

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Relation entre les deux souches bactériennes principales  
d'un biofilm dénitrifiant**

Par  
Jonathan Cloutier

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

**Jury d'évaluation**

Président du jury et examinateur  
interne

Éric Déziel  
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

France Daigle  
Université de Montréal

Directeur de recherche

Richard Villemur  
INRS-Institut Armand-Frappier

## Résumé

Lors d'études portant sur un biofilm provenant d'un bioprocédé de dénitrification, il a été déterminé qu'il y avait deux souches bactériennes qui étaient les plus abondantes en terme de proportion de la biomasse. Ces deux souches, NL23 et JAM1, ont éventuellement été désignées comme nouvelles espèces bactériennes *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 et *Methylophaga nitratireducens* JAM1. Tandis que la souche NL23 est en mesure d'effectuer toutes les étapes de dénitrification, la souche JAM1 est incapable de réduire le nitrite et donc ne peut pas réduire complètement le nitrate en azote gazeux. Plusieurs facteurs dans leur relation suggèrent une certaine coopération. Ce mémoire présente les travaux effectués afin d'en apprendre davantage sur l'interaction entre ces deux bactéries

Dans un premier temps, des conditions optimales de co-cultures entre les deux souches ont été développées. La caractérisation de la dynamique de consommation du nitrate et du nitrite a démontré que les co-cultures des souches NL23 et JAM1 n'étaient pas nécessairement plus rapides pour effectuer la dénitrification que la souche NL23 en culture pure. Par contre, des co-cultures de la souche NL23 avec un mutant de la souche JAM1 (inactif pour réduire le nitrate) ont démontré une dénitrification plus rapide que la souche NL23 en culture pure.

La recherche a aussi permis de démontrer que la souche JAM1 apporte une aide de croissance à la souche NL23 en conditions aérobies et une aide en réduction de nitrate en conditions anaérobies. Par contre, il n'a pas été démontré que la souche NL23 procure un avantage à la souche JAM1.

## Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, Richard Villemur, de m'avoir permis de compléter ma maîtrise dans son laboratoire, lui qui a toujours été disponible pour offrir son aide et ses conseils. Sans sa patience, sa compréhension et sa générosité je n'aurais pas pu finir le projet.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du laboratoire de Richard Villemur pour leur aide, en particulier Christine Martineau, pour son aide indispensable dans mes débuts nerveux; Karla Vasquez pour son soutien, son expérience et sa lutte pour l'entretien du IC; et Florian Mauffrey, pour ses conseils (et ses mutants). Merci aussi à Geneviève, Marc-André et Valérie, ainsi qu'aux membres du GRME qui ont rendu l'expérience encore plus agréable.

Sans le soutien moral de ma famille et de mes amis, cette entreprise aurait été impossible. Merci à mes parents, à ma sœur et à tous les gens qui ont fait partie de ma vie durant cette période.

# Table des matières

1. Introduction .....	1
2. Revue de littérature .....	4
2.1. Dénitrification .....	4
2.2. Biofilms .....	7
2.3. Osmoprotection.....	8
2.4. Bioprocédés.....	9
2.5. Biodôme de Montréal.....	10
2.6. <i>Methylophaga nitratis</i> .....	13
2.7. <i>Hyphomicrobium nitratorans</i> .....	14
2.8. Co-cultures, partage de ressources.....	15
2.9. Hypothèse et objectifs .....	17
3. Matériel et méthodes.....	18
3.1. Souches bactériennes.....	18
3.1.1. Mutants.....	18
3.2. Culture des bactéries.....	19
3.2.1. Milieu optimal de la souche JAM1 .....	19
3.2.2. Milieu optimal de la souche NL23 .....	21
3.2.3. Milieu de croissance adapté à la co-culture .....	22
3.2.4. Milieux sous forme de géloses .....	23
3.3. Préparation des cultures .....	23
3.3.1. Ensemencement.....	24
3.3.2. Conditions de culture.....	24
3.4. Récolte de données .....	25
3.4.1. Spectrophotométrie .....	26
3.4.2. Chromatographie ionique.....	26
3.4.3. Extraction d'ADN .....	26
3.4.4. qPCR.....	27
4. Résultats .....	30
4.1. Détermination des conditions optimales de culture .....	30
4.1.1. Suivi de croissance préliminaire en conditions aérobies .....	30
4.1.2. Suivi de croissance en conditions anaérobies.....	31
4.1.3. Variations problématiques.....	40
4.1.4. Réduction de la quantité initiale de nitrate .....	46
4.2. Caractérisation de la relation entre les souches NL23 et JAM1.....	49
4.2.1. Croissance de cultures pures en présence de surnageant.....	49
4.2.2. Recherche d'un osmoprotecteur .....	53
4.2.3. Caractérisation approfondie de la consommation du nitrate/nitrite à l'aide de mutants de la souche JAM1 .....	57
5. Discussion .....	64
5.1. Paramètres optimaux pour la croissance des co-cultures des souches NL23 et JAM1 .....	64
5.2. Profil de consommation de nitrate et de nitrite lors de la dénitrification.....	66
5.3. Les souches NL23 et JAM1 en biofilm.....	70

5.4. Échange de ressources .....	73
6. Conclusion.....	75

## Liste des tableaux

Tableau 3.1 : composition du mélange dans chaque réaction de qPCR .	28
Tableau 3.2 : détails sur la technique du qPCR .....	29
Tableau 4.1 : concentration de NaCl par tube dans la recherche d'un osmoprotecteur .....	54

## Liste des figures

Figure 2.1 : Représentation schématique simplifiée du cycle de l'azote.....	4
Figure 2.2 : Voie métabolique de la dénitrification.....	6
Figure 2.3 : Bioréacteur du biodôme de Montréal .....	11
Figure 3.1 : Les souches NL23 et JAM1 .....	15
Figure 3.2 : Exemple de culture en anaérobiose.....	25
Figure 4.1 : Croissance en conditions aérobies (Instant Ocean 15 g/L).....	31
Figure 4.2: La croissance des co-cultures des souches NL23 et JAM1 en conditions anaérobies .....	33
Figure 4.3: Consommation de nitrate des co-cultures des souches NL23 et JAM1 en conditions anaérobies.....	35
Figure 4.4: concentration de nitrite dans les co-cultures des souche NL23 et JAM1 en conditions anaérobies.....	36
Figure 4.5: Concentration d'azote totale dans les co-cultures des souches NL23 et JAM1 en conditions anaérobies.....	38
Figure 4.6 : Consommation de nitrate pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 5 .....	40
Figure 4.7 : Concentration de nitrite pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 5 .....	41
Figure 4.8 : Concentration d'azote total pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 5.....	41
Figure 4.9 : Consommation de nitrate pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 10.....	42
Figure 4.10 : Concentration de nitrite pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 10.....	43
Figure 4.11 : Concentration d'azote total pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 10 .....	43
Figure 4.12 : Quantités relatives des gènes <i>napA</i> et <i>narG1</i> dans les co-cultures 1 : 5 .....	44
Figure 4.13 : Quantités relatives des gènes <i>napA</i> et <i>narG1</i> dans les co-cultures 1 : 10.....	45
Figure 4.14: Consommation de nitrate des co-cultures des souche NL23 et JAM1 en conditions anaérobies.....	47
Figure 4.15: Concentration de nitrite dans les co-cultures des souche NL23 et JAM1 en anaérobies ....	47
Figure 4.16: Concentration d'azote total dans les co-cultures des souches NL23 et JAM1 en conditions anaérobies .....	48
Figure 4.17 : Croissance en conditions aérobies de la souche NL23 en présence de surnageant.....	50
Figure 4.18 : Croissance en conditions aérobies de la souche JAM1 en présence de surnageant.....	52
Figure 4.19 : Croissance de la souche NL23 en présence de métabolites de la souche JAM1 (0% de NaCl) .....	55
Figure 4.20 : Croissance de la souche NL23 en présence de métabolites de la souche JAM1 (1% de NaCl) .....	55
Figure 4.21 : Croissance de la souche NL23 en présence de métabolites de la souche JAM1 (1,5% de NaCl) .....	56
Figure 4.22 : Croissance de la souche NL23 en présence de métabolites de la souche JAM1 (2% de NaCl) .....	56
Figure 4.23 : Consommation du nitrate par les co-cultures des souches JAM1 non-mutantes ou mutantes avec la souche NL23 (conditions anaérobies).....	59

Figure 4.24 : Concentration de nitrite dans les co-cultures des souches JAM1 non-mutantes ou mutantes avec la souche NL23 (conditions anaérobies) .....	60
Figure 4.25 : Concentration d'azote total dans les co-cultures des souches JAM1 non-mutantes ou mutantes avec la souche NL23 (conditions anaérobies) .....	61
Figure 5.1 : Profil de consommation du nitrate et du nitrite par la souche NL23 lors de la dénitrification.....	66
Figure 5.2 : Profil de consommation du nitrate et du nitrite par la souche JAM1 lors de la dénitrification.....	67
Figure 5.3 : Profil de consommation du nitrate et du nitrite par une co-culture des souches NL23 et JAM1 lors de la dénitrification .....	67
Figure 5.4 : Profil de consommation du nitrate et du nitrite par une co-culture des espèces <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Pseudomonas denitrificans</i> lors de la dénitrification .....	68
Figure 5.5 : Support en plastique garni d'un biofilm.....	71
Figure 7.1 : Schéma de la méthode de création d'un biofilm.....	77

## **Liste des sigles et des abréviations**

°C : degrés Celsius

ADN : acide désoxyribonucléique

DO600 : densité optique à une longueur d'onde de 600 nm

EPS : extracellular polymeric substances

FISH : fluorescent in-situ hybridization

TSA : trypticase soy agar

R2A : Reasoner's 2A agar

ATCC : american type culture collection

Pb : paires de bases

FAM : carboxylfluorescein

BHQ : black hole quencher

rpm : rotations par minute



# 1. Introduction

Le nitrate représente un polluant potentiel dans le contexte d'environnements aquatiques naturels ou simulés. La molécule est toxique pour les animaux à des concentrations excédant environ 30 ppm (0,49 mM d'azote). La limite imposée à l'eau potable au Canada et aux États-Unis est de 10 mg/L d'azote-nitrate (45 mg/L de nitrate), concentration à laquelle l'eau est considérée définitivement sécuritaire pour les humains les plus vulnérables. Le nitrite est encore plus toxique : quelques milligrammes par litre sont suffisants pour la manifestation de problèmes chez les poissons et la limite acceptable dans l'eau potable est de 1 mg/L d'azote nitrite (3 mg/L de nitrite). Le nitrate est souvent un composant de fertilisants agricoles et s'accumule donc à hautes concentrations à l'embouchure de cours d'eau. Outre les effets directs sur la santé des populations humaines et animales, il peut y avoir prolifération d'algues, hypoxie et autres effets reliés causant des changements nocifs à l'écosystème du milieu (Camargo *et al.*, 2005). Dans un système aquatique fermé, comme un aquarium, l'accumulation du nitrate peut se produire de manière inexorable puisque l'eau du milieu est recyclée et que les organismes vivants en sont des sources continues. Une solution non-biologique est le remplacement total de l'eau, ce qui peut se révéler être dispendieux et peu pratique. Une solution potentielle est la dénitrification biologique par des organismes bactériens.

Un des écosystèmes en exhibition au Biodôme de Montréal est le mésocosme du fleuve Saint-Laurent, qui comporte un grand aquarium marin dans lequel vivent plusieurs espèces animales originaire de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent. L'accumulation du nitrate étant problématique, un bioréacteur fut installé, dans l'espoir que des espèces bactériennes dénitrifiantes puissent réduire la molécule toxique en azote gazeux. Ce bioréacteur était composé d'un mécanisme supportant la croissance d'un biofilm exhibant de l'activité dénitrifiante; ce biofilm est étudié par des membres du laboratoire du Pr. Richard Villemur depuis 2000. Plusieurs

souches bactériennes distinctes en ont été isolées, et plusieurs organismes non-bactériens sont notés d'y cohabiter. Deux souches bactériennes, cependant, composent la grande majorité de la communauté biologique du biofilm, en termes de biomasse et d'activité dénitrifiante : les souches JAM1 et NL23, toutes les deux méthylophages et anaérobies facultatives. Depuis leur découverte et leur caractérisation comme des espèces distinctes, elles sont dénommées *Methylophaga nitratireducenticrescens* et *Hyphomicrobium nitrativorans*, respectivement.

La dénitrification est un processus de réduction du nitrate et de composés intermédiaires en quatre étapes principales. Le nitrate est d'abord réduit en nitrite, qui est réduit en acide nitrique, et ensuite en acide nitreux pour finalement produire de l'azote gazeux. À chacune des étapes est associé une enzyme. La souche JAM1 n'effectue que trois des quatre étapes de dénitrification, ne possédant pas de gène codant pour la nitrite réductase. Elle réduit le nitrate de façon efficace grâce à deux nitrate réductases membranaires, Nar1 et Nar2. La souche est aussi tolérante aux conditions salées, exhibant une croissance normale dans un milieu contenant jusqu'à 8% de NaCl. La souche NL23, quant à elle, effectue toutes les étapes de la dénitrification. Toutefois, sa nitrate réductase périplasmique exécute la réduction du nitrate beaucoup moins rapidement que le duo d'enzymes de la souche JAM1. Contrairement à cette dernière, la souche NL23 ne tolère pas le sel dans son milieu, et une concentration de plus de 1% NaCl inhibe sa croissance. Notamment, ceci semble particulier car le milieu dans lequel était cultivé le biofilm était marin et incluait près de 3% de sel.

Puisque ces deux souches principales étaient de loin les plus abondantes et actives du biofilm, il est naturellement intéressant de les étudier en plus de détails de façon individuelle. Par contre, un biofilm est une communauté complexe de microorganismes, et les souches NL23 et JAM1 interagissent donc presque certainement à un certain niveau. Il est donc également intéressant d'étudier la relation entre les deux souches, spécialement lors de la dénitrification. Ce projet de recherche tente de déterminer s'il existe une coopération entre les deux espèces

principales du biofilm. Cette recherche sera surtout axée sur le partage des oxydes d'azote mais visera également de trouver d'autres éléments pouvant contribuer à une synergie, tels que des facteurs de croissance, des molécules essentielles (ex : vitamine B12), etc.

## 2. Revue de littérature

### 2.1. Dénitrification

Le processus de dénitrification est une des composantes majeures du cycle de l'azote, où l'azote circule dans l'atmosphère, le sol et l'eau sous diverses formes moléculaires. L'importance de cette circulation provient en grande partie de la dépendance d'organismes vivants à l'azote pour la structure et la formation de molécules protéiques et nucléiques. En effet, aucune vie terrestre ne peut exister sans cet élément, et les organismes existant au sein de milieux pauvres en azote doivent développer des stratégies spéciales de survie.

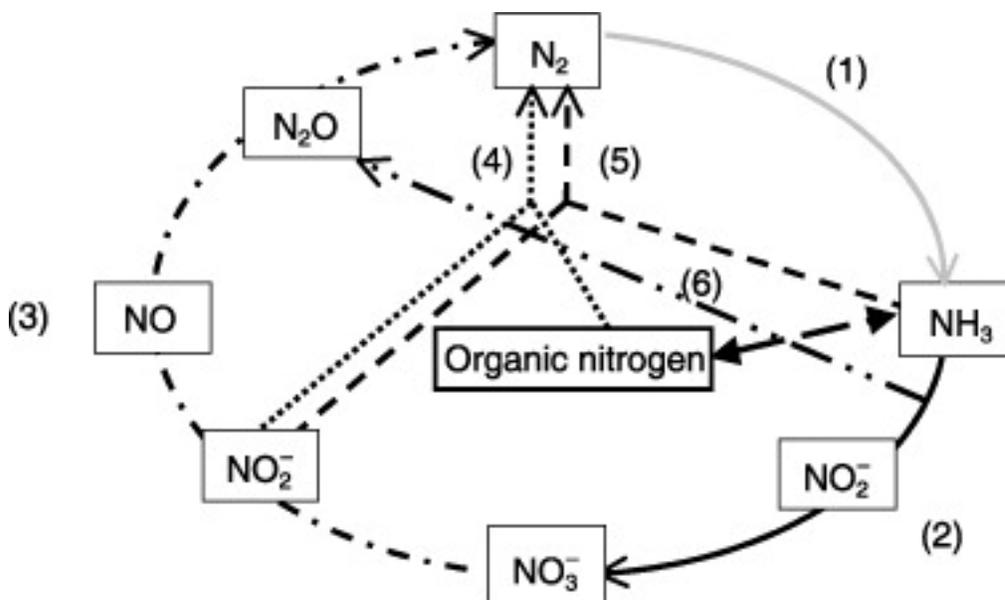


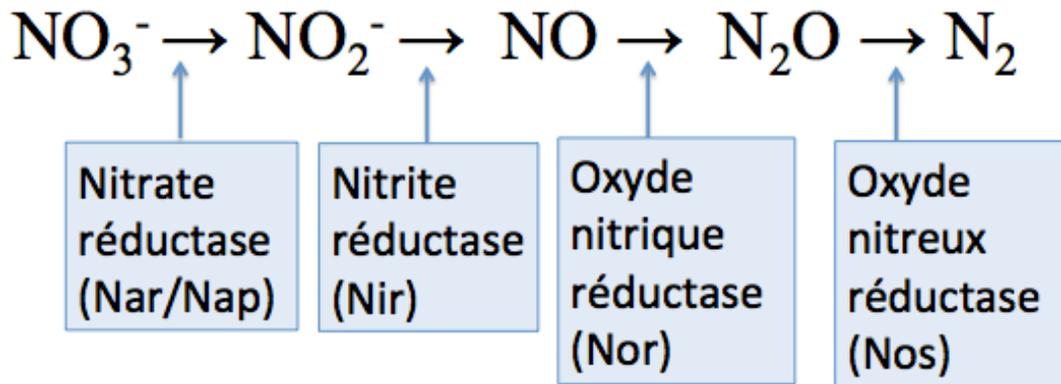
Figure 2.1 : Représentation schématique simplifiée du cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est un système complexe de réactions chimiques en grande partie catalysées par des organismes microbiens. (1) Fixation d'azote; (2) nitrification; (3) dénitrification; (4) co-dénitrification; (5) anammox; (6) l'oxydation d'ammoniac durant la nitrification. (Hayatsu *et al.*, 2008)

La dénitrification réfère spécifiquement à toutes les étapes de la réduction du nitrate en azote (Fig. 2.2). Dans la plupart des cas, cette réduction est exécutée par des espèces bactériennes profitant du potentiel énergétique des réactions chimiques impliquées; le processus réduit séquentiellement le nitrate en nitrite, en oxyde nitrique, en oxyde nitreux et finalement en azote gazeux, chaque étape offrant un avantage énergétique différent. Chacune des réactions est catalysée par une enzyme spécifique :

- La nitrate réductase catalyse la réduction du nitrate en nitrite, ce qui offre le plus d'énergie potentielle parmi les étapes de la dénitrification. Deux versions dissimilaires de cette enzyme existent : une version membranaire, codée par les gènes *nar*, et une version périplasmique, codée par les gènes *nap*. Il existe également des variétés de nitrate réductases assimilatoires. (Zumft, 1997)
- La nitrite réductase à son tour permet la réduction du nitrite en oxyde nitrique, la première forme gazeuse des molécules azotées de la dénitrification. Il y a aussi deux versions de cette enzyme : Cu-Nir, qui contient un atome de cuivre, est codé par le gène *nirK*; cd<sub>1</sub>-Nir, qui contient un cytochrome cd<sub>1</sub>, est codé par le gène *nirS*. Ces deux variétés d'enzymes n'ont jamais été retrouvées ensemble dans la même espèce et aucune étude n'a pu révéler une différence fonctionnelle entre elles. (Prieme *et al.*, 2002, Zumft, 1997)
- L'oxyde nitrique réductase catalyse la réduction de l'oxyde nitrique en oxyde nitreux. La version de l'enzyme qui est présente dans les bactéries dénitrifiantes est cNor, qui contient un cytochrome c et est codé par les gènes *nor* (unité catalytique codée par *norB*). Il existe également d'autres versions de l'oxyde nitrique réductase dans certaines espèces bactériennes qui font partie du système de leurs défenses contre la toxicité de l'oxyde nitrique. (Hino *et al.*, 2012)

- L'oxyde nitreux réductase catalyse la réduction de l'oxyde nitreux en azote gazeux. Cette enzyme contient un atome de cuivre et est codée par les gènes *nos* (unité catalytique codée par le gène *nosZ*). (Pauleta *et al.*, 2013)



**Figure 2.2 : Voie métabolique de la dénitrification**

La voie complète de dénitrification transforme le nitrate en azote gazeux par une série de réactions chimiques catalysées par des enzymes (surlignées). Les molécules sont le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), l'oxyde nitrique ( $\text{NO}$ ), l'oxyde nitreux ( $\text{N}_2\text{O}$ ) et l'azote gazeux ( $\text{N}_2$ ).

Ces enzymes peuvent se manifester sous des formes différentes et avoir des activités variables selon l'espèce. Puisqu'elle offre un avantage énergétique inférieur à la respiration aérobie, la dénitrification est principalement utilisée par des espèces strictement anaérobies ou comme alternative par des bactéries anaérobies facultatives. Seule une fraction d'espèces bactériennes possède la capacité d'effectuer la dénitrification et celles-ci n'en effectuent pas nécessairement toutes les étapes elles-mêmes (Zumft, 1997). Plusieurs espèces bactériennes se contentent d'effectuer seulement la respiration du nitrate, telle que *Serratia marcescens*, qui ne peut produire de l'oxyde nitrique que par la réduction non-enzymatique du nitrite (Anderson *et al.*, 1986). Celles-ci constituent le plus important sous-groupe de bactéries profitant de la réduction d'oxydes d'azote (Gregory *et al.*, 2003). D'autres espèces se servent plutôt d'enzymes de réduction comme mécanisme de défense contre les molécules toxiques. L'enzyme qNor est utilisé par des bactéries comme *Neisseria gonorrhoeae* pour se débarrasser d'oxyde nitrique (Hino *et al.*, 2012). De

plus, certaines bactéries réduisent des molécules intermédiaires de la dénitrification en conditions aérobies. Par exemple, l'espèce *Paracoccus pantatrophus* (précédemment nommée *Thisphaera pantatropa*) est en mesure de performer une dénitrification complète en présence d'oxygène. Il est possible que cette activité permette à la bactérie de dissiper les molécules réductrices et retrouver un équilibre redox. (Berks *et al.*, 1995)

## **2.2. Biofilms**

Dans la nature, la vaste majorité de la vie microbienne existe sous forme de biofilm, et non diffuse en milieu liquide. Un biofilm est composé d'organismes de classifications taxonomiques variées ainsi que d'une matrice complexe de polymères biologiques généralement connus sous le nom « substances polymériques extracellulaires » (en Anglais, EPS). Celles-ci sont produites directement par les organismes vivant dans le biofilm ou sont modifiées par des enzymes produites par ces organismes. Cependant, la composition exacte de la structure d'un biofilm est difficile à déterminer. Les EPS sont intimement impliquées dans la vie microbienne d'un biofilm, et leurs fonctions sont multiples. Les EPS peuvent agir comme source de nourriture, faciliter l'échange génétique entre bactéries, faciliter la rétention d'eau, fournir une protection contre des facteurs antibactériens et bien d'autres choses. L'architecture d'un biofilm est aussi hautement variée et dépend de l'organisation des EPS. Il peut y avoir des canaux et des compartiments, et la forme du biofilm peut varier selon la situation. Une des composantes essentielles à la formation d'un biofilm est la gamme de molécules (protéines, ADN, polysaccharides et molécules amphiphiles) qui servent à l'adhésion de bactéries colonisatrices à une surface. En effet, la première étape dans la formation d'un biofilm est l'attachement à une surface, suivi de la formation d'une microcolonie par division cellulaire. Ce n'est qu'après l'adhésion originale que les autres composantes de la matrice du biofilm sont produites et que d'autres espèces bactériennes y sont recrutées. Sans la présence d'une surface propice, les bactéries

ne peuvent pas former de biofilm, et restent en phase planctonique ou s'agrègent en d'autres formes (ex : floc). (Flemming *et al.*, 2010)

Il est aussi possible qu'un biofilm soit nécessaire pour la fonction de certaines substances relâchées par des bactéries. Il a été documenté que certaines souches bactériennes halophiles pouvaient relâcher des particules osmoprotectrices (ectoïne, glutamate) dans leur milieu pour aider à la survie de bactéries dans leur environnement. (Plakunov *et al.*, 2008)

### **2.3. Osmoprotection**

Lorsqu'elles sont confrontées à des fluctuations de l'osmolarité de leur milieu (comme, par exemple, une augmentation en sel), les bactéries doivent équilibrer les gradients osmotiques créés pour survivre. Pour atteindre cet objectif, elles peuvent produire des osmoprotecteurs (ou solutés compatibles) ou les obtenir dans leur environnement. Un osmoprotecteur est une molécule avec un potentiel osmotique élevé qui n'interfère pas avec les processus métaboliques d'une cellule, même en hautes concentrations. En l'accumulant dans son cytoplasme, une bactérie peut réduire la pression osmotique entre les deux côtés de sa membrane. (Kempf *et al.*, 1998)

Il existe une variété d'osmoprotecteurs. Ceux-ci incluent : des diholosides comme le saccharose et le tréhalose; des polyols comme le glycérol; ainsi que des acides aminés (et dérivés) comme la proline, les bêtaïnes, la carnitine et l'ectoïne (Kempf *et al.*, 1998). Plusieurs bactéries ont des systèmes complexes en place pour le règlement fin de leur réponse à un stress osmotique. L'espèce bactérienne *Bacillus subtilis*, par exemple, fait la synthèse de la proline pour se protéger, mais elle possède aussi un transporteur spécifique à la capture de proline dans l'environnement. Elle peut aussi capturer des peptides et en extraire de la proline avec des protéases, une stratégie qui est adoptée par plusieurs autres espèces également (ex : *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus casei*, *Oenococcus*

*oeni*) (Zaprasis *et al.*, 2013). De plus, certaines bactéries peuvent faire usage de plusieurs osmoprotecteurs différents. *Escherichia coli* est capable de synthétiser le tréhalose et la glycine bêtaïne, ainsi que d'utiliser la proline et l'ectoïne retrouvées dans son environnement (Jebbar *et al.*, 1992). L'ectoïne, dérivé de la tetrahydropyrimidine, est l'osmoprotecteur que la souche JAM1 semble pouvoir produire (voir section 2.6). Cet osmoprotecteur est particulièrement intéressant dans le cadre des communautés bactériennes tolérantes au sel car il a été démontré que des bactéries non-halophiles peuvent en faire usage pour obtenir une tolérance aux pressions osmotiques (Jebbar *et al.*, 1992).

