AJ, Berks BC & Richardson DJ (1998) Spectroscopic characterization of a novel multiheme-c-type cytochrome widely implicated in bacterial electron transport. *Journal of Biological Chemistry* 273(44):28785-28790.
- Rothery RA, Blasco F, Magalon A, Asso M & Weiner JH (1999) The hemes of *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI): potentiometric effects of inhibitor binding to NarI. *Biochemistry* 38(39):12747-12757.
- Rowe JJ, Ubbink-Kok T, Molenaar D, Konings WN & Driessen AJ (1994) Nark is a nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 12(4):579-586.
- Rowley G, Hensen D, Felgate H, Arkenberg A, Appia-Ayme C, Prior K, Harrington C, Field SJ, Butt JN, Baggs E & Richardson DJ (2012) Resolving the contributions of the membrane-bound and periplasmic nitrate reductase systems to nitric oxide and nitrous oxide production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochemical Journal* 441:755-762.
- Rusten B, Hem LJ & Ødegaard H (1995) Nitrogen removal from dilute wastewater in cold climate using moving-bed biofilm reactors. *Water Environment Research* 67(1):65-74.
- Sambrook J, MacCallum P & Russell D (2001) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 3rd
- Sandstedt CA (1990) *Nitrates: sources and their effects upon humans and livestock*. American University,
- Sawers R (1991) Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 5(6):1469-1481.

- Sayavedra-Soto LA, Hommes NG, Alzerreca JJ, Arp DJ, Norton JM & Klotz MG (1998) Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira* sp. NpAV. *FEMS microbiology letters* 167(1):81-88.
- Sayavedra-Soto LA, Hommes NG, Russell SA & Arp DJ (1996) Induction of ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase mRNAs by ammonium in *Nitrosomonas europaea*. *Molecular microbiology* 20(3):541-548.
- Schink B (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(2):262-280.
- Schipper LA & McGill A (2008) Nitrogen transformation in a denitrification layer irrigated with dairy factory effluent. *Water Research* 42(10-11):2457-2464.
- Schipper LA, Robertson WD, Gold AJ, Jaynes DB & Cameron SC (2010) Denitrifying bioreactors- An approach for reducing nitrate loads to receiving waters. *Ecological Engineering* 36(11):1532-1543.
- Schmidt I, van Spanning RJM & Jetten MSM (2004) Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK- and NorB-deficient mutants. *Microbiology* 150:4107-4114.
- Schnoor JL, Licht LA, Mccutcheon SC, Wolfe NL & Carreira LH (1995) Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology* 29(7):A318-A323.
- Schoeman J & Steyn A (2003) Nitrate removal with reverse osmosis in a rural area in South Africa. *Desalination* 155(1):15-26.
- Schreiber K, Krieger R, Benkert B, Eschbach M, Arai H, Schobert M & Jahn D (2007) The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *Journal of bacteriology* 189(11):4310-4314.
- Scott G & Crunkilton RL (2000) Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia*, and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(12):2918-2922.
- Sears HJ, Ferguson SJ, Richardson DJ & Spiro S (1993) The identification of a periplasmic nitrate reductase in *Paracoccus denitrificans*. *FEMS microbiology letters* 113(1):107-111.
- Sears HJ, Little PJ, Richardson DJ, Berks BC, Spiro S & Ferguson SJ (1997) Identification of an assimilatory nitrate reductase in mutants of *Paracoccus denitrificans* GB17 deficient in nitrate respiration. *Archives of microbiology* 167(1):61-66.
- Self WT, Grunden AM, Hasona A & Shanmugam K (1999) Transcriptional regulation of molybdoenzyme synthesis in *Escherichia coli* in response to molybdenum: ModE-molybdate, a repressor of the *modABCD* (molybdate transport) operon is a secondary transcriptional activator for the *hyc* and *nar* operons. *Microbiology* 145(1):41-55.
- Silaghi-Dumitrescu R, Ng KY, Viswanathan R & Kurtz DM (2005) A flavo-diiron protein from *Desulfovibrio vulgaris* with oxidase and nitric oxide reductase activities. Evidence for an in vivo nitric oxide scavenging function. *Biochemistry* 44(9):3572-3579.
- Silver N, Best S, Jiang J & Thein SL (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *Bmc Molecular Biology* 7.