## **2.4. Bioprocédés**

Un bioprocédé est une application des capacités de microorganismes pour la production de biens ou pour d'autres processus utiles. Ces applications biotechnologiques sont couramment utilisées dans une panoplie de domaines, incluant la production alimentaire, la production de molécules pour utilisation pharmaceutique, etc.

La purification d'eau usée implique souvent des bioprocédés, dont les systèmes de boue activée, qui dépendent de l'activité de biomasse en floc dans des réservoirs aérés pour purifier l'eau qui s'y retrouve (Roediger, 1983). Les bioréacteurs membranaires (« Membrane bioreactor » en Anglais, ou MBR) combinent un système de boue activée avec une ultrafiltration pour purifier de l'eau. Cette technologie représente un marché évalué à des centaines de millions de dollars et reste un sujet de recherche actif (Le-Clech *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2016). La biomasse utilisée dans un bioprocédé peut aussi être cultivée sous forme de biofilm fixé à un support à l'aide d'un bioréacteur à lit fluidisé, comme dans le cas d'un traitement de lixiviat dans une décharge d'ordures (Hajipour *et al.*, 2011) ou de dégradation de substances huileuses par un biofilm fongique (Pakula *et al.*, 1996). Cependant, les biofilms peuvent aussi être problématiques dans les bioprocédés. Dans un MBR, la formation d'un biofilm sur la membrane de filtration mène à la

dégradation de celle-ci. Ceci est considéré comme un des problèmes principaux dans le développement des MBR (Le-Clech *et al.*, 2006).

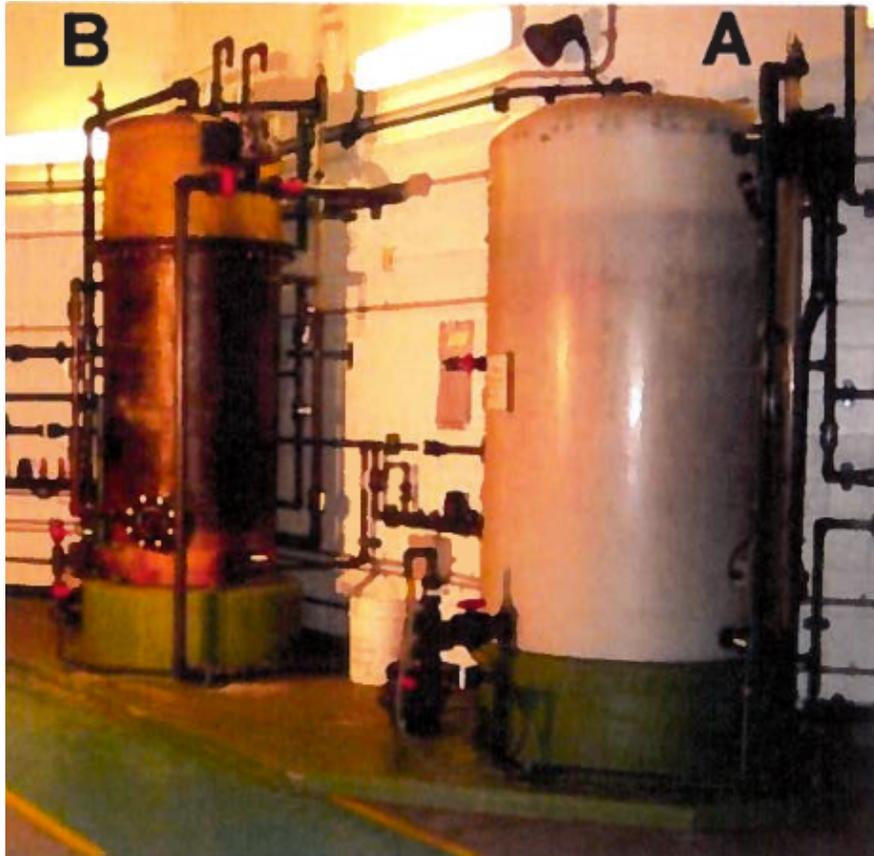
La dénitrification peut elle aussi être exploitée comme bioprocédé. Le nitrate et les autres composés intermédiaires de la dénitrification représentent tous des dangers potentiels pour l'environnement ainsi que pour la santé d'organismes vivants, incluant les humains. Pour cette raison, le développement de méthodes de dénitrification en bioréacteur est très actif. Un domaine d'attention particulière est le traitement d'eau polluée par l'industrie agroalimentaire. Plusieurs études récentes ont investigué l'efficacité de bioréacteurs avec différentes sources de carbones et une variété de paramètres. Les résultats montrent en général une amélioration potentielle avec ces techniques par rapports aux techniques de traitement traditionnelles (création de zones humides, construction de fossés écologiques, etc) (Liang *et al.*, 2015).

## **2.5. Biodôme de Montréal**

Le Biodôme de Montréal a installé en 1998 un bioréacteur à lit fluidisé pour remédier à un niveau dangereusement élevé de nitrate (environ 15 mM) dans l'eau de leur aquarium d'eau marine (Fig. 2.3). À l'intérieur du réacteur se retrouvait un biofilm dénitrifiant nourri de méthanol et formé de bactéries préalablement présentes dans le milieu. L'espoir était que le bioréacteur pourrait garder la concentration du nitrate dissous à des valeurs plus sécuritaires, dans le but d'éviter des solutions plus drastiques, comme le remplacement d'eau. Le système de dénitrification n'a pu atteindre ces attentes, et donc des efforts d'optimisation de la performance du bioréacteur ont été entreprises. (Labbé, 2007)

Il a été démontré qu'il était possible de générer un biofilm capable de réduire une concentration de 50 mg d'azote par litre à près de 1 mg d'azote par litre. Le biofilm était formé de bactéries présentes dans l'eau marine du mésocosme du Fleuve St-Laurent du Biodôme et était cultivé en mode continu dans un réacteur à lit

fluidisé, mais à une échelle pilote, beaucoup moins volumineuse que dans l'aquarium original. Il a été conclu que le bioréacteur dénitrifiant pourrait être efficace, mais que plusieurs facteurs (épaisseur du biofilm, dégradation de supports, zones mortes) qui étaient faciles à contrôler en laboratoire devenaient des obstacles importants à l'application du procédé à grande échelle. (Labelle *et al.*, 2005)



**Figure 2.3 : Bioréacteur du biodôme de Montréal**

Bioréacteur de désoxygénation (A) et de dénitrification (B) pour le mésocosme du Fleuve St-Laurent au Biodôme de Montréal. Installé en 1998. (Labbé, 2007)

Par la suite, la composition microbiologique du biofilm du bioréacteur a été investiguée. De la biomasse issue du biofilm a été cultivée sur trois types d'agar (TSA, R2A et Winogradsky). Trois isolats ont été obtenus et leur ADN ribosomal 16S analysés, ce qui a permis de déterminer qu'ils étaient des  $\alpha$ -protéobactéries des genres *Hyphomicrobium*, *Paracoccus*, et d'un nouveau genre bactérien. La souche du

genre *Hyphomicrobium* a été nommée NL23 et a été caractérisée comme un des acteurs principaux de l'activité dénitrifiante (Labbé *et al.*, 2003). L'espèce du nouveau genre a subséquemment été caractérisée comme nouvelle espèce dénommée *Nitratireductor aquibiodomus* (Labbé *et al.*, 2004). Les bactéries non-cultivables du biofilm ont été étudiées à l'aide d'une génothèque d'ADN ribosomal 16S total du biofilm. Il a été déterminé que 70% des clones générés avaient la séquence d'une  $\gamma$ -protéobactérie du genre *Methylophaga*. Les autres profils indiquaient la présence d'une variété de séquences reliées à des espèces bactériennes dénitrifiantes. Des études subséquentes par FISH (« Fluorescent in situ hybridization ») ont confirmé l'abondance dominante (jusqu'à 79%) de souches appartenant au genre *Methylophaga* et l'importance du genre *Hyphomicrobium* (7-8%). Il a aussi été déterminé que le biofilm incluait environ 15 espèces bactériennes. (Labbé *et al.*, 2003, Labbé *et al.*, 2007)

Il était surprenant à l'époque que des espèces du genre *Methylophaga* puissent composer une aussi grande proportion d'un biofilm en conditions anaérobies; le genre était jusque-là caractérisé par des espèces strictement aérobies. À l'aide de méthanol marqué par des isotopes de carbone ( $^{14}\text{C}$ ) et d'analyse des séquences 16S dans les bactéries l'ayant assimilé, il a été démontré qu'une espèce du genre *Methylophaga* était hautement impliquée dans le processus de dénitrification. Une fois isolée, cette souche a été nommée JAM1; celle-ci a été désignée comme espèce distincte après des études de caractérisation approfondies (voir section 2.6). Les gènes *narG1* et *narG2* ont aussi été corrélés avec l'activité de réduction de nitrate de la souche JAM1. Les résultats d'analyses bioinformatiques ont suggéré une origine de transfert horizontal pour le gène *narG1*. (Auclair *et al.*, 2010)

## 2.6. *Methylophaga nitratireducentis*

Lors des expériences explorant la diversité microbienne d'un biofilm provenant de l'aquarium du mésocosme du Fleuve St-Laurent au Biodôme de Montréal, il fut déterminé qu'une des souches bactériennes représentait environ 79% de toute la biomasse présente. L'identité de cette souche n'était pas connue à l'époque, mais il avait été déterminé qu'elle était étroitement apparentée aux espèces du genre *Methylophaga*. (Labbé *et al.*, 2007) Suivant des recherches plus poussées, cette souche, initialement nommée JAM1, fut désignée comme nouvelle espèce *Methylophaga nitratireducentis*. (C. Villeneuve *et al.*, 2013)

Le genre *Methylophaga* est une division des  $\gamma$ -protéobactéries caractérisée par des espèces bactériennes de forme bacille, typiquement légèrement halophiles. Les espèces membres du genre sont aussi décrites comme consommatrices de composés à un carbone (sauf le méthane) dont le méthanol, qu'elles assimilent à l'aide de la voie métabolique du ribulose monophosphate. (Janvier *et al.*, 1995) Typiquement, les espèces du genre *Methylophaga* sont des espèces habitant des milieux marins où elles peuvent consommer le méthanol abondamment produit par des microorganismes (phytoplancton) (Mincer *et al.*, 2016). Plusieurs espèces du genre sont aussi reportées d'être capable de la production d'osmoprotecteur, notamment l'ectoïne. Ces espèces incluent *M. thalassica*, *M. alcalica*, *M. murata* et autres (Doronina *et al.*, 2005, Mustakhimov *et al.*, 2012, Mustakhimov *et al.*, 2009).

La souche JAM1 est tolérante au milieu salé jusqu'à 8% de NaCl, malgré que sa croissance optimale est obtenue dans des milieux d'environ 3% de NaCl. Elle est capable de croissance entre des températures de 15°C à 37°C mais préfère une température autour de 30°C. Un pH entre 6 et 11 permet la croissance, mais le pH optimum est de 8. Elle est auxotrophe pour la vitamine B<sub>12</sub>, et requiert donc l'inclusion de cette molécule dans le milieu pour la croissance. Sur gélose du milieu 1403 (milieu adapté aux souches bactériennes membres du genre *Methylophaga*), ses colonies sont rondes et ont environ 2 mm de diamètre. La souche est le seul

membre du genre *Methylophaga* à être anaérobie facultative, c'est-à-dire d'être capable de croissance en utilisant le nitrate (Auclair *et al.*, 2010, C. Villeneuve *et al.*, 2013) et l'oxyde nitreux (Mauffrey, résultats non-publiés) comme accepteurs d'électron, mais préférant l'oxygène dans ce rôle s'il est disponible. Elle peut également réduire l'oxyde nitrite en oxyde nitreux (Mauffrey, résultats non-publiés) mais pas le nitrite (Auclair *et al.*, 2010).

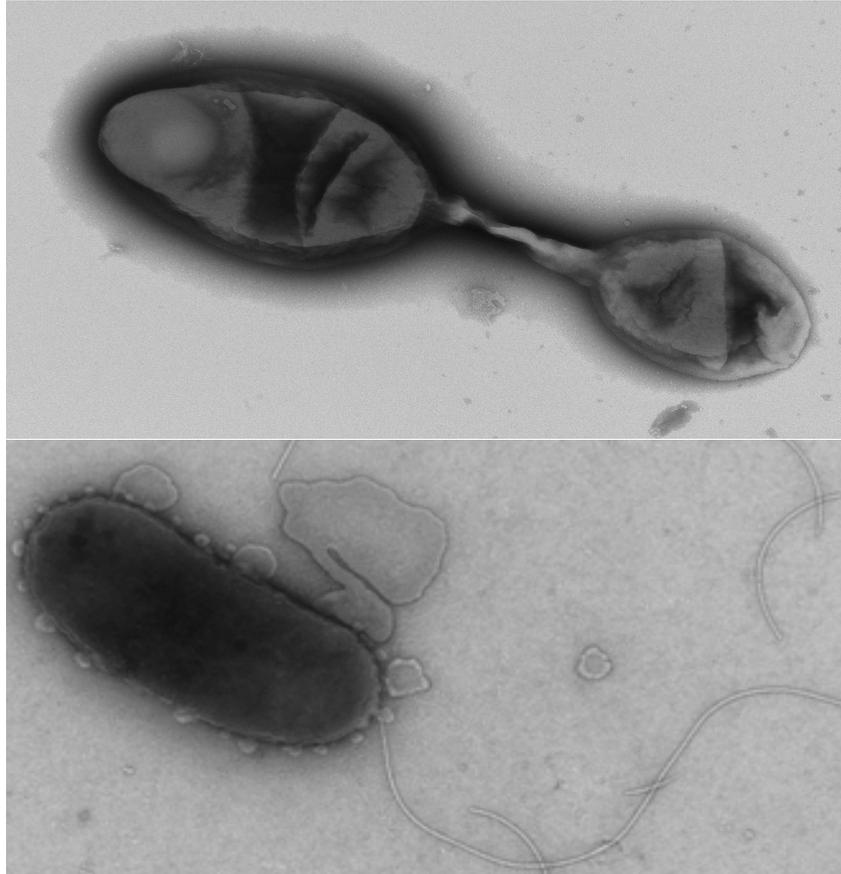
## **2.7. *Hyphomicrobium nitratorans***

Outre la souche JAM1, une autre bactérie composait un pourcentage considérable (7-8%) de la biomasse totale du biofilm. (Labbé *et al.*, 2007) Celle-ci fut désignée NL23 et par la suite fut elle aussi décrite comme une nouvelle espèce, *Hyphomicrobium nitratorans*. (Martineau *et al.*, 2013)

Le genre *Hyphomicrobium* fait partie des  $\alpha$ -protéobactéries. La particularité des espèces membres est leur production d'hyphes lors de la reproduction. Les bactéries sont aussi décrites comme bacilles aux bouts pointus. Aussi, étant donné de leur faible tolérance aux environnements salés, elles sont rarement retrouvées dans des milieux marins. Plusieurs membres du genre ont été impliqués dans la dénitrification, dont *H. zavarzinii* et *H. denitrificans*, entre autres (Fesefeldt *et al.*, 1998, Martineau *et al.*, 2015). On retrouve couramment ces bactéries dans les bioprocédés de traitement d'eaux usées. (Gliesche *et al.*, 2005)

La souche NL23 ne tolère pas un milieu salin, ce qui est surprenant en considérant le contexte de sa découverte et de son activité; la croissance maximale est obtenue en conditions de 0-0,5% de NaCl. Presque aucune croissance n'est possible en milieux avec plus de 1% de NaCl. La souche NL23 peut croître à des températures entre 15°C et 35°C, mais préfère une température de 30° à 35°C. Le pH optimal est entre 7,5 et 8,5, mais un pH entre 7 et 9,5 est suffisant pour supporter une certaine croissance. Comme la souche JAM1, la souche NL23 est anaérobie facultative, préférant les environnements oxygénés mais étant capable de croissance

efficace en utilisant le nitrate comme accepteur d'électrons pour générer de l'azote gazeux. Sur gélose, les colonies formées sont de petit diamètre (~1mm) et blanches. La souche NL23 peut tirer son carbone du méthanol, de la méthylamine ou du formate. (Martineau *et al.*, 2013)



**Figure 3.1 : Les souches NL23 et JAM1**

Les espèces bactériennes *Hyphomicrobium nitratorans* (souche NL23, haut) et *Methylophaga nitrateduscenticrescens* (souche JAM1, bas) en microscopie.

## 2.8. Co-cultures, partage de ressources

Étant donné de la complexité des conditions dans un milieu naturel, il est probable que les processus de dénitrification n'y sont normalement pas performés par des espèces uniques mais bien par des communautés variées impliquant des partages compliqués de ressources. Une relation synergique entre bactéries est une

coopération qui est bénéfique pour toutes les bactéries impliquées. Il existe déjà des cas de telles interactions en co-cultures dénitrifiantes documentées dans la littérature scientifique. Par exemple, il a été démontré que l'espèce bactérienne *Ralstonia picketti* a une activité dénitrifiante de 40 à 100 fois supérieure lorsqu'elle est cultivée en présence de l'espèce *Streptomyces griseus*. L'aide était fournie par cette dernière sous forme de protéases secrétées qui augmentaient la concentration d'histidine dans le milieu. Cette histidine a ensuite été en mesure d'augmenter le taux de dénitrification de *R. picketti* pour des raisons inconnues. (Takaki *et al.*, 2008)

Un autre exemple de synergie est la co-culture de l'espèce *Alcaligenes faecalis* avec la souche *Pseudomonas* G9. La première est une bactérie dénitrifiante qui est incapable de réduire le nitrate en nitrite, mais qui performe les autres étapes de la dénitrification. À l'inverse, la souche G9 exprime sa nitrate réductase constitutivement. Celle-ci performe aussi les autres étapes de la dénitrification mais souffre d'une accumulation toxique de nitrite en culture pure. De plus, elle ne peut pas croître lorsqu'elle est inoculée en conditions anaérobies. En conditions dénitrifiantes (anaérobies) avec seul le nitrate comme accepteur d'électron fourni, chaque bactérie est incapable de démontrer une croissance en culture pure. Il a pourtant été démontré qu'une co-culture des deux bactéries a été capable de croissance et d'activité dénitrifiante efficace. (Van de Pas-Schoonen *et al.*, 2005)

## 2.9. Hypothèse et objectifs

Certaines des caractéristiques uniques à chaque souche (NL23 et JAM1) laissent imaginer qu'il puisse exister un certain échange de ressources. La souche JAM1 ne peut pas réduire le nitrite, tandis que cette capacité est disponible à la souche NL23. De même, la souche NL23 ne peut exister en présence de hautes concentrations de sel; se pourrait-il que la souche JAM1 puisse partager une certaine osmoprotection de laquelle elle dispose? Le portrait final serait un mutualisme qui améliorerait subséquemment l'efficacité de la dénitrification. Donc :

**Hypothèse** : il existe une coopération entre les NL23 et JAM1 en co-culture sous forme de partage de ressources (nitrate, nitrite, vitamine B12) ou d'autres facteurs (ex : osmoprotection/ectoïne).

**Objectifs** :

- l'optimisation des conditions de la co-culture des souches NL23 et JAM1 dans le but d'en faciliter l'étude;
- la caractérisation des interactions entre les deux souches.

### **3. Matériel et méthodes**

#### **3.1. Souches bactériennes**

Les souches bactériennes de ce projet ont été isolées à partir d'un biofilm dont l'origine est le bioréacteur dénitrifiant du mésocosme du Fleuve St-Laurent du Biodôme de Montréal. Celles-ci sont : *Methylophaga nitratireducentescens* (souche JAM1), *Hyphomicrobium nitrativorans* (souche NL23) (Fig.3.1). Plusieurs échantillons de chaque espèce ont été conservés à -80°C dans leurs milieux de culture respectifs complétés de 25% de glycérol.

##### **3.1.1. Mutants**

En plus des deux souches bactériennes ci-dessus, trois mutants de type « knockout » de la souche JAM1 ont été utilisés. Ceux-ci exhibent tous des déficiences en ce qui concerne leurs enzymes de la nitrate réductase : JAM1 $\Delta$ narG1 est un mutant sans copie du gène narG1; JAM1 $\Delta$ narG2 est un autre sans copie du gène narG2; et JAM1 $\Delta$ narG1narG2 est un double-mutant ne possédant aucune copie des gènes narG1 et narG2. Ces souches ont été créées par la méthode de la double recombinaison par Florian Mauffrey, étudiant de doctorat dans le laboratoire du Pr. Villemur (Mauffrey *et al.*, 2015).

## 3.2. Culture des bactéries

### 3.2.1. Milieu optimal de la souche JAM1

Le milieu optimal pour la croissance de la souche JAM1 tel que déterminé dans les tests d'optimisation préalables (Villeneuve et al., 2013) est le milieu ATCC 1403 pour espèces du genre *Methylophaga*. Un litre du milieu liquide contient :

NaCl-----	24 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O-----	3 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O -----	2 g
KCl-----	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O -----	1 g
Bis-Tris-----	0,5 g
Solution T-----	20 ml
Solution de Wolf-----	10 ml
Eau distillée -----	970 ml

La solution T est une solution minérale dont la composition est la suivante (pour 1 L de solution):

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	7 g
NH <sub>4</sub> Cl -----	100 g
Bis-Tris-----	100 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> -----	3 g
Eau distillée -----	1000 ml

La solution de Wolf est une autre solution minérale en utilisation courante. Un litre de la solution contient :

$N(CH_2CO_2H)_3$	-----1,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	----- 3 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-----0,5 g
NaCl	----- 1 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-----0,1 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	-----0,1 g
$CaCl_2$	-----0,1 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-----0,1 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	----- 0,01 g
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	----- 0,01 g
$H_3BO_3$	----- 0,01 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	----- 0,01 g
Eau distillée	----- 1000 ml

Suite à l'ajout des minéraux le milieu a été ajusté à un pH de 7,3 et autoclavé à 121°C pendant au moins 15 minutes. Avant utilisation, et seulement lorsque la solution est à température de la pièce, l'ajout de vitamine B<sub>12</sub> et de méthanol a été effectué. Pour 100 ml de milieu, 0,3 ml de méthanol stérilisé par filtration et 0,1 ml de vitamine B<sub>12</sub> (0,1 mg/ml) (stérilisé de la même façon) ont été ajoutés.

### 3.2.2. Milieu optimal de la souche NL23

Pour la souche NL23, le milieu de croissance optimal est une version modifiée du milieu ATCC 337a, dont l'efficacité a été testée lors d'études précédentes (Martineau *et al.*, 2013). Dans chaque litre du milieu on retrouve :

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ -----	1,3 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -----	1,13 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -----	0,5 g
$\text{MgSO}_4\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,2 g
Solution d'éléments traces -----	5 ml
Eau distillée -----	1000 ml

La solution d'éléments traces est spécifiquement adaptée au milieu 337a; un litre de la solution est composé de :

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -----	0,618 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,4 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -----	0,2 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -----	0,176 g
Eau distillé-----	1000 ml

La solution d'éléments traces pouvait contenir une certaine quantité de précipité suivant un cycle à l'autoclave, mais ceci n'a pas produit d'effets notables sur la croissance des bactéries. Suite à la combinaison des ingrédients, la solution a été ajustée à un pH entre 7,5 et 8 et autoclavée à 121°C pendant au moins 15 minutes. De la vitamine B<sub>12</sub> (0,1 ml à 0,1 mg/ml) et du méthanol (0,3 ml) ont été ajoutés avant l'utilisation.

### 3.2.3. Milieu de croissance adapté à la co-culture

Avant le début du projet, il était déjà connu que les souches NL23 et JAM1, ainsi qu'une co-culture des deux, pouvaient simplement croître dans une version diluée (15 g/L au lieu de 30 g/L) du milieu marin artificiel « Instant Ocean » retrouvé au Biodôme. La composition exacte d'un litre du milieu « Instant Ocean » pour co-culture est :

Mélange « Instant Ocean » -----	15 g
NaNO <sub>3</sub> -----	1,214 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (en solution 32,67 g/L)-----	2,5 ml
Solution d'éléments traces -----	1 ml
Eau distillée -----	1000 ml

Le mélange d'eau salée pour aquarium « Instant Ocean » est acheté commercialement et sa composition exacte est donc inconnue (« Instant Ocean » est le nom du fournisseur).