- Silvestrini MC, Cutruzzola F, D'Alessandro R, Brunori M, Fochesato N & Zennaro E (1992) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase in *Pseudomonas putida* and characterization of the recombinant protein. *Biochemical Journal* 285:661-666.
- Silvestrini MC, Tordi MG, Colosimo A, Antonini E & Brunori M (1982) The kinetics of electron transfer between *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome c-551 and its oxidase. *Biochemical Journal* 203:445-451.

- Smith D, Alvey S & Crowley D (2005) Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology* 53(2):265-273.
- Smith KA (2010) *Nitrous Oxide and Climate Change*, Smith KA (Édit.) London: Earthscan, UK. p 1-4.
- Smith RL, Ceazan ML & Brooks MH (1994) Autotrophic, hydrogen-oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination. *Applied and Environmental Microbiology* 60(6):1949-1955.
- Smith VH (1998) Cultural eutrophication of inland, estuarine, and coastal waters. *Successes, Limitations, and Frontiers in Ecosystem Science*:7-49.
- Smith VH, Tilman GD & Nekola JC (1999) Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100(1-3):179-196.
- Snider DM, Schiff SL & Spoelstra J (2009) $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ stable isotope ratios of nitrous oxide produced during denitrification in temperate forest soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73(4):877-888.
- Sohaskey CD & Wayne LG (2003) Role of *narK2X* and *narGHJ* in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology* 185(24):7247-7256.
- Söhngen N (1906) Über bakterien, welche methan als kohlenstoffnahrung und energiequelle gebrauchen. *Zentralbl Bakteriol Parasitenk Infektionskr* 15:513-517.
- Spalding RF & Exner ME (1993) Occurrence of Nitrate in Groundwater - a Review. *Journal of Environmental Quality* 22(3):392-402.
- Sparacino-Watkins C, Stolz JF & Basu P (2014) Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chemical Society Reviews* 43(2):676-706.
- Spiro S (2011) Nitric oxide metabolism: physiology and regulatory mechanisms. *Nitrogen Cycling in Bacteria (Moir, J., ed.):*177-197.
- Spiro S (2012) Nitrous oxide production and consumption: regulation of gene expression by gas-sensitive transcription factors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 367(1593):1213-1225.
- Spott O & Stange CF (2011) Formation of hybrid N_2O in a suspended soil due to co-denitrification of NH_2OH . *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174(4):554-567.
- Spotte S (1979) *Fish and invertebrate culture: water management in closed system*. Wiley, 2
- Stach P, Einsle O, Schumacher W, Kurun E & Kroneck PM (2000) Bacterial cytochrome c nitrite reductase: new structural and functional aspects. *J Inorg Biochem* 79(1):381-385.
- Stein LY (2011) Surveying N_2O -Producing pathways in bacteria. *Methods in Enzymology: Research on Nitrification and Related Processes, Vol 486, Part A* 486:131-152.
- Stein LY & Yung YL (2003) Production, isotopic composition, and atmospheric fate of biologically produced nitrous oxide. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 31:329-356.
- Steinheimer TR, Scoggin KD & Kramer LA (1998) Agricultural chemical movement through a field size watershed in Iowa: Surface hydrology and nitrate losses in discharge. *Environmental Science & Technology* 32(8):1048-1052.
- Stern AM, Hay AJ, Liu Z, Desland FA, Zhang J, Zhong ZT & Zhu J (2012) The NorR Regulon is critical for *Vibrio cholerae* resistance to nitric oxide and sustained colonization of the intestines. *Mbio* 3(2).
- Stern AM, Liu BB, Bakken LR, Shapleigh JP & Zhu J (2013) A novel protein protects bacterial iron-dependent metabolism from nitric oxide. *Journal of bacteriology* 195(20):4702-4708.
- Stewart V (1993) Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene-expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 9(3):425-434.

- Stewart V, Parales J & Merkel S (1989) Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 171(4):2229-2234.
- Strebel O, Duynisveld WHM & Bottcher J (1989) Nitrate pollution of groundwater in Western-Europe. *Agriculture Ecosystems & Environment* 26(3-4):189-214.
- Stuven R, Vollmer M & Bock E (1992) The impact of organic-matter on nitric-oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of microbiology* 158(6):439-443.
- Su F, Takaya N & Shoun H (2004) Nitrous oxide-forming codenitrification catalyzed by cytochrome P450_{nor}. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68(2):473-475.
- Su JJ, Liu BY & Liu CY (2001) Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. *Journal of applied microbiology* 90(3):457-462.
- Suharti, Heering HA & de Vries S (2004) NO reductase from *Bacillus azotoformans* is a bifunctional enzyme accepting electrons from menaquinol and a specific endogenous membrane-bound cytochrome c 551. *Biochemistry* 43(42):13487-13495.
- Sutherland IW (2001) Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal* 11(9):663-674.
- Sutton MA, Howard CM, Erisman JW, Billen G, Bleeker A, Grennfelt P, van Grinsven H & Grizzetti B (2011) *The european nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives*. Cambridge University Press,
- Suzuki S, Kohzuma T, Yamaguchi K, Nakamura N, Shidara S, Kobayashi K & Tagawa S (1994) Pulse radiolysis studies on nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* IAM 1013: evidence for intramolecular electron transfer from type 1 Cu to type 2 Cu. *Journal of the American Chemical Society* 116(24):11145-11146.
- Tanimoto T, Hatano K, Kim DH, Uchiyama H & Shoun H (1992) Co-denitrification by the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *FEMS microbiology letters* 93(2):177-180.
- Tarazona S, Garcia-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A & Conesa A (2011) Differential expression in RNA-seq: A matter of depth. *Genome Research* 21(12):2213-2223.
- Tavares P, Pereira A, Moura J & Moura I (2006) Metalloenzymes of the denitrification pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100(12):2087-2100.
- Thauer RK & Shima S (2008) Methane as fuel for anaerobic microorganisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125(1):158-170.
- Thongdee M, Gallagher LA, Schell M, Dharakul T, Songsivilai S & Manoil C (2008) Targeted mutagenesis of *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia pseudomallei* through natural transformation of PCR fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 74(10):2985-2989.
- Tosques IE, Shi J & Shapleigh JP (1996) Cloning and characterization of *nnrR*, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4. 3. *Journal of bacteriology* 178(16):4958-4964.
- Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y & Nomura N (2016) Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 80(1):7-12.
- Trotsenko YA & Murrell JC (2008) Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. *Advances in applied microbiology* 63:183-230.
- Tyson K, Cole JA & Busby S (1994) Nitrite and nitrate regulation at the promoters of two *Escherichia coli* operons encoding nitrite reductase: identification of common target heptamers for both NarP- and NarL-dependent regulation. *Molecular microbiology* 13(6):1045-1055.

- Upadhyay AK, Hooper AB & Hendrich MP (2006) NO reductase activity of the tetraheme cytochrome c 554 of *Nitrosomonas europaea*. *Journal of the American Chemical Society* 128(13):4330-4337.
- Van Spanning RJM, Delgado MJ & Richardson DJ (2005) The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N₂ fixation. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*, 4), Werner D & Newton WE (Édit.) Springer Netherlands. p 277-342.
- Van Spanning RJM, Houben E, Reijnders WN, Spiro S, Westerhoff HV & Saunders N (1999) Nitric oxide is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of bacteriology* 181(13):4129-4132.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7).
- Villeneuve C, Martineau C, Mauffrey F & Villemur R (2012) Complete genome sequences of *Methylophaga* sp strain JAM1 and *Methylophaga* sp strain JAM7. *Journal of bacteriology* 194(15):4126-4127.
- Villeneuve C, Martineau C, Mauffrey F & Villemur R (2013) *Methylophaga nitratreducentescens* sp. nov. and *Methylophaga frappieri* sp. nov., isolated from the biofilm of the methanol-fed denitrification system treating the seawater at the Montreal Biodome. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:2216-2222.
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH & Tilman D (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications* 7(3):737-750.
- Vitousek PM & Howarth RW (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea - How can it occur. *Biogeochemistry* 13(2):87-115.
- von Liebig J (1855) *Principles of agricultural chemistry with special reference to the late researches made in England*. John Wiley, New York
- Vorholt JA (2002) Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Archives of microbiology* 178(4):239-249.