La solution d'éléments traces est spécifique au milieu « Instant Ocean »; un litre de la solution est composé de :

FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O -----	0,9 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O -----	0,035 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O -----	0,202 g
Eau distillée -----	1000 ml

Une fois que le milieu est complet, le pH a été ajusté entre 7,8 et 8 et autoclavé à 121°C pendant au moins 15 minutes. Avant l'utilisation, 0,1 ml de vitamine B<sub>12</sub> (0,1 mg/ml) et 0,3 ml de méthanol ont été ajoutés. La quantité de nitrate ajoutée au milieu varie selon les besoins de l'expérience et les connaissances acquises lors de la recherche. Ces différences sont indiquées où elles s'appliquent.

### **3.2.4. Milieux sous forme de géloses**

Chaque variété de milieu décrite ci-haut a été principalement utilisée sous forme liquide pour soutenir des populations de bactéries en suspension ou pour permettre la formation de biofilm sur supports adaptés. Cependant, ces milieux ont aussi été utiles sous forme de géloses en boîtes de Petri. Pour produire des géloses, la solution minérale (en concentration double) et la solution d'agar (3%) ont été autoclavées séparément, puis combinées avant d'être coulées dans les boîtes de Petri. La vitamine B<sub>12</sub> et le méthanol ont été ajoutés après l'autoclavage.

### **3.3. Préparation des cultures**

Puisque les souches JAM1 et NL23 ont des temps de croissance différents, la culture des bactéries a dû suivre un régime rigoureux. Une réserve à long terme de chaque souche bactérienne a été conservée à -80° C. À partir de celle-ci, des colonies distinctes ont été produites sur géloses; la croissance se déroulait sur une période d'environ 10 jours à 30°C, puis ces cultures étaient conservées à 4°C pour une période d'utilisation d'environ un mois. À partir de colonies distinctes, préférentiellement, des petits volumes (environ 15 ml) de culture liquide ont été préparés, ce qui nécessite de 2 à 3 jours d'incubation. Ces cultures ont à leur tour été conservées à 4° C pour une période d'utilisation de 1-2 semaines. Également, ces cultures ont été utilisées pour créer les cultures en plus gros volumes (variables selon les besoins de l'expérience) qui serviront d'inoculum pour les expériences elles-mêmes. Par exemple, ajouter 0,6 ml de culture liquide à 10 ml de milieu optimal frais a permis la croissance jusqu'à densité maximale de la souche JAM1 en 24h et de la souche NL23 en 40h. Dans les cas où l'expérience envisagée implique une co-culture, les temps d'ensemencement ont été planifiés pour que la densité maximale soit atteinte en même temps pour les deux souches au début de ladite expérience.

### **3.3.1. Ensemencement**

À l'ensemencement, la densité optique des cultures bactériennes servant d'inoculum a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm (DO600). De cette façon la concentration de la biomasse a pu être ajustée à une valeur qui était toujours la même pour chaque expérience; dans ce cas le DO600 visé était de 0,1 dans la culture expérimentale. Donc, dans le cas d'une co-culture, chaque souche individuelle devait contribuer un DO600 de 0,1 dans la co-culture expérimentale au temps initial. Ceci a permis une certaine constance dans le processus expérimental qui a évité que les concentrations initiales de bactéries affectent le résultat d'une expérience. De plus, dans les cas où un changement de milieu a eu lieu au moment de l'ensemencement (par exemple, une co-culture où chaque bactérie passe d'un milieu optimal à un milieu accommodant les deux souches), les cultures de l'inoculum ont dû d'abord être centrifugées pour en débarrasser le milieu initial (8000 rpm, 10 minutes, 25°C, deux fois).

### **3.3.2. Conditions de culture**

Les bactéries ont été cultivées en conditions aérobies ou anaérobies. Les cultures aérobies ont été faites en flacons Erlenmeyer ou en plaques multi-puits, selon le besoin, et ont requis de l'agitation constante (entre 60 et 100 rpm) pour faciliter la circulation d'oxygène dans le milieu. Les cultures anaérobies ont été effectuées dans des fioles de borosilicate dans lesquelles l'oxygène a été évacué à l'aide d'azote gazeux (Fig 3.2). Dans ces fioles, l'échantillonnage a été rendu possible grâce à un bouchon en butyle dans lesquels peuvent être insérés des aiguilles. Dans tous les cas, les cultures ont été incubées à une température constante de 30° C.



**Figure 3.2 : Exemple de culture en anaérobiose**

Une fiole fermée hermétiquement pour culture de bactéries en conditions anaérobies. Une culture comme celle-ci contient typiquement 30 ml de milieu liquide et est incubée à 30°C avec seringue dans le bouchon en butyle.

### **3.4. Récolte de données**

Pour prendre un échantillon, la culture a été agitée pour assurer une distribution égale des cellules et donc de la concentration dans le liquide. En anaérobiose, une seringue a été insérée dans le bouchon de butyle scellant la fiole, et au moins 1 ml a été extrait. Une fois que la mesure de DO600 a été prise avec le spectrophotomètre, l'échantillon a été conservé à -20°C dans le but d'effectuer d'autres tests (principalement de la chromatographie ionique).

### **3.4.1. Spectrophotométrie**

Pour récolter des données utiles sur ces cultures, des suivis de croissances ont été effectués avec plusieurs combinaisons de conditions. En conditions aérobies, le suivi a été effectué uniquement par mesures de DO600 à l'aide d'un spectrophotomètre, ou par mesures de turbidité à l'aide d'un appareil automatisé d'analyse de croissance (« Bioscreen »). L'avantage principal d'un appareil automatisé a été la possibilité de prendre des mesures simultanément pour chaque échantillon de façon rapide, ce qui a permis de récolter des données à des intervalles de temps plus rapprochés. En conditions anaérobies, le suivi a également été effectué par mesures de DO600 (manuelles seulement).

### **3.4.2. Chromatographie ionique**

La chromatographie ionique a été utilisée pour quantifier la consommation de nitrate et de nitrite dans le milieu par les deux souches bactériennes. Les échantillons ont été préalablement centrifugés (13000 rpm, 2 min.) dans des microtubes de type Eppendorf pour en retirer les bactéries. Une fois que les cellules se retrouvaient au fond du tube, au moins 0,5 ml du surnageant de chaque échantillon a été prélevé pour être analysé par chromatographie ionique.

L'appareil utilisé pour la quantification du nitrate et du nitrite était le 850 Professional IC de Metrohm, muni d'une colonne Metrosepp A supp 5 de dimensions 250 X 4 mm. La colonne a été maintenue à 35°C durant l'opération. Les mesures de nitrate et de nitrite ont été effectuées par UV. L'éluant utilisé était composé de 3.2 mmol/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et de 1 mmol/L de NaHCO<sub>3</sub>. Le débit était de 0,7 ml/min.

### **3.4.3. Extraction d'ADN**

La biomasse d'intérêt (en suspension liquide) a d'abord été centrifugée afin d'en retirer le milieu de culture. Les cellules résultantes ont ensuite été dispersées dans une solution tampon TEN (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA; 1 M NaCl) dans un microtube de type Eppendorf de 1,5 mL contenant 0,2 mg de billes de verres de 0,1

mm. Ce mélange a subséquentement été placé dans un homogénéisateur pour effectuer un broyage : rapidement agiter les cellules en suspension pour qu'elles éclatent contre les billes de verre. L'appareil utilisé était le FastPrep-24 de MPBio. L'ADN a été extrait à l'aide d'un mélange de phénol, de chloroforme et d'alcool isoamylique (25 : 24 : 1). L'ADN a pu ensuite être précipité dans une mixture (9 : 1) d'éthanol froid (90%) et d'acétate de sodium. Le tout a été centrifugé, et le précipité a été dissous dans l'eau. L'ADN a été quantifié par spectrophotométrie, ce qui a également donné une indication de la pureté de la solution obtenue. Le spectrophotomètre utilisé lors de ces études était le Nanodrop 2000 de Thermo Scientific.

#### **3.4.4. qPCR**

Dans le cadre de ces études, l'application principalement intéressante de la technique est la quantification de copies de gènes particuliers présents dans une co-culture. Puisque les souches bactériennes étudiées ont chacune leur propre version unique de la nitrate réductase dont la séquence génétique est connue, il a été possible d'utiliser le qPCR pour mesurer la quantité relative des bactéries dans le mélange. Les nitrate réductases en question sont la nitrate réductase périplasmique de la souche NL23 (gène *napA*) et une des deux nitrate réductases membranaires de la souche JAM1 (gène *narG1*). Donc, par exemple, si une analyse qPCR indique que le gène *narG1* représente 90% des copies de gènes de nitrate réductase (*narG1* + *napA*) dans l'échantillon, cela indique que la souche JAM1 comptait neuf fois plus de cellules que la souche NL23 dans la co-culture.

La technique de qPCR utilisée lors de ces études était le TaqMan. Dans cette variation du qPCR, deux courtes séquences de nucléotides servent d'amorces, tandis qu'une autre courte séquence sert de sonde. Cette dernière est conçue pour s'apparier à un endroit entre les deux amorces. À la sonde sont fixés un fluorochrome et un « quencher ». La fluorescence émise par le fluorochrome est dissimulée par le « quencher » lorsque les deux sont à proximité. La polymérase *Taq* se met alors à ajouter des nucléotides aux amorces, et quand elle arrive à la

sonde, celle-ci est enlevée est dégradée, libérant le fluorochrome qui émet alors une fluorescence quantifiable. Le TaqMan a été utilisé dans ce projet à cause de son coût abordable comparé au SYBR green, le protocole qui était utilisé précédemment dans le laboratoire. Il a aussi été noté que des problèmes de dimères d'amorces sont aussi plus fréquents avec le SYBR green. D'ailleurs, il a été déterminé que le TaqMan génère des résultats comparables au SYBR green (Blais, 2014).

L'instrument utilisé pour effectuer les qPCR était le Rotor-Gene 6000 de Corbett Life Sciences (Qiagen). Chaque microtube (tubes spécialisés 0,1 ml avec couvercles de Qiagen) contenait 25µl d'un mélange préparée en laboratoire (voir tableau 3.1). L'ADN ajouté au mélange a été obtenu grâce à la méthode d'extraction décrite dans la section 3.4.3. Le programme PCR était :

- i) 5 minutes à 95°C
- ii) 40 cycles des étapes suivantes :
  - (1) 15 secondes à 95°C
  - (2) 20 secondes à 55°C
  - (3) 30 secondes à 65°C

**Tableau 3.1 : composition du mélange dans chaque réaction de qPCR**

Composante	Volume par réaction
H <sub>2</sub> O	14,88 µl
Tampon 10X taq « hot start »	2,5 µl
BSA (20 µg/µl)	0,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Amorce (f) (10 mM)	0,5 µl
Amorce (r) (10 mM)	0,5 µl
Sonde TaqMan (5mM)	0,5 µl
Taq polymérase « hot start » (5 U/µl)	0,125 µl
ADN génomique (dilué 1/5)	5 µl

**Tableau 3.2 : détails sur la technique du qPCR**

<b>souche</b>	JAM1	NL23
<b>gènes</b>	<i>narG1</i>	<i>napA</i>
<b>Longueur du fragment</b>	157 pb	130 pb
<b>amorces</b>	CCCTGTACGCTCGATACCA (f)	GGCAATGTGGGTGGAAAAGG (f)
	GCCAGTACGCAAGGTTAAGC (r)	GCGCTTCGAAAACCTCCATGA (r)
<b>Sondes TaqMan</b>	CGCAATGTGCCAGTACGCAAGGT	CACGCATTTCTGGCACCAACTCGT
<b>fluorochrome</b>	FAM (6-carboxyfluoresceïne)	
<b>« quencher »</b>	BHQ-1 (« Black Hole Quencher »)	
<b>Température d'hybridation</b>	55°C	

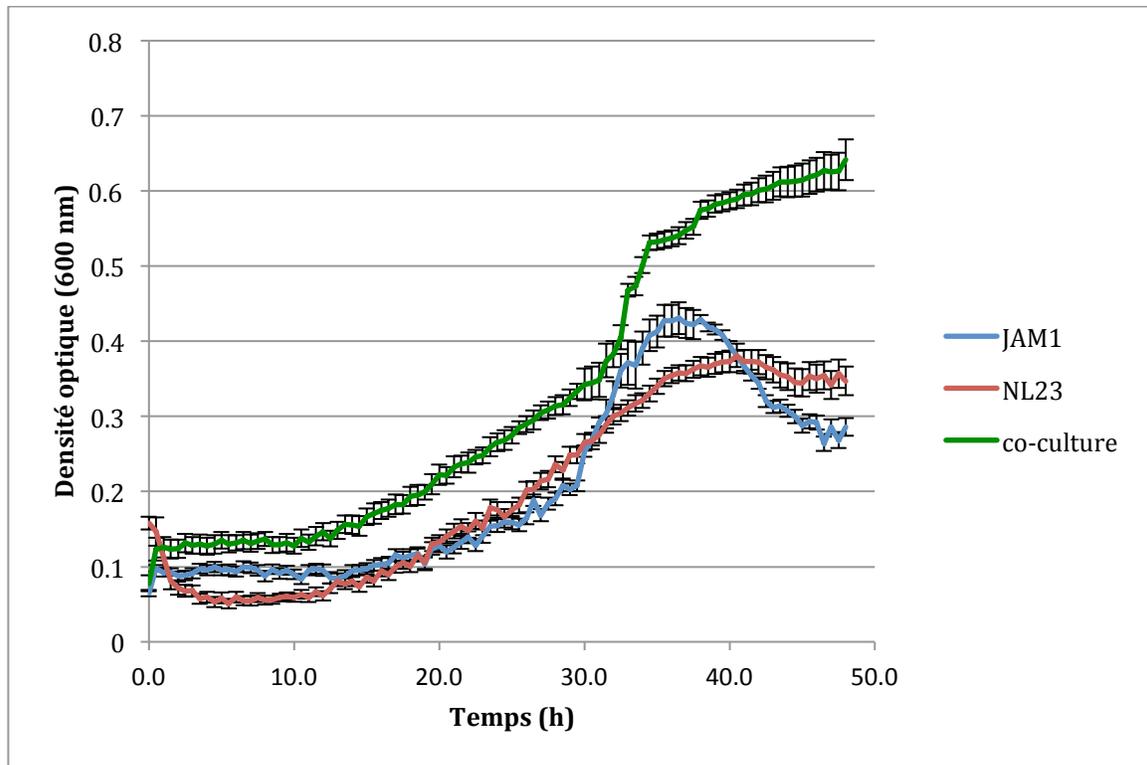
## **4. Résultats**

### **4.1. Détermination des conditions optimales de culture**

Le premier volet du projet était constitué d'expériences visant à déterminer quelles conditions de culture permettraient la meilleure croissance des souches JAM1 et NL23. Une grande partie du travail à cet égard était déjà complété par des études préliminaires. En effet, la plupart des paramètres de base, incluant la température, le pH, la salinité, et le milieu de croissance avaient été établis avant le début des travaux présentés dans ce mémoire. Les conditions optimales qu'il restait à déterminer impliquaient principalement les concentrations de nitrate et les proportions des bactéries en co-cultures.

#### **4.1.1. Suivi de croissance préliminaire en conditions aérobies**

Ces premiers suivis de croissance avaient pour but de valider le choix de milieu de croissance pour les co-cultures des souches JAM1 et NL23 ainsi que de donner un aperçu des courbes de croissance typiques de celles-ci. Les souches JAM1 et NL23 ont été cultivées en conditions aérobies ou anaérobies, soit sous forme de cultures pures ou en co-cultures. Le milieu commercial d'eau de mer « Instant Ocean » a été utilisé pour ces premières expériences en présence de près de 40 mM d'azote sous forme de nitrate. Il a été déterminé auparavant que le milieu « Instant Ocean » coupé de moitié (15 g/L, au lieu de 30 g/L) permettait la croissance à la fois des souches JAM1 et NL23, la souche NL23 étant très sensible à la concentration en sel.



**Figure 4.1 : Croissance en conditions aérobies (Instant Ocean 15 g/L)**

Les souches JAM1 et NL23, cultivées en cultures pures ou en co-cultures, ont été incubés pendant 48 heures dans le milieu Instant Ocean ajusté à 15 g/L. Les mesures de turbidité ont été effectuées automatiquement à chaque demi-heure par l'instrument Bioscreen. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de 8 cultures.

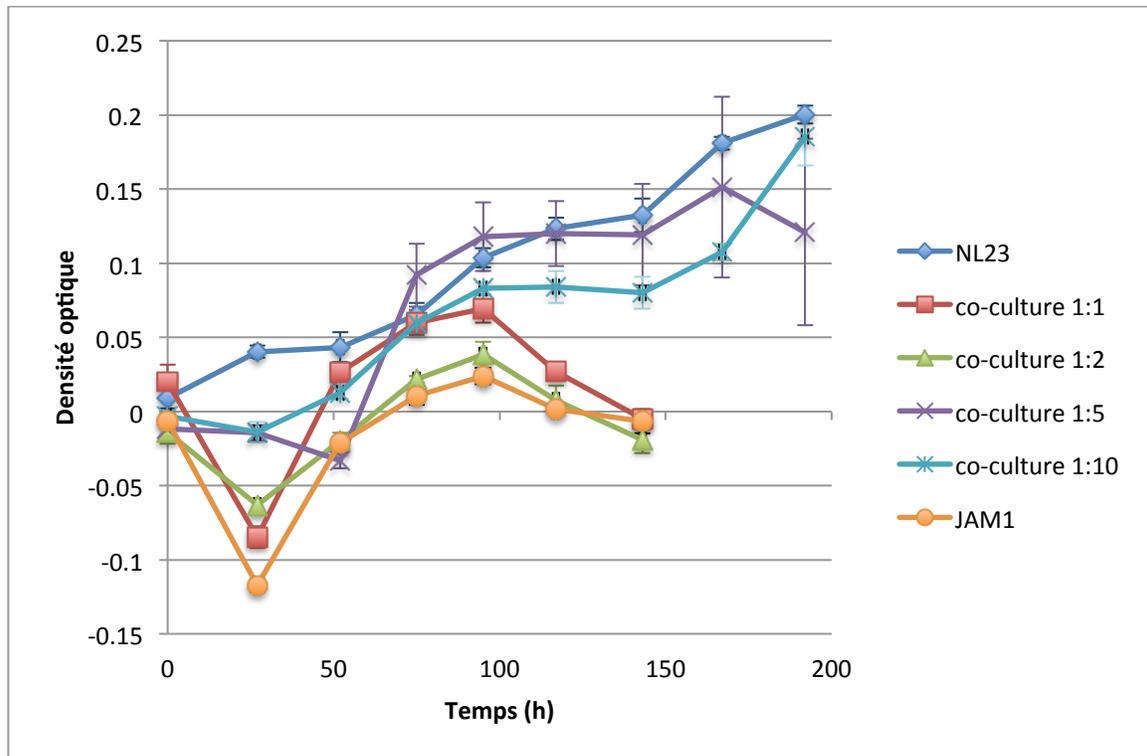
Premièrement, des cultures pures des souches NL23 et JAM1 et des co-cultures de celles-ci ont été suivies par la mesure de turbidité à l'aide d'un appareil Bioscreen. Une mesure a été effectuée automatiquement à chaque heure pendant une période de deux jours complets. Les résultats ont confirmé la pertinence d'utiliser le milieu « Instant Ocean » pour les co-cultures (Fig 4.1). Les deux souches ont eu une croissance appréciable en cultures pures, tandis que les co-cultures ont atteint une turbidité notamment plus élevée que les deux cultures pures. Ceci pourrait être expliqué par une coopération entre les deux souches JAM1 et NL23.

#### 4.1.2. Suivi de croissance en conditions anaérobies

Avant le début du projet, il était déjà connu que l'activité et la croissance des souches NL23 et JAM1 diffèrent significativement en anaérobiose. En particulier, les

nitrate réductases de la souche JAM1 sont beaucoup plus efficaces, et celle-ci démontre une croissance initiale plus élevée (Martineau *et al.*, 2015, Mauffrey *et al.*, 2015). Les premiers suivis de croissance en conditions anaérobies ont donc été faits avec différents ratios d'inoculum pour déterminer les conditions d'ensemencement les plus favorables. Les souches NL23 et JAM1 requièrent la présence de nitrate et ses dérivées comme source d'accepteurs d'électrons pour croître en anaérobiose. Dans leurs milieux optimaux respectifs, une quantité initiale de nitrate optimale est d'environ 40 mM (Céline Villeneuve, 2012)(données non-publiées pour la souche NL23), donc cette concentration initiale a été choisie.

Les suivis de croissance ont été effectués sur une série de co-cultures avec des variations dans le ratio entre les deux souches bactériennes. L'expérience, qui comptait également comme témoins les souches NL23 et JAM1 en cultures pures, a été effectuée avec des co-cultures de ratios (JAM1 : NL23) 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, et 1 : 10. Ces ratios réfèrent uniquement aux quantités relatives des souches au moment de l'ensemencement, tels que mesurés par DO600. La croissance étant beaucoup plus lente en ces conditions, et à cause de considérations pratiques, des mesures de DO600 ont été prises manuellement une fois par jour jusqu'à complétion du suivi. L'appareil « Bioscreen » ne permet pas les cultures en conditions anaérobies. Les échantillons ainsi recueillis ont également servi pour la quantification de nitrate et de nitrite. Les échantillonnages journaliers ont été effectués sur une période de près de 200 heures, après quoi les cultures ont été conservées pour des études par qPCR.



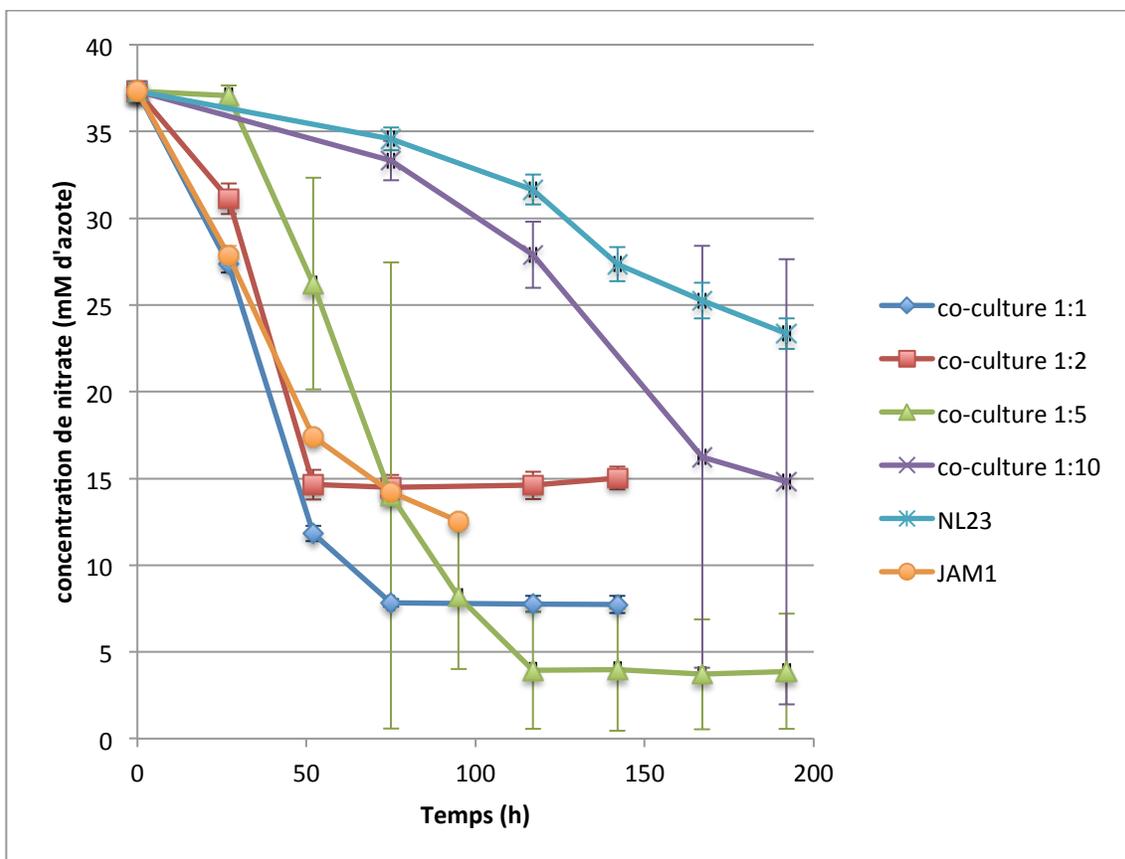
**Figure 4.2: La croissance des co-cultures des souches NL23 et JAM1 en conditions anaérobies**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 ont été cultivées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L jusqu'à l'atteinte du plateau de croissance ou 200 heures. Les co-cultures avaient des ratios d'inoculum différents. Chaque point dans le graphe représente le DO600 moyen de 3 cultures, mesuré par spectrophotométrie.

Le suivi du DO600 est souvent peu informatif dans le cadre d'une expérience en conditions anaérobies. Ceci est dû aux caractéristiques de la croissance de la souche JAM1. Cette dernière exhibe des DO600 trompeurs à cause de la formation de floc, des agrégations de cellules visibles à l'œil nu, et aussi à cause d'un "éclaircissement" du milieu Instant Ocean, qui est normalement trouble. Effectivement, après normalisation avec le DO600 du milieu non-inoculé, il est commun de recueillir des DO600 à valeurs négatives, ainsi que de d'obtenir des valeurs très différentes pour le même échantillon. Il est donc peu probable qu'une mesure du DO600 reflète ce qui se passe réellement au sein d'une culture simple de la souche JAM1 ou d'une co-culture. Pour cette raison, le suivi de DO600 sert

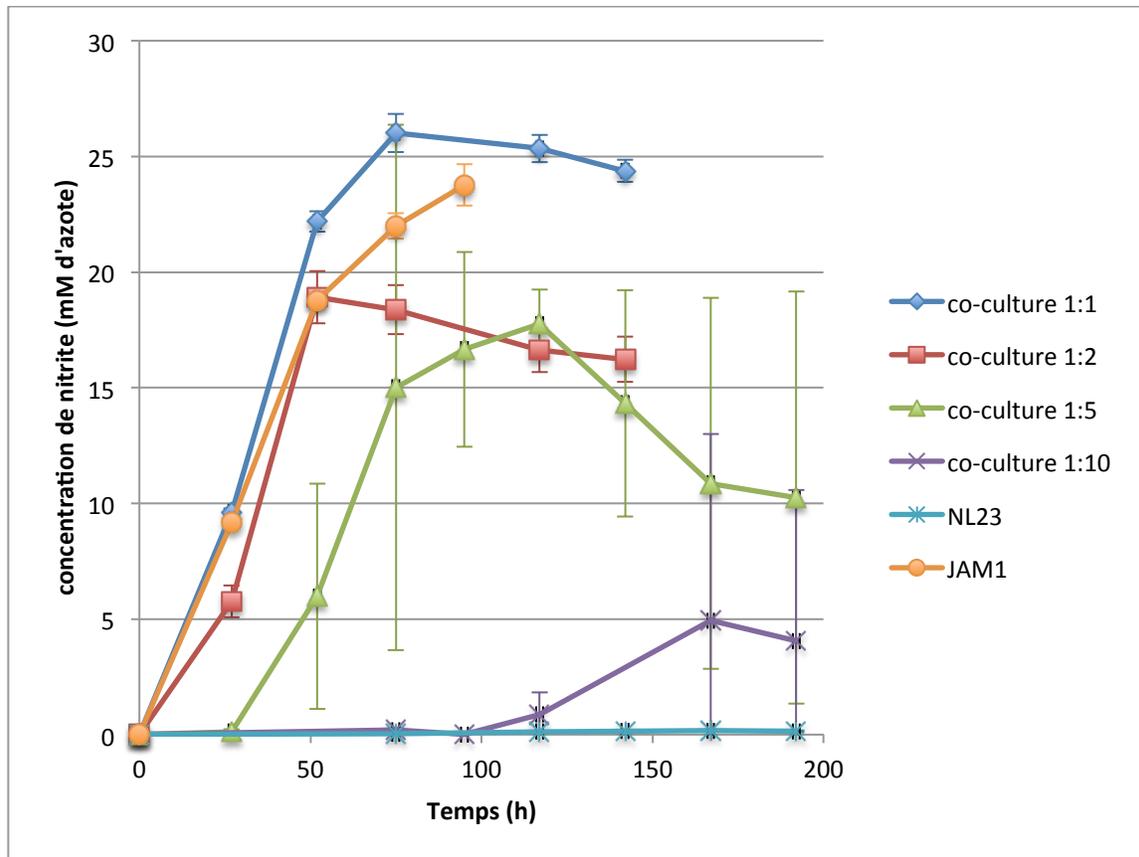
principalement de méthode permettant d'observer qualitativement et rapidement le progrès de la croissance des bactéries.

Dans le cas de cette expérience, cependant, il est intéressant de noter que les co-cultures avec un ratio plus égal (les co-cultures 1:1 et 1:2) ont suivi une courbe de croissance qui ressemble beaucoup aux cultures pures de la souche JAM1, tandis que les autres co-cultures ont suivi une courbe de croissance qui ressemble à celle des cultures pures de la souche NL23 (Fig 4.2). Ceci pourrait refléter simplement que le comportement type de la souche JAM1 devient moins visible dans les données lorsque cette dernière est moins abondante dans les co-cultures. Toutefois, il est aussi possible qu'une densité plus importante des deux souches ont pu se développer en co-cultures lorsque l'inoculum de départ de souche JAM1 était moins important. Cette explication serait compatible avec l'hypothèse du départ. Pour approfondir la compréhension de la situation, il a fallu investiguer au niveau de la consommation du nitrate et du nitrite (Fig 4.3 et 4.4).



**Figure 4.3: Consommation de nitrate des co-cultures des souches NL23 et JAM1 en conditions anaérobies**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 ont été cultivées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L jusqu'à l'atteinte du plateau de croissance ou 200 heures. Les co-cultures avaient des ratios d'inoculum différents. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de concentration de nitrate dans 3 cultures, mesurée par chromatographie ionique.



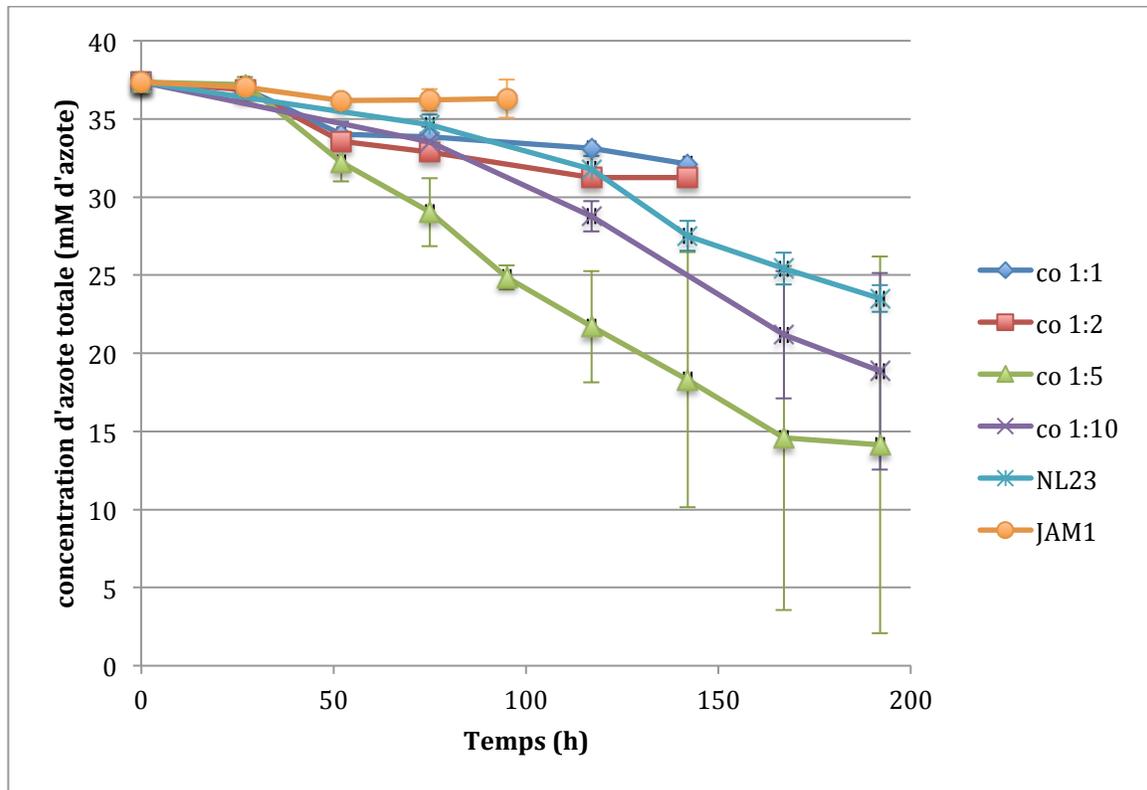
**Figure 4.4: concentration de nitrite dans les co-cultures des souche NL23 et JAM1 en conditions anaérobies**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 ont été incubées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L jusqu'à l'atteinte du plateau de croissance ou 200 heures. Les co-cultures avaient des ratios d'inoculum différents. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de concentration de nitrite dans 3 cultures, mesurée par chromatographie ionique.

Ce qui est immédiatement évident dans le graphe de réduction de nitrate (fig. 4.3) est que plus la concentration de la souche JAM1 est élevée initialement dans les co-cultures, plus le taux de réduction du nitrate est rapide. La deuxième observation qu'on puisse faire est qu'aucune des co-cultures ne parvient à réduire complètement le nitrate. Dans le cas des co-cultures à concentrations élevées en souche JAM1, la consommation du nitrate s'arrête brusquement après environ 75 heures avec 5-15 mM d'azote résiduel. Quant aux co-cultures moins abondantes en souche JAM1, il semble qu'elles soient trop lentes pour réduire entièrement le nitrate avant 200 heures, la durée de l'expérience. Il n'est pas clair dans les données

recueillies si la réduction aurait pu continuer jusqu'à épuisement des réserves de nitrate.

Le suivi de la consommation du nitrite corrobore l'hypothèse : Les co-cultures 1 : 1 et 1 :2 ont accumulé le nitrite rapidement pendant 50-100 heures avant de plafonner (entre 18 et 26 mM d'azote) indéfiniment. Les co-cultures 1 : 5 ont atteint un niveau de nitrite maximum (environ 17 mM d'azote) à environ 120 heures pour redescendre vers la fin du suivi. Finalement, les co-cultures 1 : 10 n'ont démontré qu'une petite accumulation de nitrite tard dans l'expérience (170 heures). Les temps où les points maximaux d'accumulation de nitrite sont atteints semblent correspondre à peu près à ceux d'arrêt d'activité de réduction de nitrate.



**Figure 4.5: Concentration d'azote totale dans les co-cultures des souches NL23 et JAM1 en conditions anaérobies**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 ont été cultivées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L jusqu'à l'atteinte du plateau de croissance ou 200 heures. Les co-cultures avaient des ratios d'inoculum différents. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de concentration d'azote total dans 3 cultures. L'azote total est calculé à partir des concentrations de nitrate et de nitrite et correspond à la combinaison de ces deux mesures.

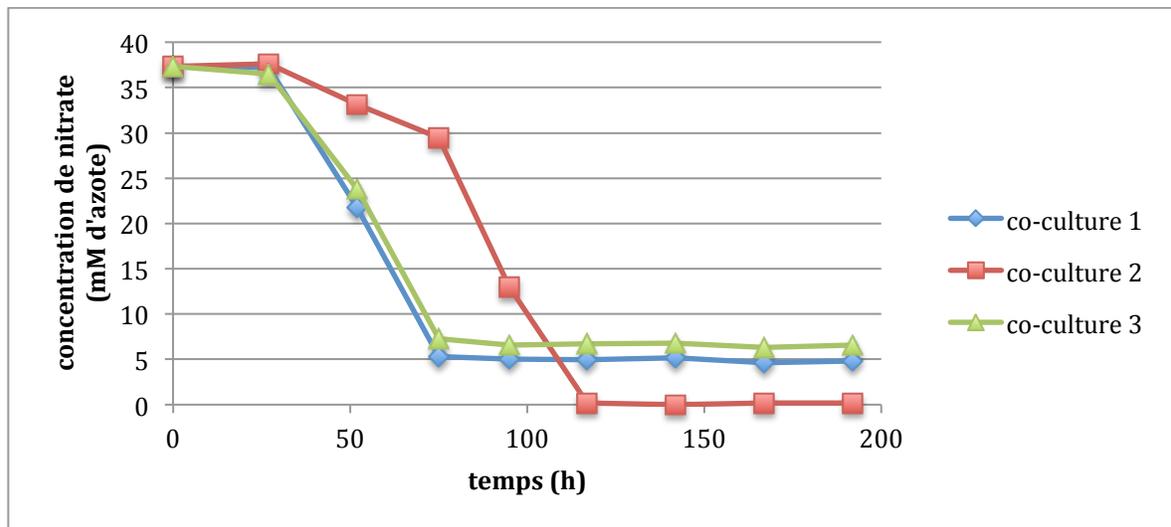
L'aspect qui reste le plus intéressant est le suivi de consommation d'azote total; c'est-à-dire la capacité des co-cultures à consommer le nitrate et le nitrite (Fig. 4.5). Pour les données telles que présentées ici, l'azote total est calculé simplement par l'addition des concentrations de nitrate et de nitrite. Le calcul de l'azote total est utile parce qu'il permet de combiner la réduction du nitrate et celle du nitrite pour visualiser la performance totale des co-cultures, ce qui est plus informatif dans le cadre de la dénitrification complète. Par exemple, en conditions optimales, la souche JAM1 en cultures pures exhibe une réduction très rapide du nitrate mais aucune réduction de l'azote total (ce qui est normal, étant donné qu'elle ne possède aucun gène de réduction du nitrite).

Pour la présente expérience, les co-cultures 1 : 5 ont démontré la plus grande consommation d'azote, suivi des co-cultures 1 : 10. Il faut noter que ces deux co-cultures ont consommé plus rapidement le nitrate et le nitrite que les cultures pures de la souche NL23, ce qui pourrait être un indice de la coopération bénéfique des deux souches dans ces co-cultures. Par contre, les co-cultures 1 : 1 et 1 : 2 ont été moins efficaces que la souche NL23 en cultures pures. Aucune des co-cultures n'a démontré une réduction complète de l'azote totale avant 200 heures de suivi de croissance.

Malgré la croissance réussie des deux souches en cultures pures et en co-cultures, ces suivis ont soulevé une problématique importante : les co-cultures ne sont jamais arrivées à réduire complètement le nitrate leur étant fourni au départ, ni l'azote total. En effet, les co-cultures à ratios plus inégaux ont simplement démontré une réduction très lente du nitrate. Les co-cultures à ratios plus égaux se sont comportées de façon presque identique à la souche JAM1 en culture pure : une réduction rapide (mais incomplète) du nitrate suivi d'une stagnation d'activité dénitrifiante, incluant une accumulation de nitrite, ceci en dépit de la présence de la souche NL23, qui a la capacité de réduire ce nitrite. Une explication probable a donc été formulée : étant donné que le nitrite est particulièrement toxique aux organismes vivants (De Roos *et al.*, 2003), son accumulation en importante concentration inhiberait la croissance de la souche NL23. Comme la souche JAM1 est beaucoup plus rapide pour réduire le nitrate que la souche NL23, il est probable que celle-ci ait été responsable d'une accumulation de nitrite supérieure à ce que la souche NL23 peut supporter. En conséquence, si l'abondance du nitrite pouvait être limitée, la souche NL23 pourrait avoir la chance de réduire ce nitrite à mesure qu'il soit produit.

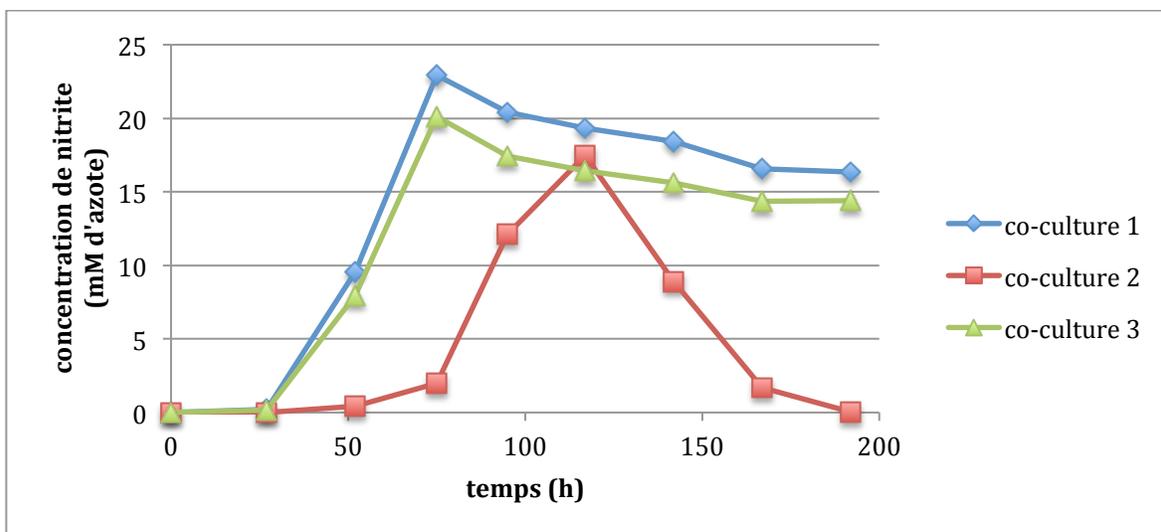
### 4.1.3. Variations problématiques

Tous les suivis de croissance précédents ont été réalisés en triplicata. Les données représentées dans les courbes de croissance sont la moyenne des valeurs obtenues pour les trois échantillons, tous recueillis en même temps. Cependant, des grandes variations de valeurs au sein des échantillons pour les co-cultures 1 : 5 et 1 : 10 ont causé des écarts élevés dans leurs moyennes, ce qui est visible dans le graphe sous forme de très grandes barres d'erreurs (Fig. 4.2 à 4.5). Ce problème méritait d'être examiné de plus près; donc chaque réplicat a été analysé de façon individuelle.



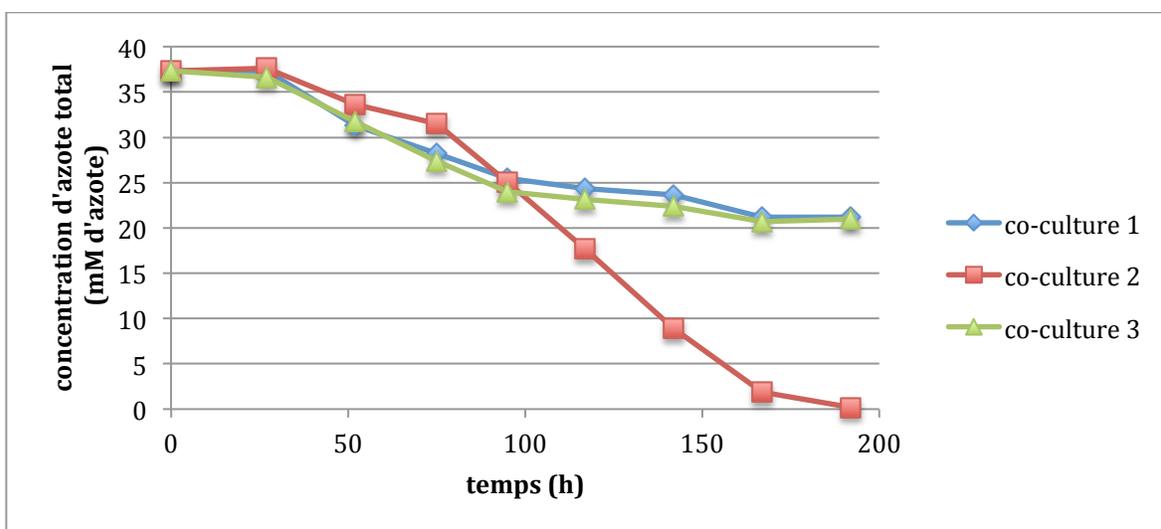
**Figure 4.6 : Consommation de nitrate pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 5**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 dont le ratio initial d'inoculum était de 1 : 5 (JAM1 : NL23) ont été cultivées pendant près de 200 heures. Chaque point dans le graphe représente une concentration de nitrate telle que mesurée par chromatographie ionique. Chaque courbe dans le graphe représente une culture. Les désignations des co-cultures individuelles dans la légende sont arbitraires; chaque culture a reçu le même traitement lors de l'expérience.



**Figure 4.7 : Concentration de nitrite pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 5**

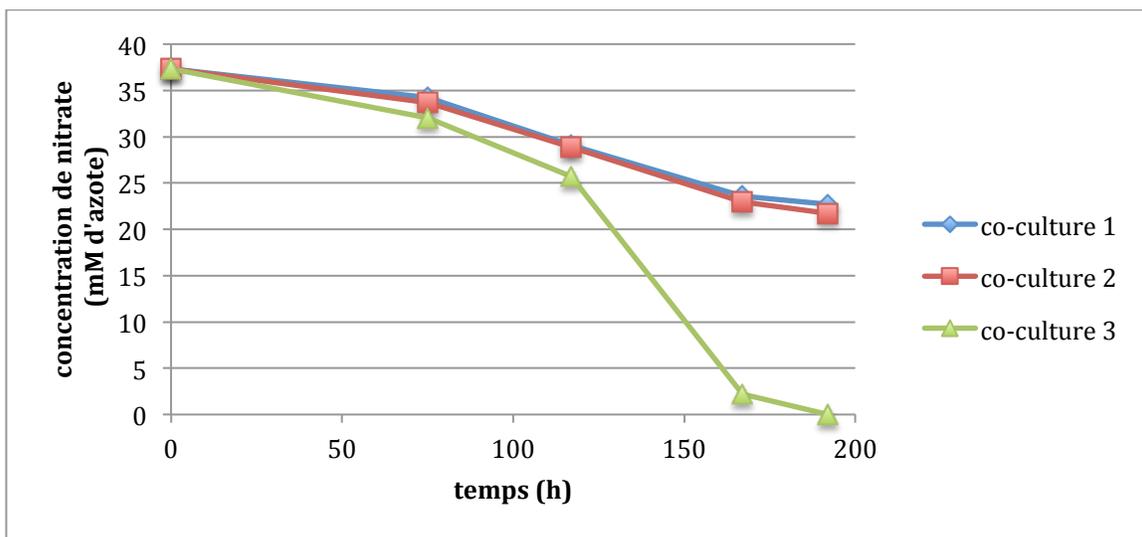
Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 dont le ratio initial d'inoculum était de 1 : 5 (JAM1 : NL23) ont été cultivées pendant près de 200 heures. Chaque point dans le graphe représente une concentration de nitrite telle que mesurée par chromatographie ionique. Chaque courbe dans le graphe représente une culture. Les désignations des co-cultures individuelles dans la légende sont arbitraires; chaque culture a reçu le même traitement lors de l'expérience.



**Figure 4.8 : Concentration d'azote total pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 5**

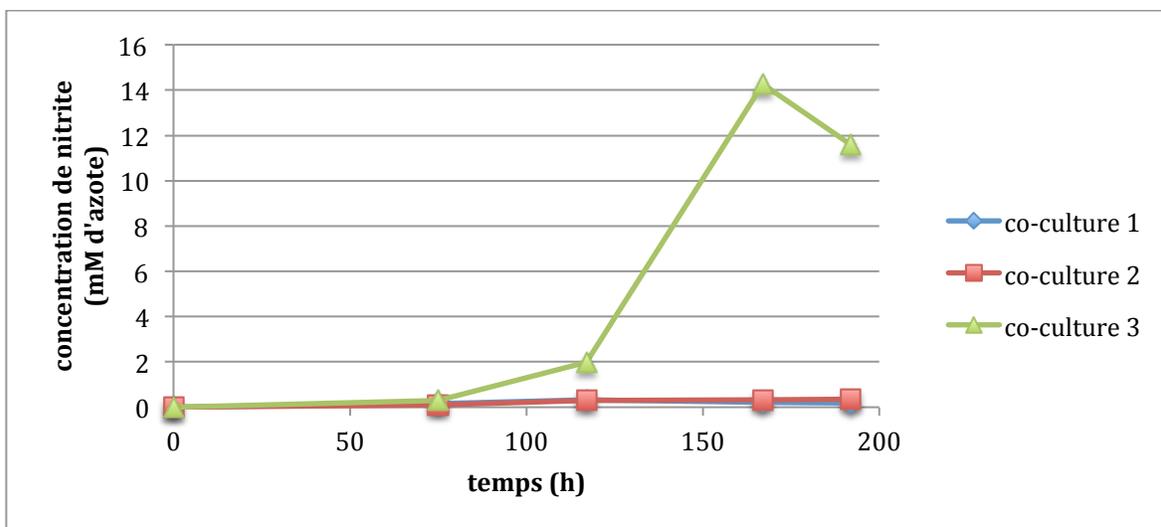
Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 dont le ratio initial d'inoculum était de 1 : 5 (JAM1 : NL23) ont été cultivées pendant près de 200 heures. Chaque point dans le graphe représente une concentration d'azote total. L'azote total est calculé à partir des concentrations de nitrate et de nitrite et correspond à la combinaison de ces deux mesures. Chaque courbe dans le graphe représente une culture. Les désignations des co-cultures individuelles dans la légende sont arbitraires; chaque culture a reçu le même traitement lors de l'expérience.

Dans le cas des co-cultures 1 : 5, deux des trois cultures ont suivi une courbe de réduction de nitrate quasiment identique qui rappelle le comportement de la souche JAM1: une réduction rapide du nitrate suivi d'un arrêt brusque à 5 mM d'azote après environ 75 heures de croissance (Fig. 4.6). L'autre culture a été plus lente dans la réduction totale du nitrate. D'ailleurs, cette dernière est la seule des trois qui finit par également réduire complètement le nitrite (Fig. 4.7) et à accomplir une consommation complète de l'azote total (Fig. 4.8). Le nitrite s'y est aussi accumulé plus lentement. Il semblait donc que la rapidité à laquelle le nitrite s'accumule pourrait effectivement jouer un rôle dans la performance d'une co-culture.



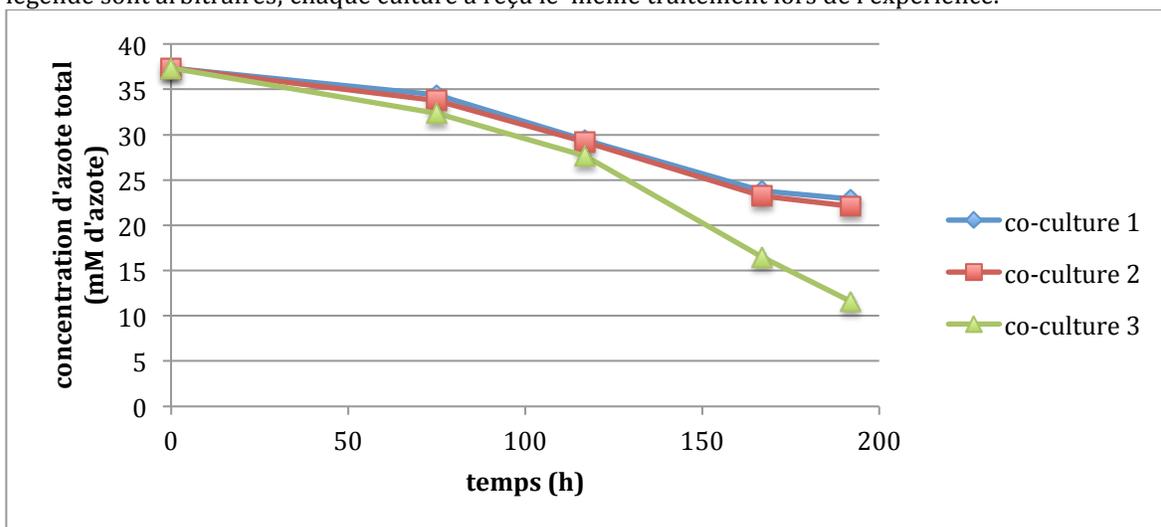
**Figure 4.9 : Consommation de nitrate pour chaque réplicat des co-cultures 1 : 10**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 dont le ratio initial d'inoculum était de 1 : 10 (JAM1 : NL23) ont été cultivées pendant près de 200 heures. Chaque point dans le graphe représente une concentration de nitrate telle que mesurée par chromatographie ionique. Chaque courbe dans le graphe représente une culture. Les désignations des co-cultures individuelles dans la légende sont arbitraires; chaque culture a reçu le même traitement lors de l'expérience.