- Vuilleumier S, Chistoserdova L, Lee M-C, Bringel F, Lajus A, Zhou Y, Gourion B, Barbe V, Chang J & Cruveiller S (2009) Methylobacterium genome sequences: a reference blueprint to investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. *PLoS One* 4(5):e5584.
- Vymazal J (2002) The use of sub-surface constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic: 10 years experience. *Ecological Engineering* 18(5):633-646.
- Wakida FT & Lerner DN (2005) Non-agricultural sources of groundwater nitrate: a review and case study. *Water Research* 39(1):3-16.
- Walker JCG (1991) Biogeochemistry - an analysis of global change - Schlesinger, Wh. *Science* 253(5020):686-687.
- Wang W, Richardson AR, Martens-Habbena W, Stahl DA, Fang FC & Hansen EJ (2008) Identification of a repressor of a truncated denitrification pathway in *Moraxella catarrhalis*. *Journal of bacteriology* 190(23):7762-7772.
- Ward N, Larsen Ø, Sakwa J, Bruseth L, Khouri H, Durkin AS, Dimitrov G, Jiang L, Scanlan D & Kang KH (2004) Genomic insights into methanotrophy: the complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *PLoS biology* 2:1616-1628.
- Warnecke-Eberz U & Friedrich B (1993) Three nitrate reductase activities in *Alcaligenes eutrophus*. *Archives of microbiology* 159(5):405-409.

- Warnock JN, Bratch K & Al-Rubeai M (2005) Packed bed bioreactors. *Bioreactors for Tissue Engineering*, Chaudhuri J & Al-Rubeai M (Édit.) Springer Netherlands, 10.1007/1-4020-3741-4_4. p 87-113.
- Whittaker M, Bergmann D, Arciero D & Hooper AB (2000) Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1459(2):346-355.
- Williams JB (2002) Phytoremediation in wetland ecosystems: Progress, problems, and potential. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(6):607-635.
- Williams SB & Stewart V (1997) Nitrate- and nitrite-sensing protein NarX of *Escherichia coli* K-12: mutational analysis of the amino-terminal tail and first transmembrane segment. *Journal of bacteriology* 179(3):721-729.
- Wing HJ, Williams SM & Busby S (1995) Spacing requirements for transcription activation by *Escherichia coli* FNR protein. *Journal of bacteriology* 177(23):6704-6710.
- Wolfe AH & Patz JA (2002) Reactive nitrogen and human health: Acute and long-term implications. *Ambio* 31(2):120-125.
- Wood PM (1986) Nitrification as a bacterial energy source.
- Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML & Oenema O (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry* 33(12-13):1723-1732.
- Wu SQ, Chai W, Lin JT & Stewart V (1999) General nitrogen regulation of nitrate assimilation regulatory gene *nasR* expression in *Klebsiella oxytoca* M5a1. *Journal of bacteriology* 181(23):7274-7284.
- Wu SQ & Stewart V (1998) NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca* (pneumoniae) M5a1. *Journal of bacteriology* 180(5):1311-1322.
- Yan HC, Huang WY, Yan CY, Gong XQ, Jiang SR, Zhao Y, Wang JW & Shi YG (2013) Structure and Mechanism of a Nitrate Transporter. *Cell Reports* 3(3):716-723.
- Yasueda H, Kawahara Y & Sugimoto S-i (1999) *Bacillus subtilis yckG and yckF* encode two key enzymes of the ribulose monophosphate pathway used by methylotrophs, and *yckH* is required for their expression. *Journal of bacteriology* 181(23):7154-7160.
- Ye R, Haas D, Ka J, Krishnapillai V, Zimmermann A, Baird C & Tiedje J (1995) Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *Journal of bacteriology* 177(12):3606-3609.
- Yoshinari T (1980) N₂O Reduction by *Vibrio succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 39(1):81-84.
- Zehr JP (2011) Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends in microbiology* 19(4):162-173.
- Zhang X & DeMoss JA (1996) Structure modification induced in the *narG* promoter by binding of integration host factor and NARL-P. *Journal of bacteriology* 178(13):3971-3973.
- Zumft WG (1992) The denitrifying prokaryotes. *The Prokaryotes*, 1:554-582.
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(4):533-616.
- Zumft WG (2005) Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(1):194-215.
- Zumft WG, Braun C & Heinrich C (1994) Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. *European Journal of Biochemistry* 219(1-2):481-490.