**Figure 4.10 : Concentration de nitrite pour chaque répliat des co-cultures 1 : 10**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 dont le ratio initial d'inoculum était de 1 : 10 (JAM1 : NL23) ont été incubées pendant près de 200 heures. Chaque point dans le graphe représente une concentration de nitrite telle que mesurée par chromatographie ionique. Chaque courbe dans le graphe représente une culture. Les désignations des co-cultures individuelles dans la légende sont arbitraires; chaque culture a reçu le même traitement lors de l'expérience.

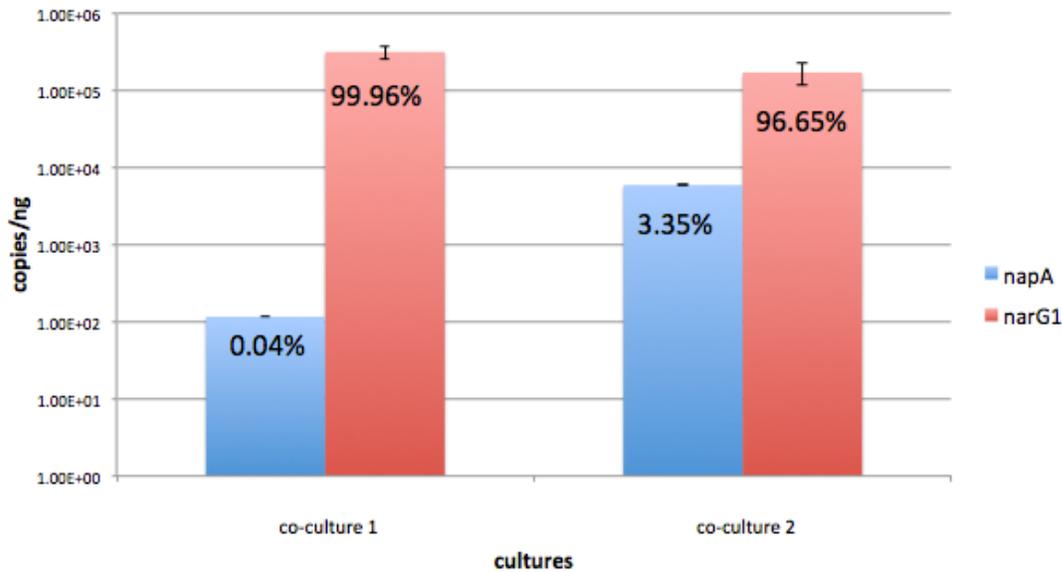


**Figure 4.11 : Concentration d'azote total pour chaque répliat des co-cultures 1 : 10**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 dont le ratio initial d'inoculum était de 1 : 10 (JAM1 : NL23) ont été cultivées pendant près de 200 heures. Chaque point dans le graphe représente une concentration d'azote total. L'azote total est calculé à partir des concentrations de nitrate et de nitrite et correspond à la combinaison de ces deux mesures. Chaque courbe dans le graphe représente une culture. Les désignations des co-cultures individuelles dans la légende sont arbitraires; chaque culture a reçu le même traitement lors de l'expérience.

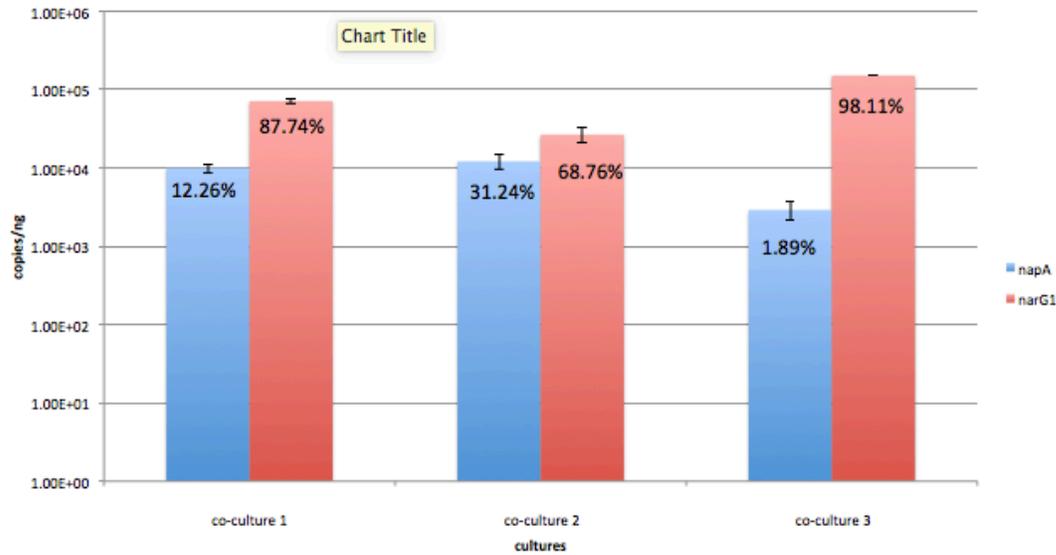
Dans le groupe des co-cultures 1 : 10, c'est le problème inverse qui s'est manifesté : seule une des co-cultures a pu réduire totalement le nitrate, tandis que les deux autres ont été trop lentes pour y arriver avant 200 heures. De plus, une augmentation de nitrite n'a été observée que dans la co-culture la plus efficace à partir d'environ 100 heures (Fig. 4.9 et 4.10). Malgré cette accumulation, cette dernière a démontré une réduction d'azote total légèrement plus rapide que les deux autres, mais qui n'a tout de même pas atteint 0 mM d'azote avant la fin du suivi (Fig. 4.11).

Pour lier ces résultats à la quantité relative des deux souches dans les co-cultures, des essais en qPCR ont été effectués. En visant des gènes qui sont propres à chaque espèce, il a été possible de quantifier l'abondance de chaque souche en pourcentage par rapport au nombre total de gènes détectés.



**Figure 4.12 : Quantités relatives des gènes *napA* et *narG1* dans les co-cultures 1 : 5**

Trois co-cultures des souches NL23 et JAM1 dont le ratio initial d'inoculum était de 1 : 5 (JAM1 : NL23) ont été cultivées pendant près de 200 heures. À la fin de ce suivi, la biomasse totale de chacune des cultures a été recueillie. L'ADN génomique de cette biomasse a ensuite été extrait et soumis à deux processus de qPCR : une pour quantifier l'abondance du gène *napA* et l'autre pour quantifier l'abondance du gène *narG1*. Les pourcentages sur les bandes représentent la proportion de chaque gène dans la quantité totale de gènes quantifiés (*napA* + *narG1*). Dans un cas particulier, la co-culture 3 a été accidentellement perdue lors de manipulations en laboratoire.



**Figure 4.13 : Quantités relatives des gènes *napA* et *narG1* dans les co-cultures 1 : 10**

Trois co-cultures des souches NL23 et JAM1 dont le ratio initial d'inoculum était de 1 : 10 (JAM1 : NL23) ont été cultivées pendant près de 200 heures. À la fin de ce suivi, la biomasse totale de chacune des cultures a été recueillie. L'ADN génomique de cette biomasse a ensuite été extraite et soumise à deux processus de qPCR : une pour quantifier l'abondance du gène *napA* et l'autre pour quantifier l'abondance du gène *narG1*. Les pourcentages sur les bandes représentent la proportion de chaque gène dans la quantité totale de gènes quantifiés (*napA* + *narG1*)

Les figures 4.12 et 4.13 illustrent pour chaque réplicat des co-culture 1 : 5 et 1 : 10 la composition en terme de proportion des souches NL23 (indiqué par le gène *napA*) et JAM1 (indiqué par le gène *narG1*). La co-culture 2 (1 : 5) qui a réduit le nitrate moins rapidement mais a pu réduire le nitrite complètement, a vu une proportion de la souche NL23 100 fois plus élevée (3.89%) que la co-culture 1 (1 : 5) (0,04%). Cette dernière n'a pu faire une réduction totale de l'azote total. Dans le cas des co-cultures 1 et 2 (1 : 10), la proportion de la souche NL23 était beaucoup plus élevé (12.26% et 31,24%). Ces co-cultures sont celles qui n'ont pas accumulé de nitrite. Dans le cas de la co-culture 3 (1 : 10), avec accumulation de nitrite, la proportion de la souche NL23 (1,89%) était de 6 à 16 fois moins élevé que les deux autres réplicats.

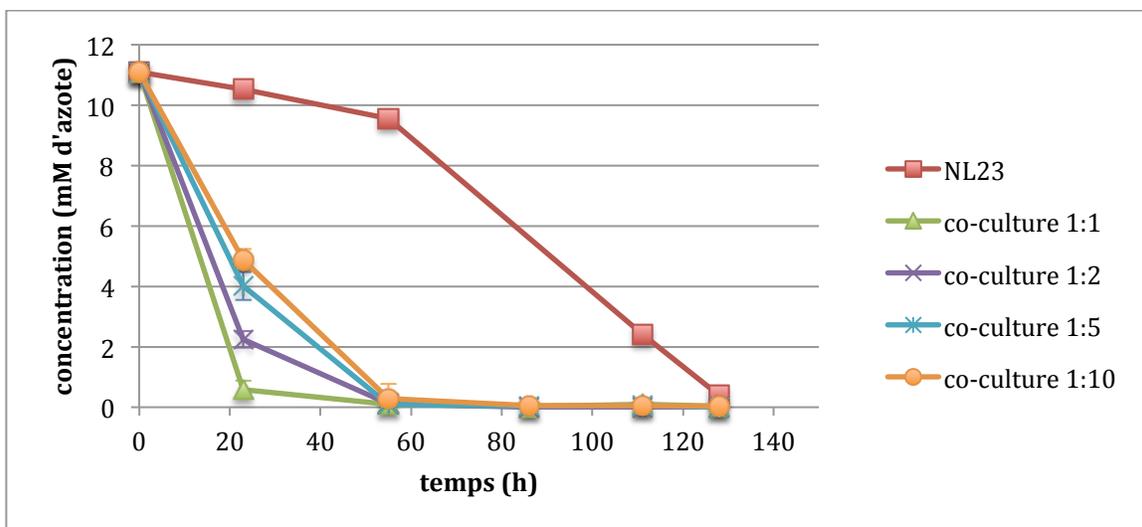
Les résultats suggèrent qu'une co-culture requiert un « juste milieu » de proportions des souches NL23 et JAM1 pour maximiser l'efficacité de la réduction

du nitrate et du nitrite tout en évitant la toxicité du nitrite. Malheureusement, il s'est avéré difficile d'obtenir ce parfait mélange de façon assez constante pour produire des résultats en triplicata, et la variabilité imprévisible des résultats a empêché le progrès du projet dans cette direction.

#### **4.1.4. Réduction de la quantité initiale de nitrate**

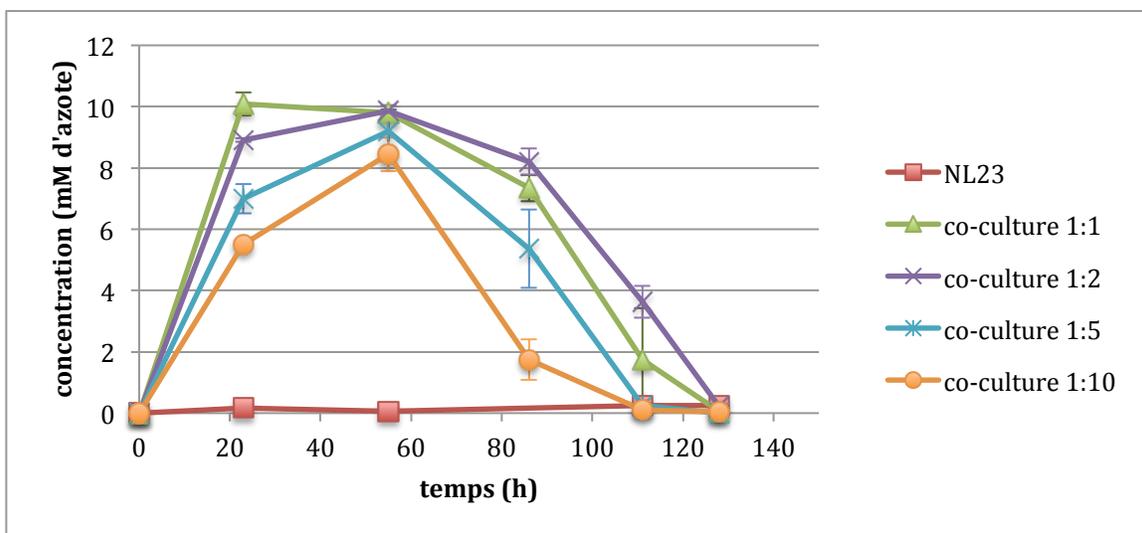
Une nouvelle stratégie a été établie pour contourner le problème d'accumulation de nitrite. L'idée était de diminuer la concentration initiale de nitrate dans le milieu « Instant Ocean » pour réduire l'accumulation maximale de nitrite. Dans les essais précédents (Auclair *et al.*, 2010), il semblait être possible pour les co-cultures de tolérer un certain niveau de nitrite (jusqu'à environ 15 mM d'azote) avant d'éprouver des difficultés. L'hypothèse a été émise qu'une accumulation de nitrite sous ce niveau éviterait le problème de toxicité.

Pour valider cette nouvelle approche, l'expérience précédente (voir section 4.1.2) a été répétée en triplicata, mais avec du milieu « Instant Ocean » contenant environ 15 mM de nitrate au lieu de 40 mM. Avec cette quantité initiale de nitrate, la concentration maximale théorique possible de nitrite est d'environ 15 mM. De plus, cette concentration correspond à-peu-près au niveau maximal observé dans le mésocosme du fleuve Saint-Laurent au biodôme (Labbé *et al.*, 2003).



**Figure 4.14: Consommation de nitrate des co-cultures des souche NL23 et JAM1 en conditions anaérobies**

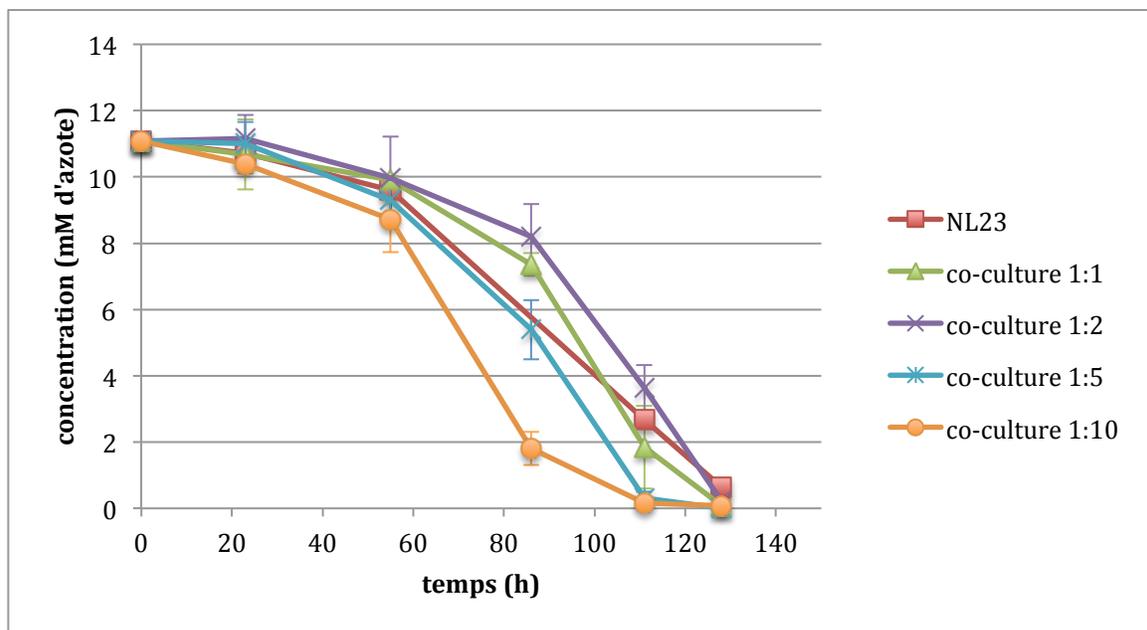
Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 ont été cultivées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L pendant environ 130 heures. Les co-cultures avaient des ratios d'inoculum différents. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de concentration de nitrate dans 3 cultures, mesurée par chromatographie ionique.



**Figure 4.15: Concentration de nitrite dans les co-cultures des souche NL23 et JAM1 en anaérobie**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 ont été incubées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L pendant environ 130 heures. Les co-cultures avaient des ratios d'inoculum différents. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de concentration de nitrite dans 3 cultures, mesurée par chromatographie ionique.

Toutes les co-cultures ont démontré une réduction complète du nitrate et du nitrite en moins de 150 heures (Fig. 4.14 et 4.15). En ce qui concerne le nitrate spécifiquement, toutes les co-cultures en avaient terminé la réduction en moins de 60 heures (au moins 2 fois plus rapidement que la culture pure de la souche NL23); celles plus abondantes en souche JAM1 étant progressivement plus rapides. Aussi, bien que toutes les co-cultures aient démontré une accumulation de nitrite, il a été complètement réduit dans tous les cas. Le nitrite ne s'est jamais accumulé dans les cultures pures de la souche NL23.



**Figure 4.16: Concentration d'azote total dans les co-cultures des souches NL23 et JAM1 en conditions anaérobies**

Des co-cultures des souches NL23 et JAM1 ont été cultivées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L pendant environ 130 heures. Les co-cultures avaient des ratios d'inoculum différents. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de concentration d'azote total dans 3 cultures. L'azote total est calculé à partir des concentrations de nitrate et de nitrite et correspond à la combinaison de ces deux mesures.

Le suivi de la concentration d'azote total comporte aussi d'importantes révélations (Fig. 4.16). Malgré une réduction du nitrate plus rapide, les co-cultures ne semblent pas être nécessairement plus efficaces que la souche NL23 pour les deux premières étapes de la dénitrification dans ces conditions. Les co-cultures 1 :

5 et 1 : 10 ont démontré ici une réduction légèrement plus rapide. L'étape limitante dans ce système est donc la réduction du nitrite par la souche NL23. Il semble probable que son taux de consommation du nitrite n'est pas ou est peu accéléré par la présence de la souche JAM1 ou une réduction accélérée du nitrate.

Pour toutes les expériences de suivi de croissance subséquentes, les co-cultures ont été préparées avec un ratio initial de 1 : 5 (JAM1 : NL23) et environ 15 mM de nitrate initial.

## **4.2. Caractérisation de la relation entre les souches NL23 et JAM1**

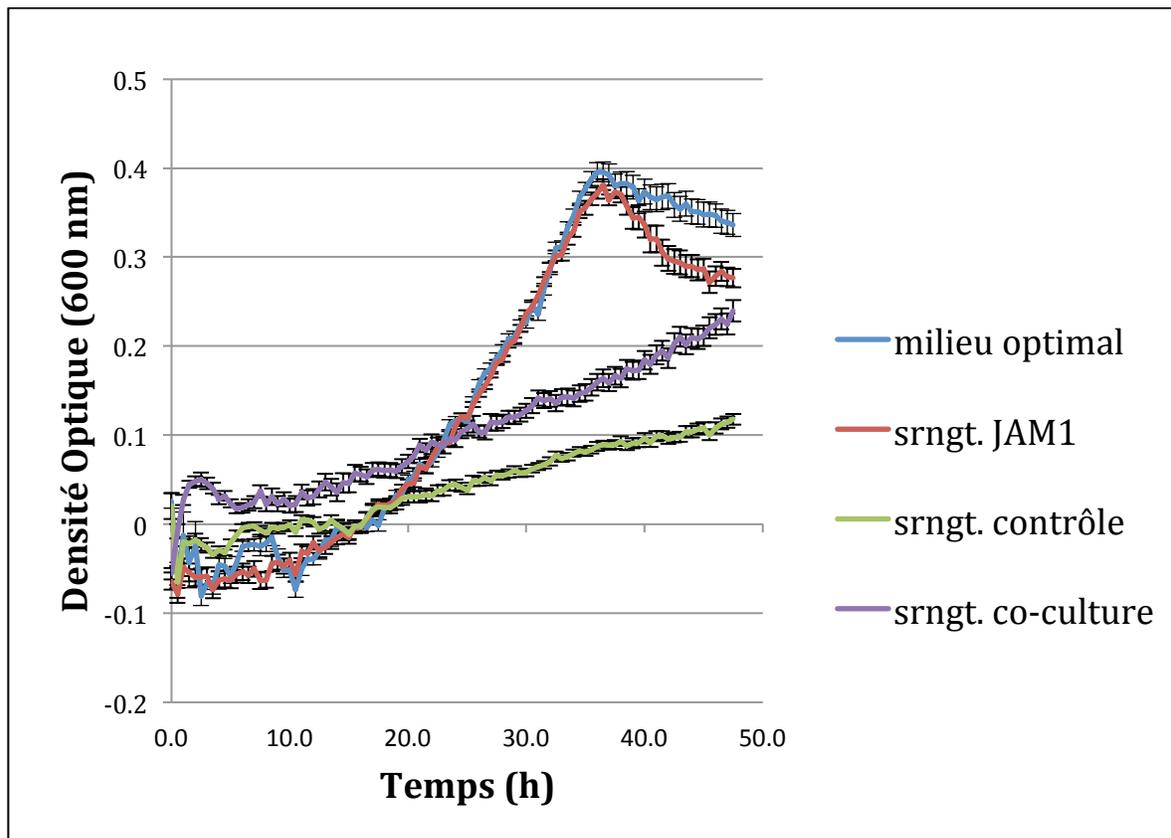
### **4.2.1. Croissance de cultures pures en présence de surnageant**

En plus du partage du nitrate/nitrite, il a été intéressant de chercher des indices de coopération entre les souches NL23 et JAM1. La première tentative de trouver une telle interaction avait pour but de déterminer s'il y avait existence de molécules sécrétées dans le milieu par chaque souche qui pouvaient aider la croissance de l'autre. L'expérience a été exécutée comme suit :

- Des cultures pures des souches NL23 et JAM1 ainsi que des co-cultures des deux ont été effectuées en conditions aérobies dans le milieu « Instant Ocean » 15 g/L.
- Une fois que la croissance maximale ait été atteinte, ces cultures ont été centrifugées pour recueillir le surnageant. Les cellules restantes dans ce surnageant ont ensuite été enlevées à l'aide d'une seringue munie d'un filtre.
- Chaque souche a été inoculée dans le surnageant récolté de la souche opposée (souche NL23 dans le surnageant de la souche JAM1 et vice-versa).
- Chaque souche a aussi été inoculée dans son propre surnageant, dans le surnageant de la co-culture des deux souches (à proportions égales) et d'un surnageant témoin négatif (milieu non-inoculé).

- 50µl de chacun de ces surnageantsensemencés a ensuite été mélangé à 150 µl de milieu « Instant Ocean » frais.
- Les DO600 ont été récoltées pendant la croissance des cultures résultantes à l'aide de l'instrument Bioscreen à chaque demi-heure pendant 48 heures.

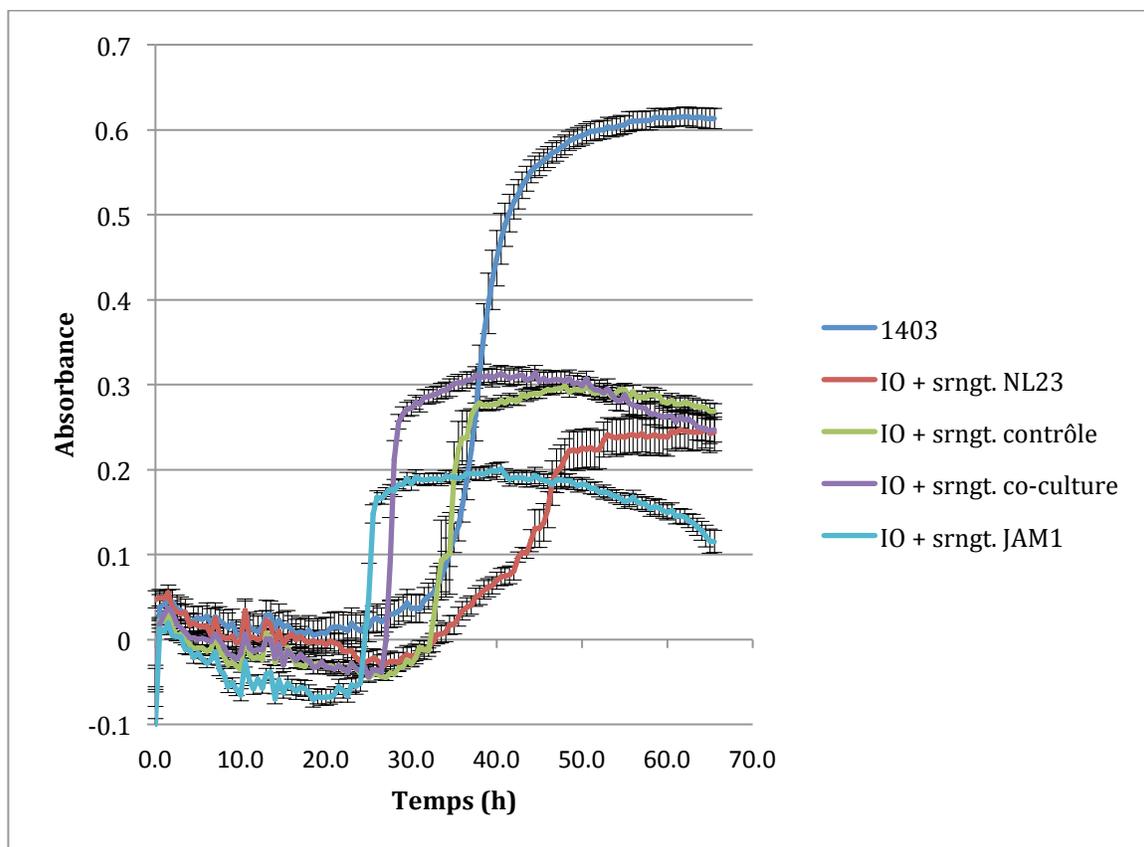
Les essais devaient être faits avec des cultures pures pour éviter l'addition des deux souches dans les mesures des DO600.



**Figure 4.17 : Croissance en conditions aérobies de la souche NL23 en présence de surnageant**

La souche NL23 a été cultivée en conditions aérobies dans plusieurs conditions pendant 48 heures. Les milieux utilisés étaient tous composés de Instant Ocean 15 g/L à la base, mais chaque variation contenait aussi le surnageant d'une culture particulière. La croissance de la souche NL23 dans son milieu optimal (337a) est aussi inclus pour comparer. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de turbidité de 8 cultures, mesuré par l'appareil Bioscreen à toutes les demi-heures.

Les résultats démontrent clairement qu'en 48 heures la souche NL23 a atteint un DO600 nettement plus élevée en présence du surnageant de la souche JAM1 qu'en présence du surnageant du témoin négatif (Fig. 4.17). Le surnageant des co-cultures semble avoir eu un effet potentiel également, mais moins significatif. Étant donné que la croissance des cultures du témoin négatif et du surnageant des co-cultures n'avait pas atteint son plateau, il est possible que ces dernières auraient éventuellement atteint un DO600 semblable à celle de la culture avec surnageant de la souche JAM1. La croissance la souche NL23 en présence de son propre surnageant a démontré à peu près la même courbe que le témoin négatif et n'est pas inclus dans le graphe tel que présenté ici. L'autre élément du graphe est la courbe de croissance de la souche NL23 dans son milieu optimal (337a) sans modifications. Le profil de croissance en milieu 337a s'aligne presque parfaitement avec celui de la culture dans le surnageant de la souche JAM1. Ainsi, la souche NL23 cultivée en milieu « Instant Ocean » (qui n'est pas un milieu optimal) en présence du surnageant d'une culture de la souche JAM1 a été capable d'atteindre un niveau de croissance qui ressemble à celui de sa culture en milieu optimal. Puisque le milieu 337a est un milieu minéral non-salin, ceci laisse peut-être entrevoir le rôle d'un osmoprotecteur.



**Figure 4.18 : Croissance en conditions aérobies de la souche JAM1 en présence de surnageant**

La souche JAM1 a été cultivée en conditions aérobies dans plusieurs conditions pendant 48 heures. Les milieux utilisés étaient tous composés de Instant Ocean 15 g/L à la base, mais chaque variation contenait aussi le surnageant d'une culture particulière. La croissance de la souche JAM1 dans son milieu optimal (1403) est aussi inclus pour comparer. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de turbidité de 8 cultures, mesuré par l'appareil Bioscreen à toutes les demi-heures.

Les suivis de croissance de la culture JAM1 sont beaucoup plus difficiles à expliquer. Même s'il y avait des séparations évidentes entre les diverses courbes dans la figure 4.18, les résultats semblent aléatoires. D'abord, la souche JAM1 en présence du surnageant de la souche NL23 (courbe en rouge) a démontré une phase de croissance exponentielle retardée de près de 10-20 heures par rapport au témoin négatif (courbe en vert). Ceci semble indiquer qu'un aspect inconnu de la composition du surnageant de la souche NL23 ait eu un impact négatif sur la croissance de la souche JAM1. Pour compliquer d'avantage la situation, le surnageant de la co-culture (courbe en mauve) semble avoir eu l'effet opposé,

puisque la phase exponentielle de JAM1 est arrivée légèrement (environ 5 heures) plus tôt en sa présence. Bien que ce résultat soit surprenant, il pourrait être expliqué par la possibilité que la souche JAM1 émet des particules durant sa croissance qui lui sont bénéfiques, tandis que la croissance de la souche NL23 résulte en la sécrétion de particules qui sont néfastes à sa croissance. La croissance de la souche JAM1 en présence de son propre surnageant (courbe en bleu pâle) semblait corroborer, en partie, cette hypothèse, mais a atteint une densité maximale notamment inférieure aux autres cultures. Les trois autres cultures ont atteint un plateau à peu près égal, et la culture de la souche JAM1 en milieu optimal (1403) (courbe en bleu foncé) a atteint un DO600 qui est deux fois supérieures. Malgré la nature inconnue des détails, une chose était certaine : la souche NL23 ne semble pas fournir d'aide à la croissance de la souche JAM1 en conditions aérobies.

#### **4.2.2. Recherche d'un osmoprotecteur**

Comme la souche JAM1 est adaptée à des conditions de milieux salins, une des possibilités intéressantes dans son cas serait la production potentielle d'un osmoprotecteur, une molécule capable de protéger une bactérie contre les stress osmotiques (par exemple : une haute concentration en sel). Avant le début de ce projet, des recherches bioinformatiques ont montré que le génome de la souche JAM1 contient des gènes permettant la production d'ectoïne, une molécule osmoprotectrice. La souche NL23 a une résistance limitée aux environnements salés, donc l'existence de cette molécule dans une co-culture serait d'une importance significative pour la compréhension de la relation entre les deux espèces. L'ectoïne pourrait aussi expliquer en partie l'aide de croissance que la souche JAM1 fournit à la souche NL23, telle qu'observé dans l'expérience de la section précédente.

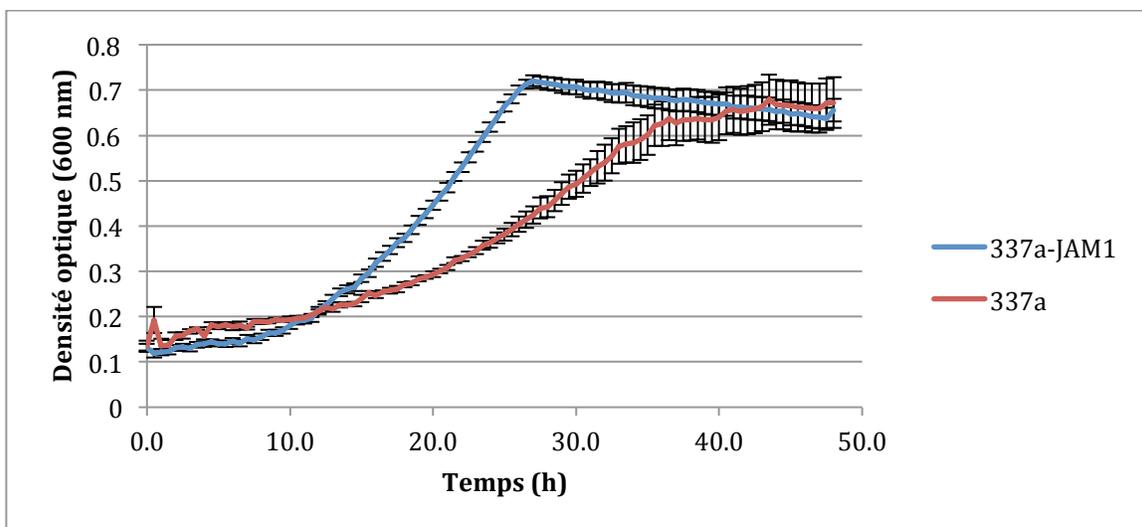
Une expérience a donc été développée pour vérifier l'existence d'une protection osmotique de la part de la souche JAM1 envers la souche NL23. Le protocole d'expérience a été basé sur le processus de « Bacterial Milking » (Sauer *et al.*, 1998), qui a justement été développée pour la récolte de solutés incluant

l'ectoïne. La souche JAM1 a d'abord été cultivée dans une version modifiée de son milieu optimal (1403), où le taux de salinité a été augmenté à 6% NaCl (au lieu de 2,4%). Les cultures ont ensuite été centrifugées, et les culots dispersés dans le milieu optimal de la souche NL23 (337a). L'espoir était que la production de molécules osmoprotectrices induite par le milieu hautement salin résulte en la présence de ces particules dans le nouveau milieu. Après environ 6 heures dans le milieu 337a, les cellules ont été centrifugées de nouveau, et cette fois le surnageant a été conservé. Celui-ci a été séparé en plusieurs tubes dans lesquels des quantités progressivement croissantes de sel ont été ajoutées.

**Tableau 4.1 : concentration de NaCl par tube dans la recherche d'un osmoprotecteur**

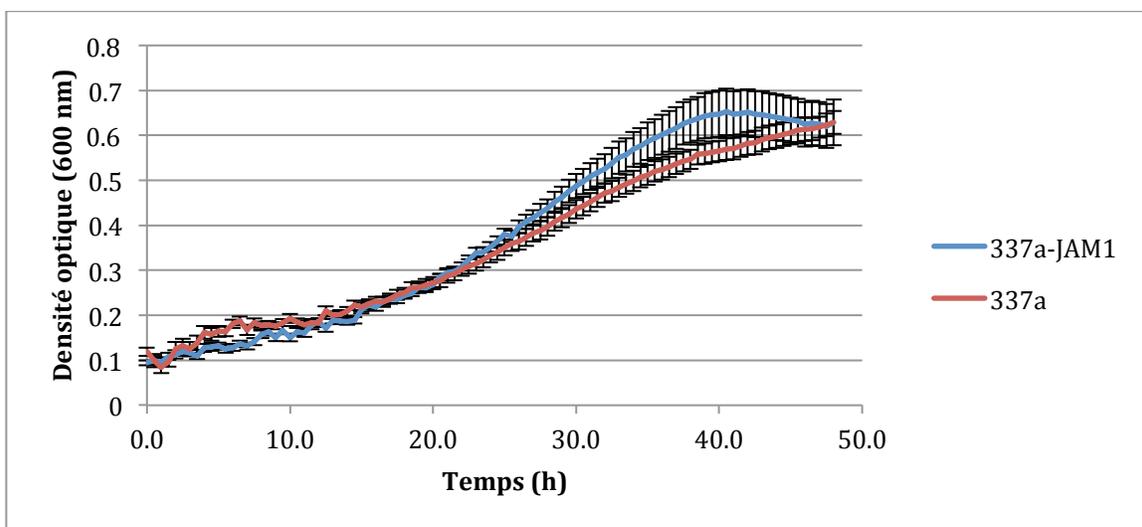
tube	Pourcentage NaCl (masse)
1	0% (0,00 g)
2	1% (0,05 g)
3	1,5% (0,075 g)
4	2,0% (0,10 g)

La souche NL23 a ensuite été inoculée dans chacun des nouveaux milieux, et les cultures ont été suivies à l'aide de l'appareil Bioscreen pendant 48 heures. La souche NL23 a également été cultivée dans le milieu 337a non-modifié (pas exposé aux cellules de la souche JAM1) à titre de comparaison (Fig. 4.19 à 4.22).



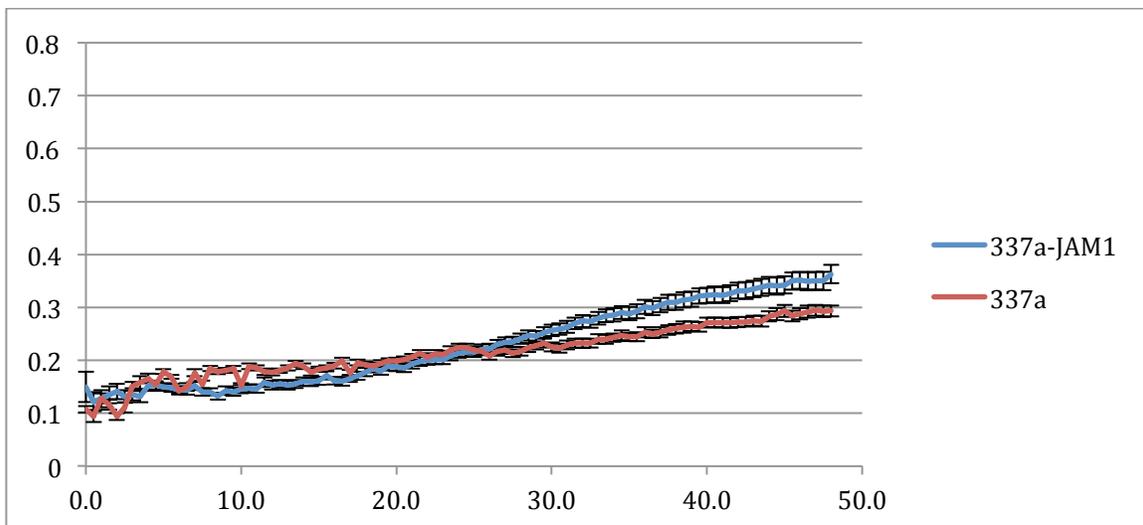
**Figure 4.19 : Croissance de la souche NL23 en présence de métabolites de la souche JAM1 (0% de NaCl)**

La souche NL23 a été cultivée en conditions aérobies pendant 48 heures dans son milieu optimal (337a) avec aucun sel ajouté. Le milieu dénommé 337a-JAM1 dans la légende comporte en plus des métabolites de la souche JAM1 récoltés par une méthode de « bacterial milking ». Chaque point dans le graphe représente la moyenne de turbidité de 8 cultures, mesuré par l'appareil Bioscreen à toutes les demi-heures.



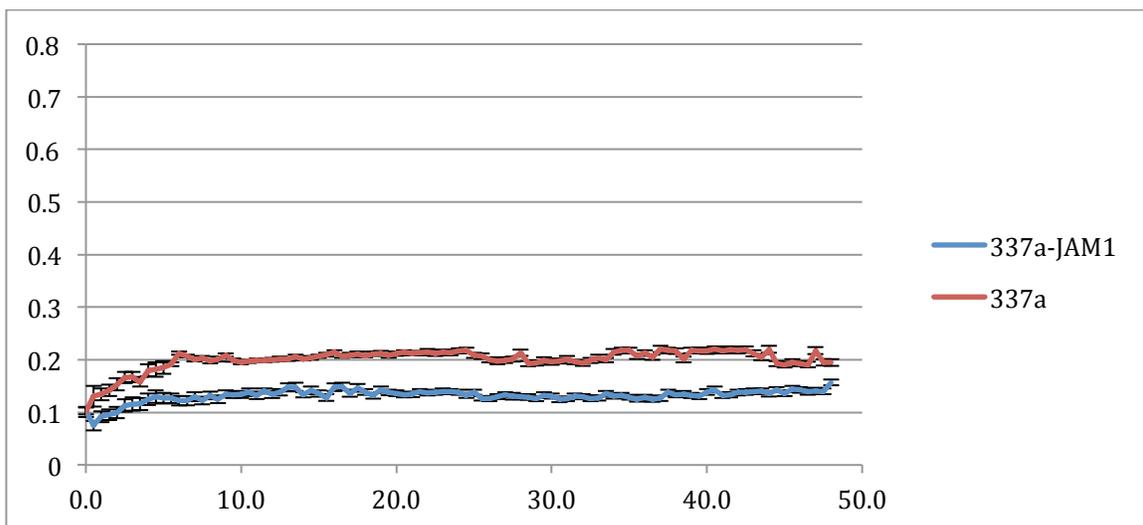
**Figure 4.20 : Croissance de la souche NL23 en présence de métabolites de la souche JAM1 (1% de NaCl)**

La souche NL23 a été cultivée en conditions aérobies pendant 48 heures dans son milieu optimal (337a) avec 1% de sel. Voir légende de la figure 4.19.



**Figure 4.21 : Croissance de la souche NL23 en présence de métabolites de la souche JAM1 (1,5% de NaCl)**

La souche NL23 a été cultivée en conditions aérobies pendant 48 heures dans son milieu optimal (337a) avec 1,5% de sel. Voir légende de la figure 4.19.



**Figure 4.22 : Croissance de la souche NL23 en présence de métabolites de la souche JAM1 (2% de NaCl)**

La souche NL23 a été cultivée en conditions aérobies pendant 48 heures dans son milieu optimal (337a) avec 2% de sel. Voir légende de la figure 4.19.

Les cultures de la souche NL23 dans le milieu 337a modifié ont montré une croissance plus rapide que le témoin aux concentrations 0%, 1% et 1,5% de NaCl. Cette observation aurait pu porter à confusion, mais une expérience précédente de ce projet avait déjà démontré que la souche NL23 pouvait croître plus rapidement en présence d'un surnageant de la souche JAM1 (voir section 4.2.1). Cet aspect du résultat n'est donc pas surprenant. Ce qui était réellement le point majeur dans les données recueillies était l'absence de croissance dans le graphe pour la concentration 2% (Fig. 4.22). En effet, ce comportement est exactement de quoi on s'attendait si la souche JAM1 n'offrait aucune protection osmotique. Toutefois, il est possible que le protocole utilisé ne permettait pas de récolter des molécules osmoprotectrices. Une répétition de l'expérience a confirmé les résultats jusqu'à une concentration de sel de 2,5%.

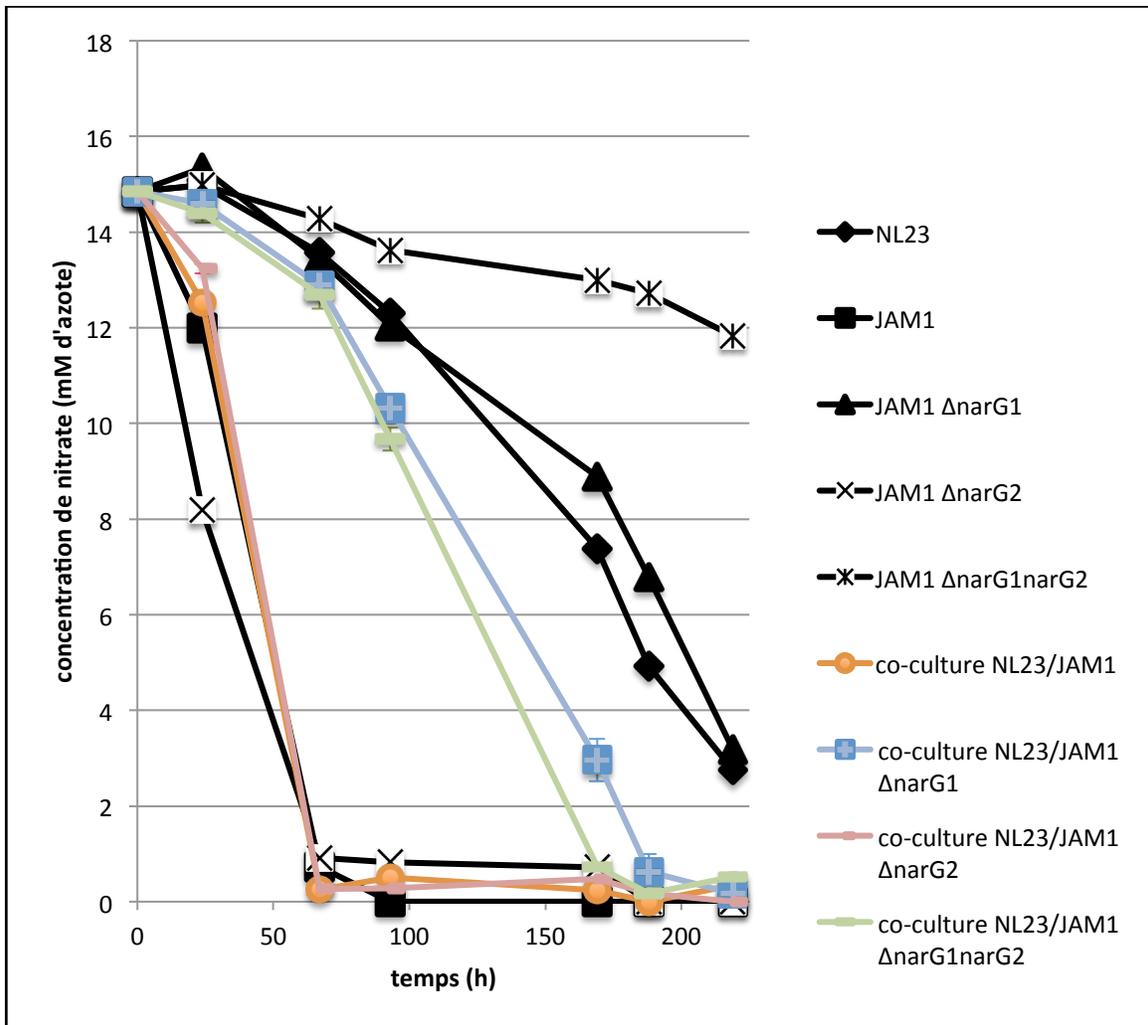
#### **4.2.3. Caractérisation approfondie de la consommation du nitrate/nitrite à l'aide de mutants de la souche JAM1**

Lors d'études en parallèles avec celles-ci, des mutants de la souche JAM1 ont été développés pour aider à la caractérisation de son profil de dénitrification (Mauffrey *et al.*, 2015). Les trois mutants en question étaient tous rendus déficients dans leur habileté de réduire le nitrate :

- La souche JAM1  $\Delta$ narG1 (Absence du système Nar1)
- La souche JAM1  $\Delta$ narG2 (Absence du système Nar2)
- La souche JAM1  $\Delta$ narG1narG2 (double mutant)

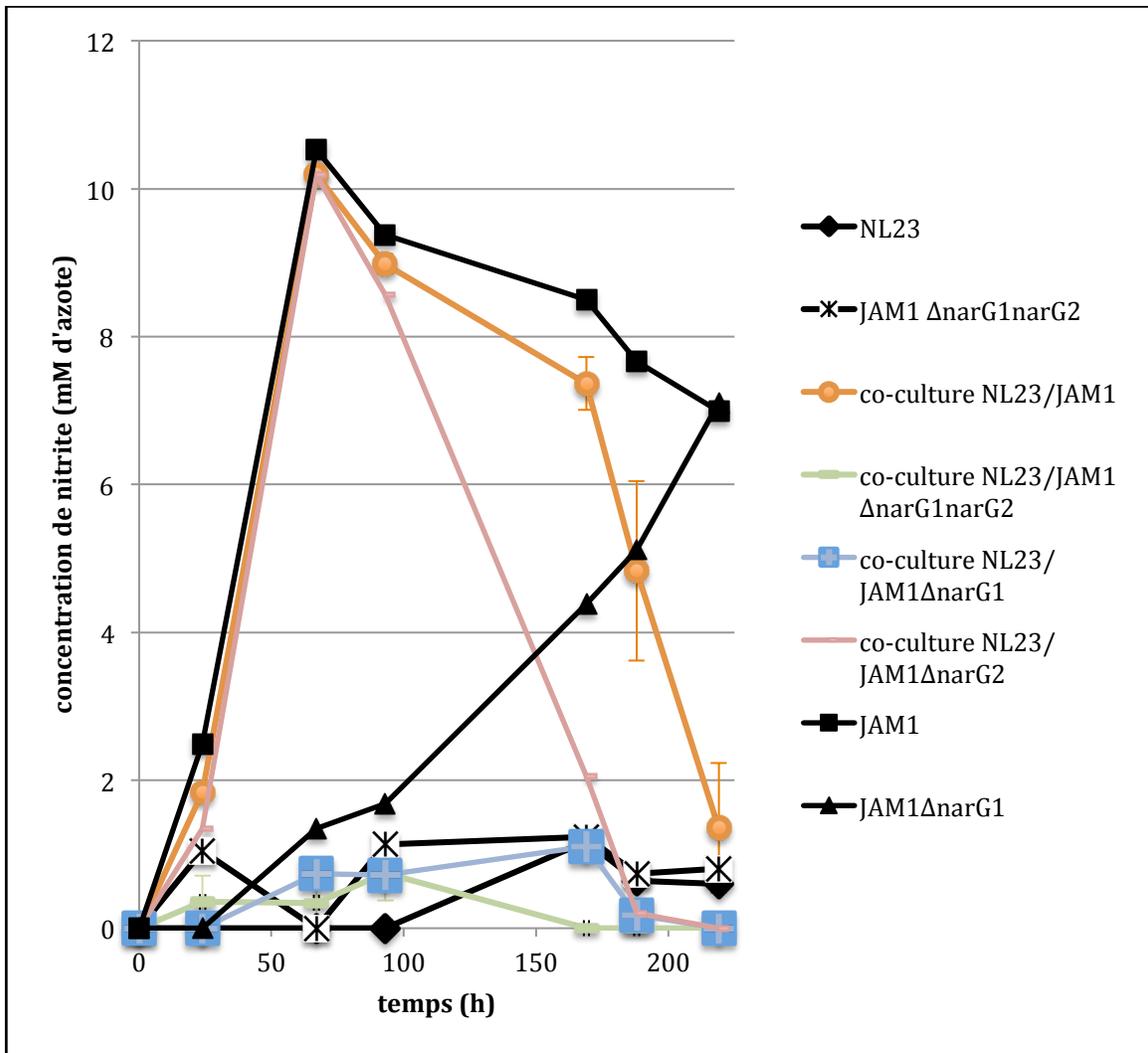
Comme le nitrate est principalement important dans le contexte de la dénitrification, l'application expérimentale des mutants était surtout intéressante en conditions anaérobies. Le plan était donc de faire un suivi de croissance des co-cultures de la souche NL23 avec chacun des mutants et de la souche JAM1 non mutante (ainsi que des cultures pures de chaque souche impliquée comme témoin). Les co-cultures de la souche NL23 avec le double mutant allaient être particulièrement informatif, puisque l'effet de la souche JAM1 sur la performance de

la souche NL23 serait visible dans le suivi de dénitrification par chromatographie ionique. Le ratio d'inoculum de départ pour toutes les co-cultures était de 1 : 5 (nitrate : nitrite), basé sur des résultats précédents (voir section 4.1.2). Le suivi a été effectué sur une période d'environ 225 heures et les échantillons ont été mesurés en DO600 et en concentrations de nitrate et de nitrite (Fig. 4.21 à 4.23). Cependant, seuls les résultats de la chromatographie ionique sont présentés, car le suivi par DO600 ne révèle pas beaucoup d'informations sur l'activité des cultures.



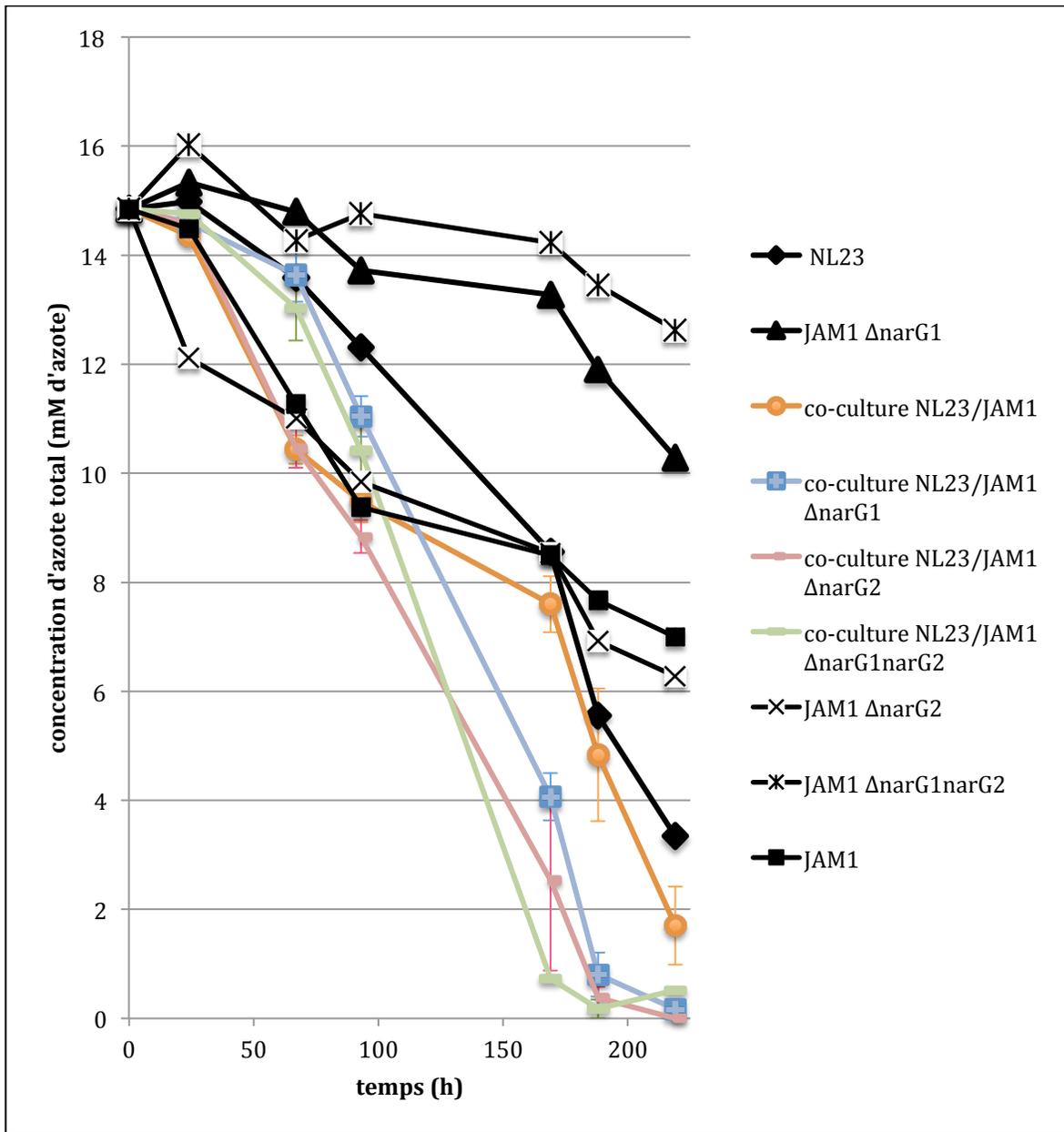
**Figure 4.23 : Consommation du nitrate par les co-cultures des souches JAM1 non-mutantes ou mutantes avec la souche NL23 (conditions anaérobies)**

Des co-cultures de la souche JAM1 et ses mutants avec la souche NL23 ont été cultivées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L pendant près de 225 heures. JAM1 $\Delta narG1$  : la version de la souche JAM1 qui est mutante dans le gène *narG1*. JAM1 $\Delta narG2$  : la version de la souche JAM1 qui est mutante dans le gène *narG2*. JAM1 $\Delta narG1 narG2$  : la version de la souche JAM1 qui est mutante dans les gènes *narG1* et *narG2* en même temps. Les co-cultures avaient un ratio initial de 1 : 5 (JAM1 : NL23). Chaque point dans le graphe représente la moyenne de concentration de nitrate de 3 cultures, mesurée par chromatographie ionique.



**Figure 4.24 : Concentration de nitrite dans les co-cultures des souches JAM1 non-mutantes ou mutantes avec la souche NL23 (conditions anaérobies)**

Des co-cultures de la souche JAM1 et ses mutants avec la souche NL23 ont été cultivées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L pendant près de 225 heures. Voir la légende de la figure 4.23. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de concentration de nitrite de 3 cultures, mesurée par chromatographie ionique. La courbe de la culture pure de la souche JAM1 $\Delta narG2$  a été omise pour des raisons de visibilité. Celle-ci démontrait une accumulation de nitrite similaire à la courbe de la souche JAM1.



**Figure 4.25 : Concentration d'azote total dans les co-cultures des souches JAM1 non-mutantes ou mutantes avec la souche NL23 (conditions anaérobies)**

Des co-cultures de la souche JAM1 et ses mutants avec la souche NL23 ont été incubées dans le milieu Instant Ocean 15 g/L pendant près de 225 heures. Voir la légende de la figure 4.23. Chaque point dans le graphe représente la moyenne de concentration d'azote total de 3 cultures. L'azote total est calculé à partir des concentrations de nitrate et de nitrite et correspond à la combinaison de ces deux mesures.

Le premier aspect intéressant des résultats est le comportement de la dénitrification des souches mutantes. Le double mutant (JAM1 $\Delta$ narG1narG2) était évidemment le moins performant en réduction du nitrate, puisque celui-ci ne possède pas de nitrate réductases fonctionnelles (Fig. 4.23). La légère baisse de concentration de nitrate et d'azote totale pourrait être due à des fluctuations causées par le chromatographe. Le mutant JAM1 $\Delta$ narG1 avait un profil de réduction de nitrate très similaire à la souche NL23, tandis que le mutant JAM1 $\Delta$ narG2 a un profil de réduction de nitrate qui ressemble plutôt à celui de la souche JAM1. Ces observations étaient prévisibles; des expériences antérieures avaient déjà déterminé que le gène *narG1* est le plus actif de la paire (Mauffrey et al., 2015).

Il est intéressant de constater que toutes les co-cultures ont réduit le nitrate plus rapidement que la souche NL23 en cultures pures (Fig. 4.23). Pour les co-cultures NL23/JAM1, ce résultat n'était pas nouveau, puisque ce résultat avait déjà été obtenu. Étant donné que la souche JAM1 $\Delta$ narG2 performe exactement comme sa version non mutante, le résultat pour les co-cultures NL23/JAM1 $\Delta$ narG2 n'était pas étonnant non plus. Les co-cultures NL23/JAM1 $\Delta$ narG1 étaient plus rapides dans la réduction du nitrate que le même mutant en cultures pures. Ce taux de réduction plus élevé pourrait être attribué à l'addition de l'activité de NapA et de Nar2. Toutefois, ceci ne pourrait pas expliquer le même comportement chez les co-cultures NL23/JAM1 $\Delta$ narG1narG2. En effet, il semble que la simple présence de la souche JAM1 double-mutante ait permis à la souche NL23 d'augmenter son activité de réduction de nitrate. Il existerait donc un facteur d'aide inconnu fourni par la souche JAM1. Il est impossible par cette expérience de déterminer ce qu'est la nature de ce facteur. Celui-ci pourrait être relié à l'aide de croissance observée en conditions aérobies dans une expérience précédente (voir section 4), une protection osmotique, ou un autre élément jusqu'ici inconnu.

Dans le graphe de concentrations de nitrite (Fig. 4.24), on voit que les seules co-cultures à avoir accumulé du nitrite étaient les co-cultures NL23/JAM1 et NL23/JAM1 $\Delta$ narG2. Ceci renforce l'idée que le mutant JAM1 $\Delta$ narG2 se comporte

largement comme la souche JAM1 non-mutante. Aucune des autres co-cultures n'ont accumulé de nitrite.

Comme d'habitude les plus grandes découvertes se trouvaient dans le graphe du suivi de la réduction d'azote total (Fig. 4.25). Premièrement, les résultats corroborent la notion que les co-cultures NL23/JAM1 ne sont pas beaucoup plus efficaces à cet égard que la souche NL23 en cultures pures. Deuxièmement, toutes les co-cultures avec des mutants ont réduit l'azote total plus rapidement que la souche NL23 en cultures pures et les co-cultures NL23/JAM1. Ceci était un résultat très surprenant, surtout dans le cas des co-cultures NL23/JAM1 $\Delta$ narG1narG2, qui ne comptaient absolument pas sur la capacité de réduction de nitrate de la souche JAM1. Pourtant, celles-ci ont atteint 0 mM d'azote total plus de 20 heures avant les co-cultures sans mutant ou la souche NL23 en cultures pures.

Une dernière observation notable est que la souche JAM1 et le mutant JAM1 $\Delta$ narG2 ont semblé réduire l'azote total. Comme il y a peu d'ammonium dans le milieu Instant Ocean, l'assimilation de l'azote doit se faire via la réduction du nitrate en nitrite par la voie assimilatrice présente dans la souche JAM1 (Mauffrey et al., 2016).

## 5. Discussion

### 5.1. Paramètres optimaux pour la croissance des co-cultures des souches NL23 et JAM1

Avant le début du projet, une partie de la recherche préliminaire sur les conditions des co-cultures des souches NL23 et JAM1 avait déjà été faite. Le milieu Instant Ocean 15/L avait déjà été découvert comme étant apte à supporter la croissance des deux bactéries en cultures pures ou en co-cultures. De plus, la plupart des autres paramètres importants, dont la température d'incubation, le pH du milieu et les éléments traces ajoutés étaient déjà établis comme étant les mêmes que pour la culture du biofilm original. La problématique restante était surtout axée sur la recherche d'une solution au problème d'accumulation toxique de nitrite.

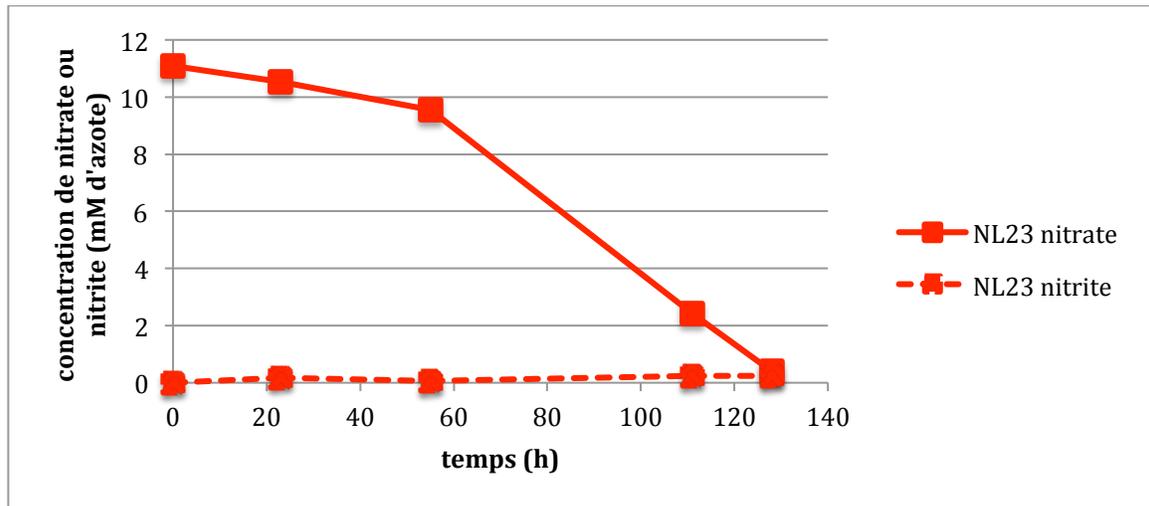
La première solution tentée était d'ajuster les ratios de bactéries dans les co-cultures au moment de l'ensemencement. Cette solution était logique mais elle avait aussi été utilisée avec succès en situation de co-cultures de *Clostridium butyricum* et *Rhodobacter sphaeroides*. En effet, dépendant du ratio des deux bactéries dans l'inoculum, il pouvait y avoir amélioration de l'efficacité de la photoproduction d'hydrogène gazeux par les co-cultures. En limitant l'abondance de *C. butyricum*, qui démontre une croissance nettement plus rapide que son homologue, un équilibre bénéfique a été atteint. (Laurinavichene *et al.*, 2016). Ainsi, plus la proportion de la souche JAM1 dans l'inoculum de départ était importante, plus le taux de réduction de nitrate était rapide, étant donné que la souche JAM1 est plus efficace pour réduire le nitrate que la souche NL23. Toutefois, en réduisant la quantité relative initiale de la souche JAM1 par rapport à la souche NL23, il a été possible dans certains cas d'éviter le niveau fatal de nitrite. Les résultats dans ces essais étaient souvent difficiles à reproduire et à analyser par la suite à cause de variabilités considérables et imprévisibles. La plupart des expériences comportaient des triplicats dans lesquels les cultures avaient un comportement complètement différent malgré des

conditions de culture identiques. La cause de cette variabilité demeure inconnue, mais pourrait être attribué à un paramètre trop difficile à contrôler, ce qui est parfois le cas dans des systèmes biologiques. Des résultats préliminaires ont suggéré que le ratio entre les souches NL23 et JAM1 doit tendre vers un certain équilibre pour effectuer une dénitrification efficace. Évidemment, la capacité de reproduire des résultats avec constance est désirable. Il a donc été conclu que l'ajustement du ratio initial des bactéries dans l'inoculum ne pouvait être qu'une partie de la solution au problème.

La deuxième solution au problème d'accumulation de nitrite était de simplement baisser à un tiers la concentration de nitrate initiale dans le milieu de croissance. Le but était de limiter la quantité maximale possible de nitrite accumulé. De plus, les concentrations de nitrate observées dans la nature ou dans les aquariums d'où provient la problématique n'approchent jamais 40 mM d'azote tel que dans ces expériences, et les effets toxiques sur les animaux sont ressentis à des concentrations nettement inférieures (De Roos *et al.*, 2003, Labbé, 2007). L'impact de cette action a été décisif. Avec une quantité moindre de nitrate à sa disposition, les co-cultures n'ont jamais pu accumuler assez de nitrite pour que la concentration devienne nocive. Toutes les expériences subséquentes avaient donc un ratio initial de 1 : 5 (JAM1 : NL23) et environ 15 mM de nitrate au lieu de 40 mM, ainsi combinant les résultats des deux solutions.

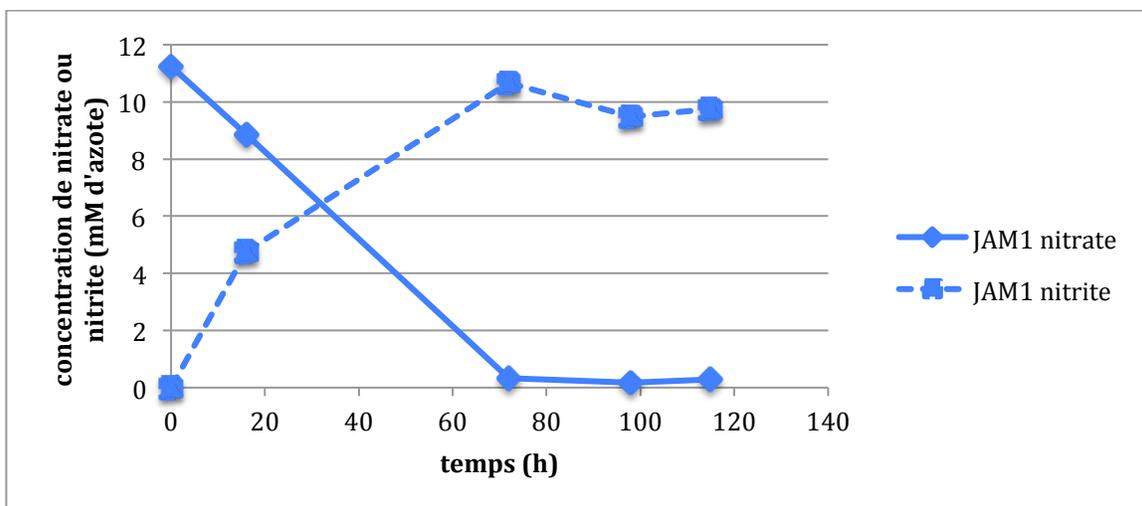
## 5.2. Profil de consommation de nitrate et de nitrite lors de la dénitrification

Une grande partie des expériences visant à optimiser les conditions de cultures a aussi permis la caractérisation du profil de consommation de nitrate et de nitrite des co-cultures des souches NL23 et JAM1 (Fig. 5.1 à 5.3). Les courbes générées durant l'expérience de réduction de nitrate représentent très clairement le comportement typique d'une co-culture réussie (en conditions anaérobies) des souches JAM1 et NL23: une baisse de concentration rapide du nitrate avec une accumulation de nitrite associée, suivie d'une réduction de ce nitrite (Fig 5.3).



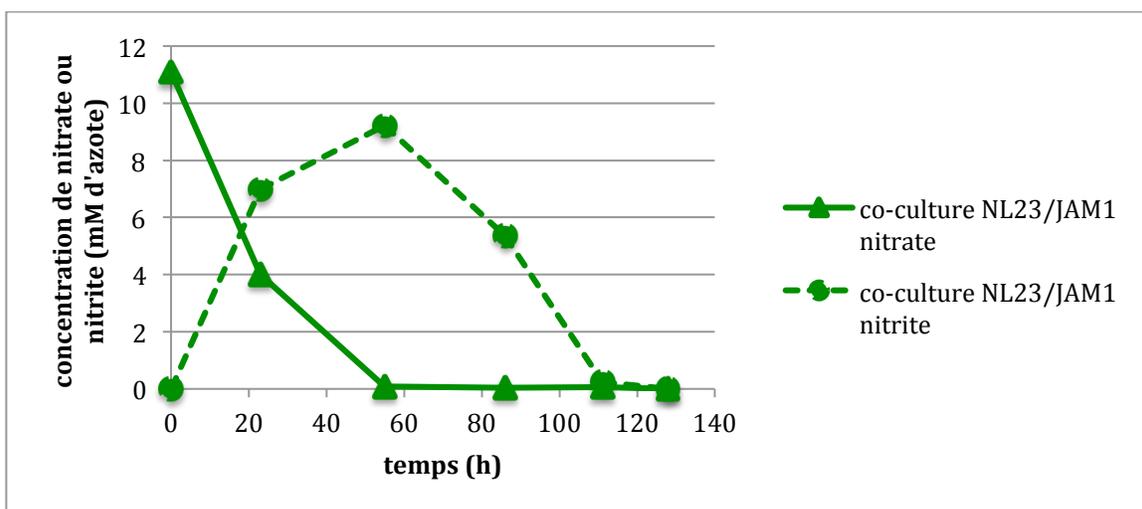
**Figure 5.1 : Profil de consommation du nitrate et du nitrite par la souche NL23 lors de la dénitrification**

Exemple du comportement de la souche NL23 en conditions anaérobies. Le graphe a été généré à partir de vraies données mais n'est qu'une représentation générale du profil de la souche NL23 lors de la dénitrification.



**Figure 5.2 : Profil de consommation du nitrate et du nitrite par la souche JAM1 lors de la dénitrification**

Exemple du comportement de la souche JAM1 en conditions anaérobies. Le graphe a été généré à partir de vraies données mais n'est qu'une représentation générale du profil de la souche JAM1 lors de la dénitrification.



**Figure 5.3 : Profil de consommation du nitrate et du nitrite par une co-culture des souches NL23 et JAM1 lors de la dénitrification**

Exemple du comportement d'une co-culture des souches NL23 et JAM1 en conditions anaérobies. Le graphe a été généré à partir de vraies données mais n'est qu'une représentation générale du profil d'une co-culture lors de la dénitrification.

Ce genre de profil pour une co-culture a déjà été observé lors d'études antérieures. Des chercheurs ont cultivé des co-cultures de *Pseudomonas denitrificans* (effectue toutes les étapes de la dénitrification) et *Bacillus subtilis* (ne réduit que le nitrate) en conditions anaérobies. Ils ont mesuré, entre autres, la consommation de nitrate et de nitrite (Fig 5.4). Le profil de consommation de nitrate et de nitrite est remarquablement semblable à celui d'une co-culture des souches NL23 et JAM1 (Marazioti *et al.*, 2003). Ceci renforce l'idée de la nitrite réductase comme étant une étape limitante dans la dénitrification. Il serait potentiellement intéressant de cultiver une co-culture où les deux espèces bactériennes réduisent le nitrite, mais où il n'y a qu'une nitrate réductase, pour voir si cela pourrait offrir un profil différent.

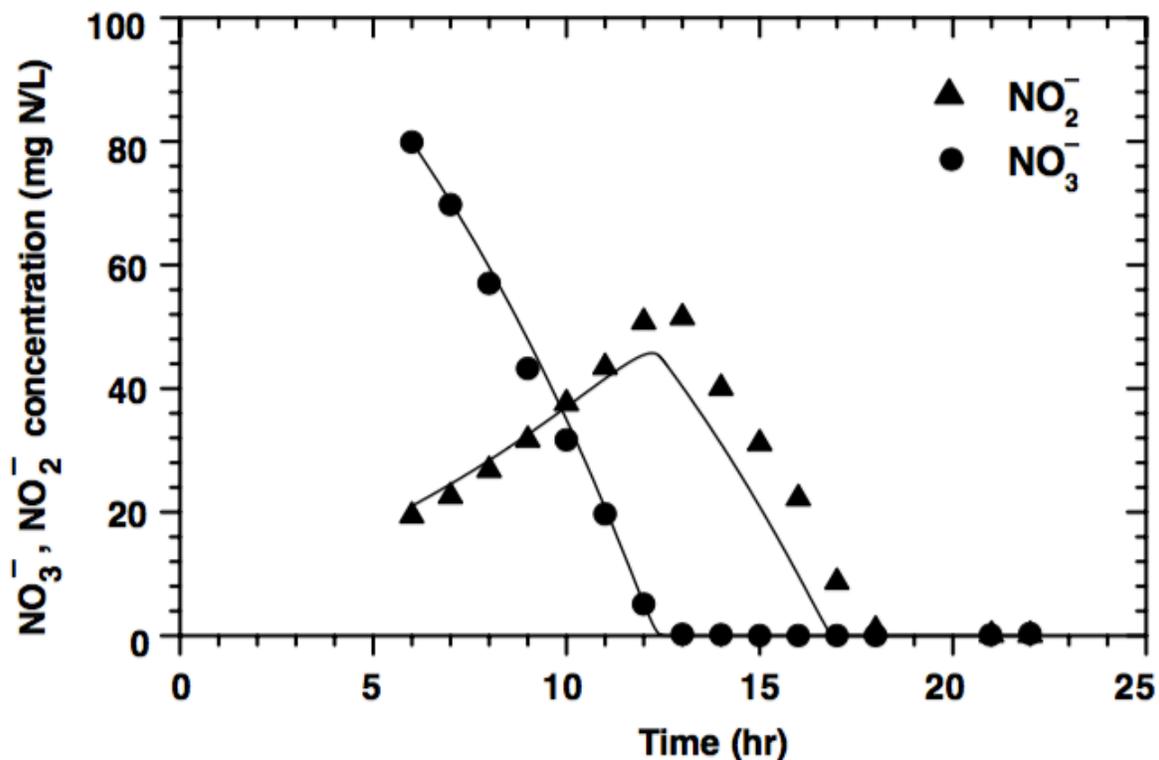


Figure 5.4 : Profil de consommation du nitrate et du nitrite par une co-culture des espèces *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas denitrificans* lors de la dénitrification

Les unités ne sont pas en mM, donc la comparaison des valeurs est difficile, mais la forme des courbes reste intéressante. (Marazioti *et al.*, 2003)

Lors de l'expérience avec les mutants de la souche JAM1, il y avait aussi l'occasion de corroborer des notions reliées aux deux nitrate réductases (Nar1 et Nar2) de la souche JAM1. Il a été confirmé que la nitrate réductase Nar1 est la principale responsable de la réduction du nitrate. En effet, une souche mutante de la souche JAM1 où la deuxième nitrate réductase (Nar2) a été désactivée (donc Nar1 actif seulement) reproduit presque exactement le même taux de réduction du nitrate que la souche sauvage. Dans le cas inverse où Nar 1 est inactivé, les résultats ont démontré que la souche mutante avec Nar2 actif seulement a une dynamique de réduction du nitrate équivalente à la souche NL23 qui possède une nitrate réductase de type Nap.

L'aspect le plus important en général de cette optique était l'efficacité d'une co-culture pour réduire l'azote total, c'est à dire la vitesse à laquelle le nitrate et le nitrite sont réduits à zéro. Une des hypothèses centrales du projet était que les deux espèces sont plus efficaces ensemble qu'individuellement. Incidemment, l'amélioration du rendement métabolique par l'application de co-cultures est le but de plusieurs efforts de recherche (ex : la production d'hydrogène par une co-culture de *C. butyricum* et *R. sphaeroides*, (Laurinavichene *et al.*, 2016). Les premiers résultats à cet égard n'étaient pas encourageants : Les co-cultures ne semblaient pas être nécessairement plus efficaces pour réduire l'azote total, prenant à peu près autant de temps que la souche NL23 en culture pure pour le réduire à zéro. Les seules co-cultures qui ont démontré une amélioration de cet aspect étaient celles avec la souche NL23 avec une version mutante de JAM1 qui avait Nar1 désactivé. Combiné avec la notion que la souche JAM1 fournit une aide de croissance à la souche NL23 (expliqué plus bas), ceci pourrait indiquer que la souche NL23 est négativement affectée par l'activité dénitrifiante de la souche JAM1, mais positivement affectée par sa présence.

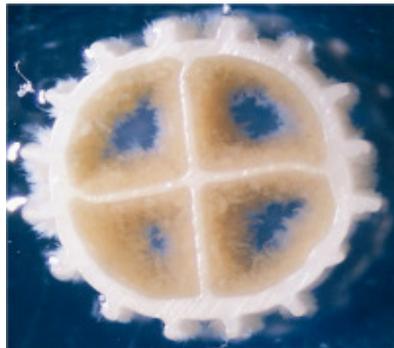
### 5.3. Les souches NL23 et JAM1 en biofilm

Une des grandes questions au début du projet était le rôle de la structure du biofilm dans l'interaction des bactéries NL23 et JAM1, surtout dans le cas de l'osmoprotection de la souche NL23 dans les milieux concentrés en NaCl (plus que 1.5%). La décision a donc été prise de tenter la création d'un biofilm composé de chacune des souches NL23 et JAM1 ou en « co-biofilm ». La création et l'observation d'un biofilm consistaient déjà un processus connu dans le laboratoire. Des études précédentes portaient souvent sur la composition et la performance du biofilm original recueilli au Biodôme de Montréal. Les méthodes de création du biofilm développées dans ces études précédentes ont tout de même servi d'exemple dans la méthode employée ici (une description de cette méthode est disponible en annexe).

Un biofilm comme celui-ci aurait pu servir dans plusieurs expériences différentes, mais l'idée initiale était d'étudier un rôle possible de la structure du biofilm dans la protection de la souche NL23 en milieu salé. Le biofilm original (au biodôme et en laboratoire) était cultivé en milieu avec 3% de sel. La souche NL23 étant une des espèces principales de ce système, elle devait nécessairement recevoir une aide extérieure. Cet aide pourrait provenir de la souche JAM1, par exemple par l'entremise de l'osmoprotecteur ectoïne; il a été documenté pour d'autres co-cultures que l'aide d'un osmoprotecteur n'est efficace qu'en biofilm. Dans une série d'expériences, une souche bactérienne halophile du genre *Chromohalobacter* a été cultivée en co-culture avec une espèce halotolérante du genre *Dietza*. L'espèce halophile ne démontre aucune croissance en milieux contenant moins de 5% de sel, tandis que l'espèce halotolérante ne démontre aucune croissance en milieux contenant plus de 12% de sel. En co-cultures planctoniques (en suspension liquide), il n'y avait pas d'effet protecteur d'un côté ou de l'autre; seules des cellules de l'espèce halotolérante ont été détectées dans le milieu sans sel, et seules des cellules de l'espèce halophile ont été détectées dans le milieu de 15% de sel. Quand les espèces étaient cultivées en « co-biofilm », l'espèce halotolérante n'apportait aucune

aide à l'autre bactérie en milieu sans sel. Cependant, une quantité à peu près égale des deux espèces ont été détectée dans le « co-biofilm » à 15% de sel. Les chercheurs ont suggéré le rôle des osmoprotecteurs ectoïne et glutamate dans le résultat (Plakunov *et al.*, 2008). Malgré tout, il ne serait pas surprenant que la protection dans le cas des souches NL23 et JAM1 provienne plutôt directement de la structure du biofilm et des EPS qui le compose, étant donné la grande variété de fonctions qui lui sont attribué.

L'expérience planifiée était de cultiver le biofilm en milieu Instant Ocean avec 1,5% de NaCl, puis de le transférer dans le même milieu à 3% de NaCl, pour une autre série de transferts. La survie (ou non) de la souche NL23, en comparaison avec une co-culture liquide, aurait alors été une indication du niveau de protection offert par le biofilm. Une autre indication de la protection aurait été le taux dénitrification. Si la culture en biofilm dans le milieu Instant Ocean (3% NaCl) était arrivée à réduire le nitrite, cela aurait été un signe d'activité de la part de la souche NL23.



**Figure 5.5 : Support en plastique garni d'un biofilm**

Des supports en plastique comme celui-ci ont été utilisés pour fournir une surface d'accrochage au souche NL23 et JAM1 pour la création d'un biofilm. Les supports son assez petits pour être facilement insérés et retirés des fioles de culture.

Pour des raisons qu'on ignore, ni les souches individuelles, ni la co-culture des souches NL23 et JAM1 n'ont démontré la capacité de former un biofilm. Les raisons exactes de ce résultat sont évidemment inconnues, mais on peut développer des hypothèses. L'échec pourrait être dû à l'absence d'une espèce colonisatrice importante, puisque des caractéristiques spécifiques sont requis pour faciliter l'adhérence de cellules à une paroi. Les facteurs associés aux stages initiaux de la formation d'un biofilm pour *E. coli*, par exemple, incluent la motilité (ex. : flagelles), la présence de fimbriae, la présence de curli et la production de certains EPS clés, dont le polysaccharide PGA ( $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine) (Van Houdt *et al.*, 2005). La capacité de formation de biofilm peut varier énormément entre espèces et même entre souches de la même espèce, comme il a été démontré pour *Cronobacter sakazakii* (Ye *et al.*, 2015). Il est aussi documenté que la formation de biofilm pour certaines espèces est facilitée par la colonisation initiale d'une surface par une autre espèce. L'espèce bactérienne *Sphingomonas natatoria* est capable de former des biofilms fragiles en culture pure, mais elle forme des biofilms plus robustes lorsqu'elle est exposée à une surface recouverte de bactéries de l'espèce *Micrococcus luteus*. Ceci est dû à une « coagrégation », une reconnaissance et un attachement spécifique entre les deux bactéries (Min *et al.*, 2009).

Le biofilm original est une communauté complexe de bactéries et d'autres organismes; il est possible qu'un ou plusieurs de ceux-ci agissent comme spécialistes colonisateurs de surfaces et sont donc nécessaires à la formation efficace d'un biofilm. Dans une des analyses du biofilm original, il avait été noté qu'une grande variété de cellules eucaryotes composaient une proportion importante (20%) de la biomasse au début du développement du biofilm; ces cellules devenaient moins abondantes par la suite (5-6%) (Labbé *et al.*, 2007). Ceci pourrait être indicatif d'un rôle de colonisation ou non, mais le changement dramatique de la composition de la biomasse du biofilm est certainement une indication que certaines bactéries sont responsables de différents éléments de la vie microbienne en biofilm, incluant la colonisation. Il est entièrement possible que les souches NL23 et JAM1 ne soient pas axées sur cette partie du développement d'un

biofilm. Il est aussi possible que les conditions dans lesquelles l'expérience s'est déroulée n'étaient pas optimales. La surface en plastique des supports n'était peut-être pas apte au biofilm; des surfaces en verre ont été testées également, sans plus de résultat.

Éventuellement, cet aspect du projet a été abandonné avec le verdict que la formation d'un biofilm composé des souches NL23 et JAM1 n'est pas possible avec les méthodes utilisées.

#### **5.4. Échange de ressources**

Les expériences ont démontré qu'il y avait au moins existence d'une aide bénéfique de croissance et d'activité dénitrifiante dans les co-cultures de la part de la souche JAM1. En effet, il semble qu'il existe un facteur inconnu qui aide la souche NL23 à croître plus rapidement (démontré en conditions aérobies) et à réduire le nitrate plus rapidement (démontré en conditions anaérobies). L'identité de ce mécanisme reste indéterminée; Il pourrait s'agir d'une particule ajoutée ou transférée, ou alors l'enlèvement d'un élément limitant. De plus, il serait possible que plusieurs facteurs soient présents, et même que différents facteurs soient responsables des améliorations observées en aérobiose et en anaérobiose. L'aspect unidirectionnel de cet aide a aussi été démontré; la souche JAM1 n'ayant jamais montré la moindre indication de profiter de la présence de la souche NL23, voire même sa présence pouvant être nocive. Dans l'étude menée par Takaki *et al.* (2007) (voir section 2.8), l'espèce *Streptomyces griseus* fournissait une aide de dénitrification à *Ralstonia pickettii* par l'entremise de protéases relâchées dans l'environnement. Pour arriver à cette conclusion, les chercheurs ont premièrement cultivé *R. pickettii* en présence de surnageant de *S. griseus* en conditions anaérobies. Cette astuce a été utilisée ici également, mais seulement en conditions aérobies. Pour confirmer que c'est bien une molécule secrétée ou l'absence d'un élément limitant qui est responsable de l'amélioration de la dénitrification de la souche NL23, il faudrait répéter l'expérience en conditions anaérobies. Deuxièmement, le

surnageant de *S. griseus* a été soumis à une ultracentrifugation pour créer une séparation des composantes par masse molaire. En testant l'effet de chaque fraction de molécules séparément, il est devenu possible d'identifier les plus massives comme étant responsables du taux supérieur de dénitrification, ce qui a mené à l'hypothèse des protéases. Ceci est une stratégie qui pourrait être intéressante pour identifier la nature du facteur d'aide de la souche JAM1. De plus, cette même étude a conclu que l'histidine jouait peut-être un rôle dans l'amélioration de l'activité dénitrifiante. Ceci pourrait être rapidement testé avec la souche NL23 également.

Un candidat d'un facteur aidant la souche NL23 est l'ectoïne. Il était connu que la souche JAM1 possède les gènes nécessaires à la production d'ectoïne, une particule osmoprotectrice. Il a été récemment déterminé dans le laboratoire que la souche JAM1 produisait de l'ectoïne dans le milieu de culture (données non-publiées). Lors de ce projet, les efforts pour démontrer l'effet d'osmoprotection de la souche JAM1 ont échoué (voir section 4.3.2), mais cela ne prouve pas que l'ectoïne ne joue pas de rôle. Des solutions possibles seraient de trouver un moyen de quantifier l'ectoïne directement ou de concentrer l'ectoïne produit par la souche JAM1 pour induire son effet. Il serait aussi possible que l'ectoïne n'est pas responsable des effets observés dans les situations planctoniques. Dans une étude à ce sujet, il a été déterminé que l'ectoïne était simplement trop diluée dans une culture en suspension liquide pour avoir un effet notable (Plakunov *et al.*, 2008). Dans ce cas, l'effet de l'ectoïne ne pourrait être observé que si une méthode était trouvée pour produire un biofilm avec les souche NL23 et JAM1.

## 6. Conclusion

Des conditions optimales de co-cultures des souches NL23 et JAM1 ont été développées, ce qui a permis d'optimiser les études suivantes. La problématique d'accumulation de nitrite par la réduction trop rapide du nitrate a été contournée par la baisse de nitrate initiale dans le milieu et l'ajustement du ratio des souches au moment de l'ensemencement. Les mêmes expériences ont aussi dévoilé plusieurs aspects du comportement des deux souches en conditions aérobies et anaérobies, où celles-ci performant la dénitrification.

Il a été démontré que les co-cultures des souches NL23 et JAM1 n'étaient pas nécessairement plus rapides en dénitrification que la souche NL23 en cultures pures. Toutefois, il a également été démontré que les co-cultures de la souche NL23 avec les souches mutantes de JAM1 qui ont la nitrate réductase Nar2 désactivée étaient capables d'une dénitrification plus rapide que la souche NL23 en cultures pures.

Les tentatives de formations d'un biofilm uniquement composé des souches NL23 et JAM1 ont échoué. Il semble que dans les conditions imposées, ces deux espèces bactériennes ne peuvent pas développer de biofilm.

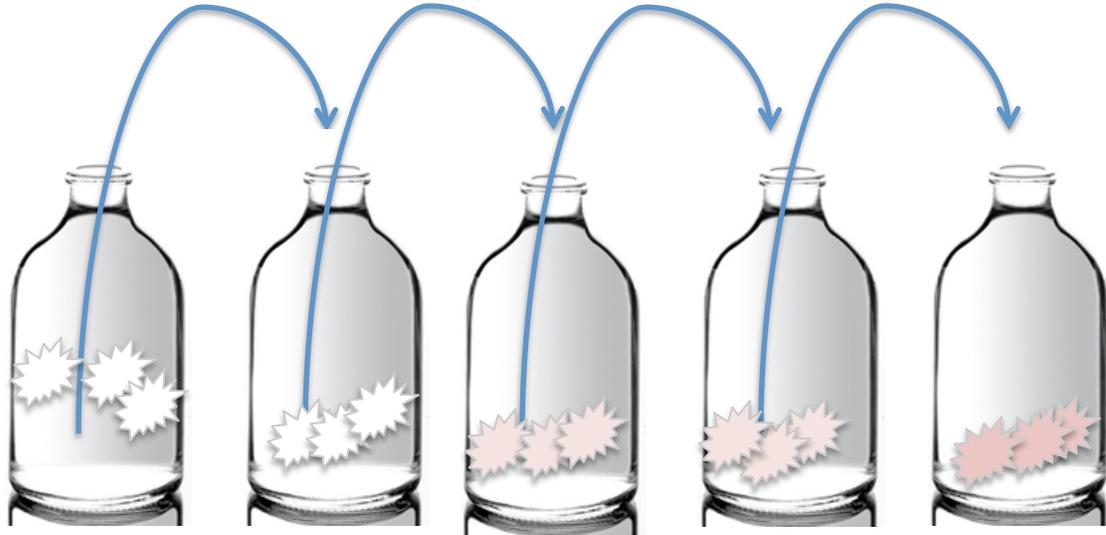
Il a été démontré que la souche JAM1 apporte une aide de croissance à la souche NL23 en conditions aérobies et une aide de réduction de nitrate en conditions anaérobies. La souche NL23 n'a pas fait de même pour la souche JAM1 dans les conditions d'expérience. Cependant, il n'a pu être démontré quelle est la nature de cet aide.

## Annexe

### **Protocole de création d'un biofilm**

Certaines expériences ont requis la formation d'un biofilm. Pour ce faire, des supports en plastiques ont été insérés dans les fioles de culture en présence de bactéries en suspension. Ces ensemencements sont ensuite incubés en conditions anaérobies. Puisque le développement d'un biofilm a pu prendre plusieurs semaines, le milieu dans lequel se trouvait la culture a dû être régulièrement changé pour y éviter la déplétion des ressources. Les supports ont donc été transférés régulièrement dans une nouvelle fiole contenant du milieu frais. Pour les co-cultures des souches JAM1 et NL23, la période de temps entre les transferts était d'environ une semaine.

Pour transférer les supports en évitant la contamination externe et entre les échantillons, tous les outils utilisés ont dû être stériles et le travail a dû être fait dans la hotte biologique. Les supports ont été enlevés des fioles à l'aide de pinces puis insérés dans les nouvelles fioles préalablement autoclavées. Celles-ci ont ensuite été fermées hermétiquement et l'oxygène à l'intérieur a été enlevé pour créer l'environnement d'anaérobiose. Dans le cas de ce projet, le processus a été répété jusqu'à ce qu'il est devenu évident qu'il n'y aurait pas formation de biofilm (4 semaines ou plus).



**Figure 7.1 : Schéma de la méthode de création d'un biofilm**

Le processus de création du biofilm implique le transfert à répétition de supports colonisés par des bactéries en anaérobies.

## Liste des références

- Anderson IC & Levine JS (1986) Relative Rates of Nitric Oxide and Nitrous Oxide Production by Nitrifiers, Denitrifiers, and Nitrate Respirers. *Applied and environmental microbiology* 51(5):938-945.  
Doi:
- 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. *The ISME journal* 4(10):1302-1313.  
Doi: 10.1038/ismej.2010.47
- Berks BC, Ferguson SJ, Moir JW & Richardson DJ (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochimica et biophysica acta* 1232(3):97-173.  
Doi:
- Blais M-A (2014) *Suivi de la contamination fécale dans la grande région de Montréal*. (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- 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.  
Doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.10.044
- De Roos AJ, Ward MH, Lynch CF & Cantor KP (2003) Nitrate in public water supplies and the risk of colon and rectum cancers. *Epidemiology* 14(6):640-649.  
Doi:
- Doronina N, Lee TD, Ivanova E & Trotsenko YA (2005) *Methylophaga murata* sp. nov.: a haloalkaliphilic aerobic methylotroph from deteriorating marble. *Microbiology* 74(4):440-447.  
Doi:
- Fesefeldt A, Kloos K, Bothe H, Lemmer H & Gliesche C (1998) Distribution of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium* spp. and other budding bacteria. *Canadian journal of microbiology* 44(2):181-186.  
Doi:
- Flemming HC & Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology* 8(9):623-633.  
Doi: 10.1038/nrmicro2415
- Gliesche C, Fesefeldt A & Hirsch P (2005) *Hyphomicrobium* Stutzer and Hartleb 1898, 76 AL. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*:476-494.  
Doi:
- Gregory LG, Bond PL, Richardson DJ & Spiro S (2003) Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker. *Microbiology* 149(1):229-237.  
Doi:

- Hajipour A, Moghadam N, Nosrati M & Shojasadati S (2011) Aerobic thermophilic treatment of landfill leachate in a moving-bed biofilm bioreactor. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 8(1):3-14.  
Doi:
- 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.  
Doi: 10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x
- Hino T, Nagano S, Sugimoto H, Toshi T & Shiro Y (2012) Molecular structure and function of bacterial nitric oxide reductase. *Biochimica et biophysica acta* 1817(4):680-687.  
Doi: 10.1016/j.bbabi.2011.09.021
- Janvier M & Grimont P (1995) The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch  $\gamma$  of Proteobacteria. *Research in microbiology* 146(7):543-550.  
Doi:
- Jebbar M, Talibart R, Gloux K, Bernard T & Blanco C (1992) Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol* 174(15):5027-5035.  
Doi:
- Kempf B & Bremer E (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of microbiology* 170(5):319-330.  
Doi:
- Labbé N (2007) *Caractérisation du dynamisme microbien du dénitrificateur marin du Biodôme de Montréal*. (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- Labbé N, Juteau P, Parent S & Villemur R (2003) Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the montreal biodome, Canada. *Microbial ecology* 46(1):12-21.  
Doi: 10.1007/s00248-002-1056-6
- 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.  
Doi: 10.1007/s00248-006-9168-z
- Labbé N, Parent S & Villemur R (2004) *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov., a novel  $\alpha$ -proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54(1):269-273.  
Doi:
- Labelle MA, Juteau P, Jolicoeur M, Villemur R, Parent S & Comeau Y (2005) Seawater denitrification in a closed mesocosm by a submerged moving bed biofilm reactor. *Water research* 39(14):3409-3417.  
Doi: 10.1016/j.watres.2005.06.001

- Laurinavichene T & Tsygankov A (2016) Different types of H<sub>2</sub> photoproduction by starch-utilizing co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy* 41(31):13419-13425.  
Doi:
- Le-Clech P, Chen V & Fane TA (2006) Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of membrane science* 284(1):17-53.  
Doi:
- Liang X, Lin L, Ye Y, Gu J, Wang Z, Xu L, Jin Y, Ru Q & Tian G (2015) Nutrient removal efficiency in a rice-straw denitrifying bioreactor. *Bioresource technology* 198:746-754.  
Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.083>
- Marazioti C, Kornaros M & Lyberatos G (2003) Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. *Water research* 37(6):1239-1251.  
Doi:
- Martineau C, Mauffrey F & Villemur R (2015) Comparative analysis of denitrifying activities of *Hyphomicrobium nitratorans*, *Hyphomicrobium denitrificans*, and *Hyphomicrobium zavarzinii*. *Applied and environmental microbiology* 81(15):5003-5014.  
Doi:
- Martineau C, Villeneuve C, Mauffrey F & Villemur R (2013) *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(Pt 10):3777-3781.  
Doi: 10.1099/ijs.0.048124-0
- Mauffrey F, Martineau C & Villemur R (2015) Importance of the Two Dissimilatory (Nar) Nitrate Reductases in the Growth and Nitrate Reduction of the Methylophilic Marine Bacterium *Methylophaga nitratreducenticrescens* JAM1. *Frontiers in microbiology* 6.  
Doi:
- Min K & Rickard A (2009) Coaggregation by the freshwater bacterium *Sphingomonas natatoria* alters dual-species biofilm formation. *Applied and environmental microbiology* 75(12):3987-3997.  
Doi:
- Mincer TJ & Aicher AC (2016) Methanol production by a broad phylogenetic array of marine phytoplankton. *PloS one* 11(3):e0150820.  
Doi:
- Mustakhimov I, Reshetnikov A, Fedorov D, Khmelenina V & Trotsenko YA (2012) Role of EctR as transcriptional regulator of ectoine biosynthesis genes in *Methylophaga thalassica*. *Biochemistry (Moscow)* 77(8):857-863.  
Doi:
- Mustakhimov I, Reshetnikov A, Khmelenina V & Trotsenko YA (2009) EctR—a novel transcriptional regulator of ectoine biosynthesis genes in the haloalkaliphilic methylophilic bacterium *Methylophaga alcalica*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. Springer, p 305-308.

- Pakula R & Freeman A (1996) A new continuous biofilm bioreactor for immobilized oil-degrading filamentous fungi. *Biotechnology and bioengineering* 49(1):20-25.  
Doi:
- Pauleta SR, Dell'Acqua S & Moura I (2013) Nitrous oxide reductase. *Coordination Chemistry Reviews* 257(2):332-349.  
Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.026>
- Plakunov VK, Zhurina MV & Beliaev SS (2008) [Resistance of the petroleum-oxidizing microorganism *Dietzia* sp. to hyperosmotic shock in reconstituted biofilms]. *Mikrobiologiya* 77(5):581-589.  
Doi:
- Prieme A, Braker G & Tiedje JM (2002) Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Applied and environmental microbiology* 68(4):1893-1900.  
Doi:
- Roediger M (1983) Activated sludge system. (Google Patents).
- Sauer T & Galinski EA (1998) Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and bioengineering* 59(1):128.  
Doi:
- Takaki K, Fushinobu S, Kim S-W, Miyahara M, Wakagi T & Shoun H (2008) *Streptomyces griseus* enhances denitrification by *Ralstonia pickettii* K50, which is possibly mediated by histidine produced during co-culture. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72(1):163-170.  
Doi:
- Van de Pas-Schoonen K, Schalk-Otte S, Haaijer S, Schmid M, Den Camp HO, Strous M, Kuenen JG & Jetten M (2005) Complete conversion of nitrate into dinitrogen gas in co-cultures of denitrifying bacteria. *Biochemical Society transactions* 33(1):205-209.  
Doi:
- Van Houdt R & Michiels CW (2005) Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology* 156(5):626-633.  
Doi:
- Villeneuve C (2012) *Caractérisation et classification des nouvelles espèces Methylophaga nitratireducenticrescens et Methylophaga frappieri*. (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- Villeneuve C, Martineau C, Mauffrey F & Villemur R (2013) *Methylophaga nitratireducenticrescens* sp. nov. and *Methylophaga frappieri* sp. nov., isolated from the biofilm of the methanol-fed denitrification system treating the seawater at the Montreal Biodome. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 63(Pt 6):2216-2222.  
Doi: 10.1099/ijs.0.044545-0
- Wang X, Chang VW & Tang CY (2016) Osmotic membrane bioreactor (OMBR) technology for wastewater treatment and reclamation: Advances, challenges, and prospects for the future. *Journal of Membrane Science* 504:113-132.  
Doi:

Ye Y, Ling N, Jiao R, Wu Q, Han Y & Gao J (2015) Effects of culture conditions on the biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* strains and distribution of genes involved in biofilm formation. *LWT - Food Science and Technology* 62(1, Part 1):1-6.

Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.035>

Zapras A, Brill J, Thüning M, Wünsche G, Heun M, Barzantny H, Hoffmann T & Bremer E (2013) Osmoprotection of *Bacillus subtilis* through import and proteolysis of proline-containing peptides. *Applied and environmental microbiology* 79(2):576-587.

Doi:

Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 61(4):533-616.

Doi: