

YAN GILBERT

**CARACTÉRISATION DE LA BIOMASSE  
NITRIFIANTE ET DÉNITRIFIANTE D'UN  
BIOFILTRE À SUPPORT ORGANIQUE**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en Génie Civil  
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CIVIL  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2006

## Résumé

Le surplus de production de lisier de porc dans certaines régions a mené au développement de technologies permettant de prendre en charge celui-ci, afin de réduire les risques de contamination pour l'environnement. La biofiltration à support organique, constitue une alternative au transport du lisier en traitant *in situ* ce polluant.

Le désir d'optimiser l'enlèvement de l'azote par ce procédé et le besoin d'acquérir de meilleures connaissances au niveau des transformations de ce composant dans le système ont conduit à l'élaboration d'un projet d'envergure visant à mieux comprendre le comportement de l'azote. Ce projet de doctorat s'inscrit donc dans cette mission et avait pour objectifs principaux de développer des outils analytiques permettant de caractériser la biomasse nitrifiante et dénitrifiante présente sur le support du procédé et d'utiliser ces outils pour suivre la colonisation de biofiltres pilotes.

La respirométrie azotée de type LSS et le blocage à l'acétylène ont donc été adaptés afin d'évaluer respectivement l'activité nitrifiante et dénitrifiante potentielle d'échantillons du milieu filtrant, tandis que le PCR en temps réel a été utilisé pour quantifier les microorganismes oxydant l'ammoniaque (AOB), *Nitrobacter*, *Nitrospira*, les bactéries dénitrifiantes possédant le gène *nirS* ainsi que les bactéries totales.

Trois biofiltres pilotes ont été montés, alimentés avec du lisier de porc ayant des ratios DBO<sub>5</sub>:NTK différents (3, 6 et 9) et suivis durant 180 jours. Ceux-ci étaient constitués de milieu filtrant organique surmonté d'une couche grossière, principalement composée de pouzzolane. Un échantillonnage régulier des affluents et des effluents gazeux et liquides des biofiltres, ainsi qu'à différentes hauteurs dans le procédé, ont permis d'observer le profil de la concentration des formes azotées dans les trois biofiltres et de déterminer, par bilan de masse, l'activité observée des couches de milieu filtrant. De plus, un échantillonnage du support a permis de caractériser la biomasse de l'azote dans chaque couche en évaluant son activité potentielle et en la quantifiant par PCR en temps réel.

La présence de bactéries nitrifiantes, mise en évidence par leur activité potentielle, a pu être notée dès le début de la période de suivi, mais la nitrification n'a pu être observée qu'aux

environs du 40<sup>e</sup> jour d'opération. Leur activité potentielle a augmenté graduellement jusqu'à la fin des essais. La dénitrification était présente durant toute la durée du suivi et semblait suivre un cycle de croissance-décroissance, particulièrement à partir du jour 80. Pour les trois conditions d'opération, le potentiel à nitrifier et à dénitrifier s'est retrouvé majoritairement en surface du procédé, dans les couches grossières des biofiltres, très peu de biomasse ayant colonisé le milieu filtrant organique. De plus, le potentiel à transformer l'azote, que ce soit par la nitrification ou la dénitrification, était toujours plus élevé que ce qui pouvait être observé dans le procédé. Ceci suggère qu'il serait possible d'optimiser l'enlèvement de l'azote en favorisant l'un ou l'autre des métabolismes.

Il existe un lien très fort entre la nitrification et la dénitrification, particulièrement dans les couches grossières des biofiltres. Également, de très fortes concentrations de bactéries dénitrifiantes possédant le gène *nirS* et de bactéries nitrifiantes ont été retrouvées dans les échantillons environnementaux de milieu filtrant provenant des biofiltres, proposant que ceux-ci croissent à proximité les uns des autres. Ces deux observations appuient fortement l'hypothèse d'une nitrification et dénitrification simultanée (NDS) à l'intérieur du procédé.

La quantification réalisée a permis de constater qu'on retrouve une plus forte concentration de *Nitrobacter* par rapport à *Nitrospira*, contredisant plusieurs études récentes ayant démontré la tendance inverse dans les procédés à biomasse en suspension traitant des effluents municipaux. De plus, il a été possible de démontrer que les bactéries dénitrifiantes possédant le gène *nirS* contribuent fortement à l'activité dénitrifiante potentielle mesurée à l'aide du blocage à l'acétylène. Par contre, la respirométrie azotée ne semble pas être en mesure de bien décrire l'évolution de chaque groupe impliqué dans la nitrification, mais de le faire plutôt pour le comportement global de cette biomasse.

Finalement, très peu de différences ont pu être observées au niveau des performances et de la colonisation des biofiltres alimentés à des ratios de 3 et 6. Par contre, celui alimenté à un ratio de 9 a montré des divergences majeures comparées aux deux autres. En effet, une hausse importante du pH, une perte d'efficacité au niveau de l'enlèvement de la DCO et de l'alcalinité et une forte coloration ont pu être observées après seulement quelques semaines d'opération. De plus, la biomasse nitrifiante, quoique démontrant un potentiel important, semble avoir eu de la difficulté à s'établir dans le procédé à ce ratio.

Les résultats obtenus pourront être utilisés pour mieux cibler les changements à apporter pour l'optimisation de l'enlèvement de l'azote. Également, ceux-ci permettent de mieux comprendre de quelle façon la biomasse impliquée dans les transformations de l'azote colonise le biofiltre ainsi que son comportement à l'intérieur du procédé.

## Abstract

Producing pig manure in excess in some regions has brought new technological advances allowing its treatment, in order to reduce contamination risks associated with its presence in natural ecosystems. BIOSOR<sup>TM</sup>-Manure, an organic biofilter, is an interesting alternative to its transportation as it treats pig manure on site.

The necessity to optimize nitrogen removal by this process and to get a better knowledge about its transformation inside the system has led to a scientific project aiming at those needs. This PhD project constituted a part of it and had as objectives to develop analytical methods to characterize nitrifying and denitrifying biomasses present on the biofilter media and to utilize them to monitor pilot biofilters colonization.

LSS nitrogen respirometry and acetylene blockage technique were adapted to respectively evaluate potential nitrifying and denitrifying activities of media samples, while real-time PCR was realized to quantify ammonia oxidizing bacteria (AOB), *Nitrobacter*, *Nitrospira*, denitrifying bacteria containing *nirS* gene and total bacteria.

Three pilot biofilters were installed, fed with pig manure having different BOD<sub>5</sub>:TKN ratios (3, 6 and 9) and monitored during 180 days. They were all the same, being made with an organic layer surmounted by a coarse layer (pozzolana). Regular sampling of liquid and gaseous influents and effluents and at different depths allowed the observation of each section for its concentration of gaseous and aqueous nitrogen. Those data were used to calculate a nitrogen mass balance in order to determine the observed activity in each layer. Moreover, regular media sampling was made to characterize the nitrogen biomass by evaluating its potential activity and its quantity.

Nitrifiers' presence, followed by potential nitrifying activity, was noted at the beginning of the monitoring period, but nitrification was only observed after approximately 40 days of operation. Its potential activity gradually increased until the end of the project. Denitrification was present all along and seemed to follow a growth-decay cycle, particularly after 80 days. For the three operational conditions, almost all of the potential nitrifying and denitrifying activities could be observed near the surface of the process, in the coarse layers, very little biomass being able to colonize the organic media. Moreover,

nitrogen removal potential was always higher as that could be seen in the process, both for nitrification and denitrification. It suggests that it is possible to optimize nitrogen removal by promoting one or another of the metabolism.

There was a strong correlation between nitrification and denitrification, particularly in the coarse layers. Also, we found high concentrations of *nirS* denitrifiers and nitrifying bacteria in the same environmental samples, proposing that those grow near each other. Both these observations support the hypothesis that there is simultaneous nitrification and denitrification (SND) inside this process.

Quantification showed higher concentration of *Nitrobacter* compared to *Nitrospira*, contradicting previous recent studies that demonstrated the reverse trend in suspended biomass processes treating urban wastewaters. Also, it has been possible to find that *nirS* denitrifiers strongly contributed to the potential denitrifying activity, evaluated with the acetylene blockage technique. However, nitrogen respirometry did not seem to describe well each nitrifying group evolution, but only allowed to understand the global behavior of this biomass.

Finally, very few differences could be observed between biofilters fed with 3 and 6 BOD<sub>5</sub>:TKN ratios, both for performances and colonization. However, the biofilter fed with a higher ratio (9) showed important dissimilarities compared to the others. In fact, an important increased of pH, a decrease of efficiency for COD and alkalinity removal and a strong brown coloration could be observed only a few weeks after the start-up. Moreover, nitrifying biomass, while showing a good potential activity, seemed to have difficulties to colonize the system.

Results could be used, in order to optimize nitrogen removal, to change operational conditions a better way, know knowing what the biomass is capable of and where it can be found in the process. Also, these data allow a better understanding of how the nitrifying and denitrifying biomass colonizes the biofilters and of its behavior inside the system.

## **Avant-Propos**

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux personnes qui m'ont appuyé et apporté leurs nombreux conseils judicieux, essentiels à la réussite de ce travail, réalisé au Centre de Recherche Industrielle du Québec (CRIQ), à Sainte-Foy.

Je tiens à exprimer ma gratitude au CRIQ et au Bureau International de l'Université Laval pour leur support financier durant la réalisation de ce projet de doctorat.

Je remercie mon directeur de recherche, Monsieur Paul Lessard, Professeur et directeur de programme de 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> cycle au sein du Département de Génie Civil à l'Université Laval, qui m'a supporté tout au long de mes études universitaires lors de stages, de la maîtrise et du doctorat.

Qu'il sache que son enthousiasme, lorsque je lui ai annoncé ma décision de commencer des études doctorales, a été le dernier coup de pouce qui m'a convaincu que j'avais pris la bonne décision. Il a su me communiquer son esprit critique et m'a permis d'augmenter mon niveau d'exigences quant à la réalisation de rapports, de présentations et du travail lui-même. Ses nombreux conseils, sa continuelle présence et son implication dans le suivi du travail ont été entièrement appréciés. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Je ne pourrais oublier mon co-directeur de recherche, Monsieur Yann Le Bihan, agent de recherche au CRIQ, avec qui j'ai passé des heures à discuter du projet, de notions académiques et d'autres sujets tout aussi pertinents pour mon développement personnel. Sa grande patience, son universelle disponibilité à répondre à mes mille et une questions quotidiennes ont profité à ce projet comme il ne peut l'imaginer. Ses encouragements, ses conseils judicieux et appropriés, son enthousiasme et son aide ne sont que quelques exemples me permettant de dire à quel point j'ai apprécié sa présence. Qu'il sache qu'il pourra trouver l'expression de ma gratitude et toute mon amitié.

Je tiens à remercier également Monsieur Gerardo Buelna, agent de recherche au CRIQ, pour ses précieux conseils et ses encouragements, ainsi qu'Hamel Benmoussa, Rino Dubé, et Marie-Louise Tremblay, agents de recherche au CRIQ.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Geneviève Aubry, étudiante au doctorat avec qui j'ai travaillé sur les mêmes unités de biofiltration. Les moments privilégiés où nous avons discuté de nos vies et du projet ont été particulièrement appréciés. Je la remercie également d'avoir accompli une très grande partie du travail lors du suivi du procédé.

Je remercie le personnel et les étudiants rencontrés au CRIQ: Monsieur Thierry Mezzana, étudiant à la maîtrise, avec qui j'ai eu des discussions corsées sur la politique et sur l'économie. Même s'il n'a pas réussi à me convaincre sur la plupart des points, il a su me montrer l'autre côté de la médaille de notre société. Je le remercie également pour le bon temps passé à Toulouse lors de notre stage effectué en France. Madame Ursule Plourde, Madame Colette Adnot-Arial, Monsieur Jean Nadeau, Madame Odette Petitclerc, Madame Johanne Gosselin, Monsieur Éric Légaré, Monsieur Daniel Boily et particulièrement Madame Louise Thibeault pour leur compétence, leur compréhension, leur aide et surtout pour le bon temps qu'il m'ont permis de passer au CRIQ et dans les laboratoires.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr Caroline Duchaine ainsi qu'à ceux travaillant à son laboratoire, Nathalie, Steve, Daniel, Valérie, Christian et particulièrement Marc Veillette, pour leur aide, leurs conseils et leur présence qui ont été hautement appréciés.

Je remercie également le Dr Richard Villemur, de l'Institut Armand Frappier, pour ses précieux conseils et le don de souches bactériennes. Qu'il sache que son aide a été particulièrement appréciée et qu'il m'a permis de recentrer mes efforts.

Merci également à Monsieur Luc Trudel, du Département de Microbiologie de l'Université Laval, pour avoir eu la gentillesse de prendre de son temps pour des conseils et m'aider à faire avancer le projet.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Narbonne, en France, pour son accueil chaleureux. Merci à Messieurs Jean-Jacques Godon et Jean-Philippe Delgenes pour m'avoir permis de réaliser un stage à cet institut. Merci également au Dr Nathalie Wery pour son support, ses conseils et son amitié qui est entièrement partagée. Je ne pourrai oublier Odile,

Raoul, Laurent, Romain, Consuelo, Arnaud, Pierre et Nicolas avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

Je tiens plus particulièrement à remercier ma famille pour son support. Merci à ma mère d'avoir essayé de comprendre mon projet même si ce n'était pas toujours facile et à mon père, pour m'avoir écouté et m'avoir accepté comme un ami lors de nos voyages de pêche et de chasse. Cela m'a permis de refaire mes énergies dans les périodes plus difficiles du projet.

Finalement, Merci à ma femme, Isabelle, d'avoir simplement été avec moi et de m'avoir supporté pleinement dans mon choix de faire un doctorat. Merci aussi d'avoir mis au monde notre premier petit trésor, Louis-Philip.

***Si l'on ne croit à rien, si rien n'a de sens et  
si nous ne pouvons affirmer aucune valeur,  
tout est possible et rien n'a d'importance.***

***La seule règle qui soit originale  
aujourd'hui: apprendre à vivre et à mourir,  
et pour être homme, refuser d'être Dieu.***  
Albert Camus, L'homme révolté (1951)

# Table des matières

RÉSUMÉ.....	I
ABSTRACT.....	IV
AVANT-PROPOS.....	VI
TABLE DES MATIÈRES.....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES FIGURES .....	XV
LISTE DES SYMBOLES.....	XVIII
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 MISE EN CONTEXTE.....	1
1.2 REVUE DE LITTÉRATURE .....	4
1.2.1 <i>Biofiltration sur support organique</i> .....	4
1.2.2 <i>Caractéristiques du lisier de porc</i> .....	8
1.2.3 <i>Biologie du cycle de l'azote</i> .....	9
1.2.3.1 Assimilation.....	10
1.2.3.2 Ammonification.....	10
1.2.3.3 Fixation de l'azote .....	11
1.2.3.4 Nitrification.....	11
1.2.3.5 Dénitrification.....	13
1.2.3.6 Chimiodénitrification.....	16
1.2.4 <i>Caractérisation de la biomasse</i> .....	17
1.2.4.1 Quantification de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante.....	17
1.2.4.2 Évaluation de l'activité de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante .....	25
1.3 PROBLÉMATIQUE .....	27
1.4 OBJECTIFS DU PROJET .....	29
<b>CHAPITRE 2 PRÉPARATION DE LA QUANTIFICATION DES MICROORGANISMES NITRIFIANTS ET DÉNITRIFIANTS PAR PCR EN TEMPS RÉEL .....</b>	<b>32</b>
2.1 INTRODUCTION .....	32
2.2 TRAVAUX RÉALISÉS ET RÉSULTATS .....	33
2.2.1 <i>Clonage des amplicons</i> .....	33
2.2.2 <i>Conception des courbes étalons</i> .....	39
2.2.3 <i>Effet des impuretés sur l'efficacité de la PCR en temps réel</i> .....	44
2.3 CONCLUSION .....	46

<b>CHAPITRE 3 DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES POUR L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DES BACTÉRIES NITRIFIANTES ET DÉNITRIFIANTES .....</b>	<b>47</b>
3.1 INTRODUCTION .....	47
3.1.1 <i>Activité des bactéries nitrifiantes: respirométrie azotée</i> .....	48
3.1.2 <i>Activité des bactéries dénitrifiantes: blocage de l'oxyde nitreux réductase par l'acétylène</i> .....	49
3.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	52
3.2.1 <i>Vérification de l'applicabilité de la respirométrie pour évaluer l'activité des bactéries nitrifiantes du milieu filtrant</i> .....	52
3.2.1.1 Effet du chlorate et de l'azide sur l'activité hétérotrophe .....	53
3.2.1.2 Effet du chlorate et de l'azide sur la respiration endogène .....	54
3.2.1.3 Compartimentation des activités hétérotrophes, nitritantes et nitratantes .....	55
3.2.1.4 Vérification de la sensibilité du test .....	55
3.2.2 <i>Vérification de l'applicabilité du blocage à l'acétylène adapté pour évaluer l'activité des bactéries dénitrifiantes du milieu filtrant</i> .....	55
3.2.2.1 Montage de colonnes de biofiltration enrichies de dénitrifiantes .....	55
3.2.2.2 Montage et opération d'une cellule permettant d'évaluer l'activité des organismes dénitrifiants .....	57
3.2.2.3 Vérification de la sensibilité de la méthode .....	59
3.2.2.4 Évaluation de la production de N <sub>2</sub> O par les organismes nitrifiants .....	61
3.2.2.5 Vérification de la variabilité de l'essai .....	62
3.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	63
3.3.1 <i>Applicabilité de la respirométrie azotée pour évaluer l'activité des bactéries nitrifiantes du milieu filtrant</i> .....	63
3.3.1.1 Effet du chlorate et de l'azide sur la biomasse .....	63
3.3.1.2 Compartimentation de l'essai respirométrique .....	65
3.3.1.3 Vérification de la sensibilité du test .....	66
3.3.2 <i>Vérification de l'applicabilité du blocage à l'acétylène pour évaluer l'activité des bactéries dénitrifiantes</i> .....	67
3.3.2.1 Concentration des gaz à l'entrée de la cellule .....	67
3.3.2.2 Vérification de la sensibilité de la méthode .....	68
3.3.2.3 Production de N <sub>2</sub> O par les organismes nitrifiants .....	71
3.3.2.4 Vérification de la variabilité de la méthode .....	73
3.4 CONCLUSION .....	76
<b>CHAPITRE 4 CARACTÉRISATION MICROBIOLOGIQUE D'UNITÉS PILOTES DE BIOFILTRATION DE LISIER DE PORC .....</b>	<b>78</b>
4.1 INTRODUCTION .....	78
4.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	79
4.2.1 <i>Montage et suivi des unités pilotes</i> .....	79
4.2.1.1 Description des biofiltres .....	79
4.2.1.2 Caractéristiques du lisier utilisé .....	82
4.2.1.3 Échantillonnage et analyses .....	84
4.2.2 <i>Quantification des microorganismes nitrifiants et dénitrifiants présents sur le milieu filtrant des biofiltres pilotes par PCR en temps réel</i> .....	87

4.2.3	<i>Évaluation de l'activité nitrifiante potentielle de la biomasse présente sur le milieu filtrant des biofiltres pilotes par respirométrie azotée</i> .....	88
4.2.4	<i>Évaluation de l'activité dénitrifiante potentielle de la biomasse présente sur le milieu filtrant des biofiltres pilotes par blocage à l'acétylène</i> .....	89
4.3	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	90
4.3.1	<i>Performances épuratoires générales des biofiltres pilotes</i> .....	90
4.3.2	<i>Analyse de l'ensemble des résultats</i> .....	96
4.3.3	<i>Dénombrement des microorganismes nitrifiants et dénitrifiants présents sur le milieu filtrant des biofiltres pilotes par PCR en temps réel</i> .....	97
4.3.3.1	Relation entre le pourcentage de microorganismes visés par rapport à la biomasse totale et sa quantification absolue par PCR en temps réel .....	97
4.3.3.2	Limites de la quantification par PCR en temps réel .....	100
4.3.3.3	Quantification de <i>Nitrospira</i> .....	101
4.3.4	<i>Colonisation verticale des couches de milieu filtrant</i> .....	103
4.3.5	<i>Relation entre les activités potentielle et observée</i> .....	108
4.3.6	<i>Relation entre la nitrification et la dénitrification dans les biofiltres pilotes</i> .....	110
4.3.7	<i>Relation entre la quantité de microorganismes évaluée par PCR en temps réel et leur activité potentielle</i> .....	115
4.3.8	<i>Effet du rapport DBO<sub>5</sub>:NTK sur la transformation de l'azote</i> .....	119
4.3.8.1	Performances générales des biofiltres pilotes alimentés sous trois conditions de DBO <sub>5</sub> :NTK .....	120
4.3.8.2	Effet du rapport DBO <sub>5</sub> :NTK sur l'activité nitrifiante et dénitrifiante .....	127
4.4	<b>CONCLUSION</b> .....	133
	<b>CHAPITRE 5 CONCLUSIONS GÉNÉRALES</b> .....	136
5.1	<b>GÉNÉRALITÉS</b> .....	136
5.2	<b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES</b> .....	137
5.3	<b>LIMITATIONS DE L'ÉTUDE</b> .....	138
5.4	<b>ÉTUDES FUTURES</b> .....	140
	<b>ANNEXE 1. CLASSIFICATION DES TOURBES SELON L'ÉCHELLE DE "VON POST"</b> .....	161
	<b>ANNEXE 2. MÉTHODES UTILISÉES</b> .....	163
A2.1	- <b>ÉVALUATION DE LA TENEUR EN EAU (TEE) D'UN ÉCHANTILLON</b> .....	164
A2.2	- <b>PRÉPARATION D'UNE SOLUTION D'AGAROSE POUR L'ÉLECTROPHORÈSE</b> .....	165
A2.3	- <b>PRÉPARATION DU TAMPON DE CHARGEMENT</b> .....	166
A2.4	- <b>PRÉPARATION DU TAMPON DE MIGRATION TBE</b> .....	166
A2.5	- <b>PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET ÉLECTROPHORÈSE</b> .....	167
A2.6	- <b>DIGESTION À LA DNASE</b> .....	168
A2.7	- <b>PROTOCOLE DE CLONAGE D'AMPLICONS</b> .....	169
A2.8	- <b>PRÉPARATION DES MILIEUX LB POUR L'ISOLATION DES CLONES</b> .....	170
A2.9	- <b>EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES DES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX</b> .....	171

<b>ANNEXE 3. ANALYSES STATISTIQUES DES RÉSULTATS</b> .....	<b>172</b>
A3.1 - TESTS DE L'EGALITE DES MOYENNES .....	173
A3.2 - METHODE DE HUBER.....	183
A3.3 - PRÉCISION DE LA MÉTHODE .....	184
A3.4 - TEST DU COEFFICIENT DE CORRÉLATION (T-TEST).....	185
A3.5 - ANALYSES STATISTIQUES DES DONNÉES DU CHAPITRE 3 .....	187
A3.6 – TEST DE PEARSON.....	198
<b>ANNEXE 4. EXEMPLES DE CALCULS</b> .....	<b>200</b>
A4.1 - TRANSFORMATION DES PPM EN CONCENTRATION GAZEUSE (P/V) .....	201
A4.2 - DÉTERMINATION DU NOMBRE DE COPIES D'UN VECTEUR.....	202
A4.3 - SEUIL MINIMAL DE DÉTECTION D'UN GÈNE.....	204
A4.4 - DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ POTENTIELLE D'UNE COUCHE DE SUPPORT.....	206
A4.5 – CALCUL DU BILAN DE MASSE SUR L'AZOTE D'UNE COUCHE DE MILIEU FILTRANT .....	208
<b>ANNEXE 5. INFORMATION CONCERNANT LE PCR</b> .....	<b>209</b>
A5.1 - CONDITIONS DE RÉACTIONS DU PCR CONVENTIONNEL .....	210
A5.2 - CONDITIONS DE RÉACTIONS DU PCR EN TEMPS RÉEL .....	211
A5.3 - SÉQUENCE DES AMORCES ET DES SONDÉS UTILISÉES .....	212
A5.4 - SOLUTIONS STOCK UTILISÉES LORS DES PCR.....	213
A5.5 - SÉQUENCES DES INSERTS POUR LES CLONES TESTÉS .....	214
<b>ANNEXE 6. PHOTOS DES MONTAGES</b> .....	<b>216</b>
<b>ANNEXE 7. NOTE TECHNIQUE SOUS PRESSE DANS JEES</b> .....	<b>224</b>

## Liste des tableaux

TABLEAU 1-1. CARACTÉRISATION DU LISIER DE PORC BRUT.....	8
TABLEAU 2-1. MICROORGANISMES VISÉS ET MÉTHODES UTILISÉES.....	33
TABLEAU 2-2. DOSAGE DES EXTRAITS PLASMIDIQUES.....	38
TABLEAU 2-3. RÉSULTATS DES PCR EN TEMPS RÉEL SUR <i>NITROBACTER</i> , <i>NIR5</i> ET <i>NIRK</i> .....	43
TABLEAU 2-4. INFLUENCE DES IMPURETÉS SUR L'EFFICACITÉ DE L'AMPLIFICATION DE L'ADNR 16S DE <i>NITROSPIRA</i> .....	45
TABLEAU 3-1. EFFET DES INHIBITEURS DE NITRATANTES SUR LA BIOMASSE .....	64
TABLEAU 3-2. ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE LA BIOMASSE LORS D'ESSAIS RESPIROMÉTRIQUES VISANT LA COMPARTIMENTATION DU TEST .....	66
TABLEAU 3-3. ACTIVITÉS DÉNITRIFIANTES POTENTIELLES POUR L'ÉVALUATION DE LA VARIABILITÉ DE LA MÉTHODE DU BLOCAGE À L'ACÉTYLÈNE .....	75
TABLEAU 4-1. CARACTÉRISTIQUES DES LISIERS UTILISÉS POUR L'ALIMENTATION DES BIOFILTRES.....	83
TABLEAU 4-2. CHARGES APPLIQUÉES SUR LES BIOFILTRES PILOTES .....	84
TABLEAU 4-3. MÉTHODES UTILISÉES POUR L'ANALYSE DES PARAMÈTRES À L'EFFLUENT ET À L'AFFLUENT DES BIOFILTRES PILOTES .....	86
TABLEAU 4-4. EFFICACITÉ MOYENNE D'ÉPURATION DES BIOFILTRES PILOTES ÉVALUÉE PENDANT 180 JOURS.....	90
TABLEAU 4-5. CONCENTRATION MOYENNE À L'AFFLUENT ET À L'EFFLUENT DES BIOFILTRES PILOTES DES COMPOSÉS NON AZOTÉS ÉVALUÉE DURANT TOUTE LA PÉRIODE DE SUIVI .....	92
TABLEAU 4-6. NOMBRE DE COPIES DES GÈNES DANS LE GÉNOME DES MICROORGANISMES VISÉS .....	100

## Liste des Figures

FIGURE 1.1. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU BIOSOR <sup>MD</sup> -LISIER .....	6
FIGURE 1.2. CYCLE DE L'AZOTE .....	9
FIGURE 1.3. SCHÉMA TYPIQUE D'UNE RÉACTION DE PCR .....	20
FIGURE 1.4. PHASE D'ÉLONGATION LORS D'UNE RÉACTION DE PCR EN TEMPS RÉEL: MÉTHODE SYBRGREEN VS TAQMAN .....	21
FIGURE 1.5. COURBE D'AMPLIFICATION D'UN ÉTALON D'ADN LORS D'UN PCR EN TEMPS RÉEL .....	22
FIGURE 1.6. EXEMPLE DE COURBE ÉTALON OBTENUE LORS D'UNE RÉACTION DE PCR EN TEMPS RÉEL .....	23
FIGURE 2.1. CLONAGE DE L'AMPLICON POUR L'ÉLABORATION DE LA COURBE ÉTALON .....	34
FIGURE 2.2. VÉRIFICATION DE L'AMPLIFICATION PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR AGAROSE 1% ..	35
FIGURE 2.3. VÉRIFICATION DE L'INSERT DES CLONES PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR AGAROSE 1% .....	37
FIGURE 2.4. AMPLIFICATION PCR EN TEMPS RÉEL DES ÉTALONS <i>NITROBACTER</i> .....	40
FIGURE 2.5. AMPLIFICATION PCR EN TEMPS RÉEL DES ÉTALONS <i>NIRS'</i> .....	40
FIGURE 2.6. AMPLIFICATION PCR EN TEMPS RÉEL DES ÉTALONS TOTAUX .....	41
FIGURE 2.7. AMPLIFICATION PCR EN TEMPS RÉEL DES ÉTALONS <i>NITROSPIRA</i> .....	41
FIGURE 2.8. AMPLIFICATION PCR EN TEMPS RÉEL DES ÉTALONS AOB PAR TAQMAN <sup>®</sup> .....	41
FIGURE 2.9. AMPLIFICATION PCR EN TEMPS RÉEL DES ÉTALONS AOB PAR SYBR <sup>®</sup> GREEN ...	41
FIGURE 2.10. COURBES DE FUSION DE L'AMPLIFICATION PCR EN TEMPS RÉEL DES ÉTALONS AOB .....	42
FIGURE 2.11. COURBES DE FUSION DE L'AMPLIFICATION PCR EN TEMPS RÉEL DES ÉTALONS TOTAUX .....	42
FIGURE 3.1. DESCRIPTION DE LA COMPARTIMENTATION DE LA PRODUCTION DE N <sub>2</sub> O LORS DU BLOCAGE AU C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> .....	51
FIGURE 3.2. SCHÉMA DU RESPIROMÈTRE UTILISÉ .....	53
FIGURE 3.3. SCHÉMA DES COLONNES DE BIOFILTRATION POUR L'ENRICHISSEMENT DE BACTÉRIES DÉNITRIFIANTES .....	57
FIGURE 3.4. DIMENSIONS DE LA CELLULE POUR L'ACTIVITÉ DÉNITRIFIANTE .....	58
FIGURE 3.5. SCHÉMA DU MONTAGE POUR ÉVALUER L'ACTIVITÉ DÉNITRIFIANTE POTENTIELLE .....	59
FIGURE 3.6. EXEMPLE D'ESSAIS RESPIROMÉTRIQUES RÉALISÉ SUR UN ÉCHANTILLON DE MILIEU FILTRANT ORGANIQUE PROVENANT D'UN BIOFILTRE TRAITANT DU LISIER DE PORC .....	63
FIGURE 3.7. VARIATION DE LA RESPIRATION AZOTÉE EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE BIOMASSE .....	67
FIGURE 3.8. COURBES TYPES OBTENUES LORS DE LA VÉRIFICATION DE LA SENSIBILITÉ DU BLOCAGE À L'ACÉTYLÈNE .....	69
FIGURE 3.9. EXEMPLE DE PRODUCTION CUMULATIVE DE N-N <sub>2</sub> O D'UN RÉPLICAT DE 150 G HUMIDE SOUMIS À 10 KPA D'ACÉTYLÈNE .....	69
FIGURE 3.10. RELATION ENTRE LA QUANTITÉ DE N <sub>2</sub> O PRODUITE EN PRÉSENCE DE 10 KPA D'ACÉTYLÈNE ET LA QUANTITÉ DE BIOMASSE .....	70

FIGURE 3.11. RELATION ENTRE LA MASSE SÈCHE ET LA MASSE HUMIDE DE MILIEU FILTRANT .....	71
FIGURE 3.12. RÉACTION DE LA BIOMASSE SUITE À L'AJOUT SUCCESSIVE DE C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> À 10 PA ET 10 KPA .....	72
FIGURE 3.13. COURBES DE PRODUCTION DE N <sub>2</sub> O SUR DES RÉPLICATS DE 100G HUMIDES.....	74
FIGURE 3.14. RÉPÉTITIVITÉ DES ESSAIS SELON LA MASSE CUMULATIVE DE N-N <sub>2</sub> O.....	75
FIGURE 4.1. SCHÉMA D'UNE COLONNE PILOTE DE BIOFILTRATION .....	80
FIGURE 4.2. SCHÉMA D'UNE COUCHE DE MILIEU FILTRANT POUR LE CALCUL DU BILAN SUR L'AZOTE .....	85
FIGURE 4.3. COMPARAISON DE LA COULEUR DE L'EFFLUENT DES BIOFILTRES PILOTES AU JOUR 121 .....	91
FIGURE 4.4. ÉVOLUTION DU pH, DE LA DCO ET DE L'ALCALINITÉ À L'EFFLUENT DU BIOFILTRE 3 .....	92
FIGURE 4.5. TAUX DE SORTIE DE NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> DANS L'EFFLUENT LIQUIDE ET TAUX DE DÉGAZAGE DE N <sub>2</sub> O ET DE NH <sub>3</sub> PAR LES BIOFILTRES PILOTES.....	95
FIGURE 4.6. RELATION ENTRE LE POURCENTAGE DE <i>nirS</i> , DE AOB ET DE <i>NITROBACTER</i> ET LEUR DÉNOMBREMENT ABSOLU DANS L'ADN GÉNOMIQUE EXTRAIT DU MILIEU FILTRANT DE TOUS LES BIOFILTRES PILOTES CONFONDUS .....	99
FIGURE 4.7. ACTIVITÉ NITRIFIANTE POTENTIELLE DANS LES COUCHES DU BIOFILTRE 2.....	104
FIGURE 4.8. ACTIVITÉ DÉNITRIFIANTE POTENTIELLE DANS LES COUCHES DU BIOFILTRE 2... 105	105
FIGURE 4.9. PROFIL DE CONCENTRATION DE LA DCO ET DE L'AZOTE SOLUBLE DANS LES COUCHES DU BIOFILTRE 2 AU 140 <sup>E</sup> JOUR D'OPÉRATION .....	105
FIGURE 4.10. QUANTITÉ DE GÈNES <i>nirS</i> DANS LES COUCHES DU BIOFILTRE 2.....	106
FIGURE 4.11. QUANTITÉ DU GÈNE ADN <sub>r</sub> 16S DE <i>NITROBACTER</i> DANS LES COUCHES DU BIOFILTRE 2 .....	107
FIGURE 4.12. COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ DÉNITRIFIANTE POTENTIELLE ET OBSERVÉE DANS LA COUCHE GROSSIÈRE DU BIOFILTRE 2 .....	108
FIGURE 4.13. COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ NITRIFIANTE POTENTIELLE ET OBSERVÉE DANS LA COUCHE GROSSIÈRE DU BIOFILTRE 2 .....	109
FIGURE 4.14. RELATION ENTRE LA NITRIFICATION ET LA DÉNITRIFICATION OBSERVÉE DANS LES COUCHES GROSSIÈRES DU BIOFILTRE 2 .....	112
FIGURE 4.15. RELATION ENTRE L'ACTIVITÉ NITRIFIANTE ET DÉNITRIFIANTE POTENTIELLE DANS LES COUCHES GROSSIÈRES DU BIOFILTRE 2.....	113
FIGURE 4.16. RELATION ENTRE LA NITRIFICATION ET LA DÉNITRIFICATION OBSERVÉE DANS LES COUCHES DE MILIEU FILTRANT ORGANIQUE DU BIOFILTRE 2 .....	114
FIGURE 4.17. RELATION ENTRE L'ACTIVITÉ NITRIFIANTE ET DÉNITRIFIANTE POTENTIELLE DANS LES COUCHES DE MILIEU FILTRANT ORGANIQUE DU BIOFILTRE 2.....	115
FIGURE 4.18. ÉVOLUTION DE L'ACTIVITÉ DÉNITRIFIANTE POTENTIELLE ET LE NOMBRE DE COPIES DU GÈNE <i>nirS</i> DANS LA COUCHE DE POUZZOLANE DU BIOFILTRE 2.....	116
FIGURE 4.19. ÉVOLUTION DE L'ACTIVITÉ NITRIFIANTE POTENTIELLE ET LE NOMBRE DE COPIES DE L'ADN <sub>r</sub> 16S DE <i>NITROBACTER</i> DANS LA COUCHE DE POUZZOLANE DU BIOFILTRE 2 .....	117
FIGURE 4.20. ÉVOLUTION DE L'ACTIVITÉ NITRIFIANTE POTENTIELLE ET LE NOMBRE DE COPIES DE L'ADN <sub>r</sub> 16S DES AOB DANS LA COUCHE AB DU BIOFILTRE 1.....	119
FIGURE 4.21. VARIATION DE LA CONCENTRATION DES GAZ À LA SORTIE PRINCIPALE DE L'AÉRATION DES BIOFILTRES PILOTES .....	122
FIGURE 4.22. ÉVOLUTION DE L'AZOTE AMMONIACAL À LA SORTIE DES BIOFILTRES PILOTES.....	123

FIGURE 4.23. ÉVOLUTION DES FORMES OXYDÉES DE L'AZOTE À LA SORTIE DES BIOFILTRES PILOTES .....	125
FIGURE 4.24. PRODUCTION NORMALISÉE DE N-NO <sub>3</sub> MESURÉE À L'EFFLUENT LIQUIDE DES BIOFILTRES PILOTES.....	126
FIGURE 4.25. ÉVOLUTION DU pH À LA SORTIE DES BIOFILTRES PILOTES .....	126
FIGURE 4.26. ÉVOLUTION DE LA DCO À LA SORTIE DES BIOFILTRES PILOTES.....	127
FIGURE 4.27. ACTIVITÉ NITRIFIANTE POTENTIELLE DANS LES COUCHES GROSSIÈRES DES BIOFILTRES PILOTES ÉVALUÉE PAR RESPIROMÉTRIE.....	128
FIGURE 4.28. ACTIVITÉ DÉNITRIFIANTE POTENTIELLE DANS LES COUCHES GROSSIÈRES DES BIOFILTRES PILOTES.....	129
FIGURE 4.29. RELATION ENTRE L'ACTIVITÉ DÉNITRIFIANTE POTENTIELLE ET OBSERVÉE DANS LES BIOFILTRES PILOTES .....	131
FIGURE 4.30. RELATION ENTRE L'ACTIVITÉ DÉNITRIFIANTE POTENTIELLE ET OBSERVÉE NORMALISÉE.....	132

## Liste des symboles

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : ADN codant pour un ARN ribosomal

AOB : Ammonia oxidizing bacteria (bactérie oxydatrice d'ammoniaque / nitritante)

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

ATCC : American Type Culture Collection

ATU : Allylthiourée

C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> : Acétylène

CO : Monoxyde de carbone

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

COT : Carbone organique total

CRIQ : Centre de Recherche Industrielle du Québec

CQVB : Centre Québécois de Valorisation de la Biomasse

CV : Coefficient de variation

DBO<sub>5</sub> : Demande biologique en oxygène après 5 jours

DCO : Demande chimique en oxygène

FISH : Fluorescence *in situ* hybridization (Hybridation fluorescente *in situ*)

FPPQ : Fédération des Producteurs de Porcs du Québec

HPLC : Hi-pressure liquid chromatography (Chromatographie en phase liquide sous haute pression)

IPTG : isopropyl β-D-galactopyranoside

IRDA : Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement

LB : Luria-Bertani

LPM : Litre par minute

MES : Matière en suspension

MS : Matière sèche

MVES : Matière volatile en suspension

N- : Azote associé à la molécule visée

N<sub>2</sub> : Azote moléculaire

N<sub>2</sub>O : Oxyde nitreux

NDS : Nitrification-Dénitrification Simultanée

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou NH<sub>3</sub> : Ammoniacal aqueux ou gazeux

*nirS* et *nirK* : Gènes de la nitrite réductase

NO : Oxyde nitrique

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : Nitrate

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : Nitrite

NOB : Nitrite oxidizing bacteria (Bactérie oxydatrice de nitrite / nitratante)

NOS : Enzyme N<sub>2</sub>O réductase

NPP : Nombre le plus probable

NTK : Azote total Kjeldahl

pb : paire de bases

PCR : Polymerase chain reaction (Réaction de la polyméase en chaîne)

P<sub>tot</sub> : Phosphore total

PVC : Polyvinyle chloré

rO<sub>2</sub> : Taux de consommation de l'oxygène

rO<sub>2</sub>N : Taux de consommation de l'oxygène en présence d'azote

R- : Matière organique associée à la molécule visée

T<sub>m</sub> : Température de fusion

X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl β-D-galactopyranoside

## **Publications et communications**

### **reliées à ce travail**

#### **Publications**

Gilbert, Y., Le Bihan, Y., Aubry, G., Veillette, M., Duchaine, C. and Lessard P. (Soumis). Microbiological and molecular characterization of denitrification in a biofilter treating pig manure. *Applied and Environmental Microbiology*.

Gilbert, Y., Le Bihan, Y., Aubry, G., Veillette, M., Duchaine, C. and Lessard P. (En préparation). Nitrification monitoring in a biofilter treating pig manure. *Water Research*.

Gilbert, Y., Le Bihan, Y., Aubry, G., Duchaine, C. and Lessard, P. 2006. Nitrifying and Denitrifying Biomass Characterization of an Organic Biofilter Treating Pig Manure In: R. Stuetz and T.T. Lim (Editors), *Water and Environmental Management Series - Young Researchers 2006*. 257-264.

Gilbert, Y., Le Bihan, Y. and Lessard, P. 2006. Acetylene Blockage Technique as a Tool to Determine Denitrification Potential of a Biomass Fixed on an Organic Media Treating Wastewater. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 5 : 437-442

#### **Communications**

Gilbert, Y., Le Bihan, Y. et Lessard, P. 2005. Évaluation de l'activité dénitrifiante potentielle de la biomasse fixée sur le support d'un biofiltre à l'aide du blocage à l'acétylène. 21<sup>e</sup> Conférence régionale de l'Est sur la qualité de l'eau – Association Canadienne sur la Qualité de l'Eau (ACQE). 4 novembre 2005.

Gilbert, Y., Le Bihan, Y., Aubry, G., Duchaine, C. and Lessard, P. 2006. Nitrifying and Denitrifying Biomass Characterization of an Organic Biofilter Treating Pig Manure. 3<sup>rd</sup> Biennial Conference for Young Researchers– International Water Association (IWA). Singapore, May 24-26 2006.



# Chapitre 1

## Introduction

### 1.1 Mise en contexte

La présence d'azote dans les effluents liquides industriels et agroalimentaires, notamment dans le lisier de porc, cause des dommages importants à l'environnement lorsque ceux-ci ne sont pas traités. L'accumulation de cet élément dans le milieu naturel, que ce soit sous forme oxydée ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), réduite ( $\text{NH}_4^+$ ) ou organique ( $\text{R-NH}_2$ ), est en partie responsable de l'eutrophisation des cours d'eau et de la contamination de nappes d'eau souterraines, servant notamment d'apport en eau potable dans certaines régions (Choudhary *et al.* 1996).

Pour le lisier de porc, il est possible d'en réutiliser une bonne partie par épandage dans les champs, puisqu'il constitue un riche apport en nutriments pour les terres agricoles. Toutefois, étant donnée la réglementation québécoise sur les exploitations agricoles concernant l'utilisation des fumiers et des lisiers comme fertilisants, certains secteurs sont au prise avec un surplus par rapport à la surface disponible. L'épandage de ceux-ci augmente d'autant plus les risques de contamination des eaux superficielles et souterraines

(IRDA 2002). Ce lisier ne peut être directement rejeté à l'environnement et doit donc être traité afin de réduire significativement la menace reliée à sa présence.

Le traitement du lisier de porc à l'aide de différents procédés a été étudié par plusieurs groupes de recherche (Loynachan *et al.* 1976; Fenlon et Robinson 1977; Evans *et al.* 1979; Garraway 1982; Bortone *et al.* 1994; Dubé *et al.* 1995; Boiran *et al.* 1996; Cheng *et al.* 1999; Ra *et al.* 1999; Ra *et al.* 2000; Kalyuzhni *et al.* 2002) afin de développer des techniques permettant de prendre en charge le lisier en surplus. Quelques technologies utilisées à grande échelle au Québec ont été présentées dans un rapport d'évaluation de la Fédération des Producteurs de Porcs du Québec (FPPQ) en 2001. Ces procédés utilisent principalement la digestion anaérobie pour la production de biogaz, la digestion aérobie, l'ultrafiltration, la séparation physique solide-liquide naturelle ou à l'aide de réactifs chimiques, le compostage et/ou la biofiltration sur support organique (FPPQ 2001; IRDA 2002).

La biofiltration sur support organique constitue une alternative au transport en traitant *in situ* le lisier de porc (Buelna 1998). Ce procédé permet de mettre à profit la flore microbiologique très variée du milieu organique ainsi que les caractéristiques physico-chimiques du média filtrant (Rock *et al.* 1984; Viraraghavan et Ayyaswami 1987; Couillard 1994).

Les biofiltres organiques présentement en opération et traitant du lisier de porc permettent un enlèvement efficace de la matière organique et une transformation presque complète de l'azote total Kjeldahl (NTK) en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), en oxyde nitreux ( $\text{N}_2\text{O}$ ) et en azote moléculaire ( $\text{N}_2$ ). Des travaux récents ont permis d'évaluer l'importance des différents phénomènes impliqués dans la transformation de l'azote dans un biofiltre à support organique (Tremblay 2000; Garzón-Zúñiga *et al.* 2005). Ces études démontrent que plusieurs mécanismes biologiques (nitrification et dénitrification) et physico-chimiques (volatilisation, adsorption, filtration) sont interassociés et se succèdent pendant le processus de biofiltration.

Garzón (2001) a plus particulièrement étudié le comportement abiotique du biofiltre face à la présence de composés azotés (capacité d'adsorption du  $\text{N-NH}_4^+$  par le milieu filtrant,

volatilisation du  $\text{NH}_3$  et filtration de l'azote particulaire) ainsi que la transformation biologique de l'azote dans ce type de procédé, alimenté avec du lisier de porc. Par un bilan de masse sur l'azote à l'entrée et à la sortie du système, il est arrivé à la conclusion qu'un processus de nitrification et de dénitrification simultanée (NDS) avait probablement lieu à l'intérieur du biofiltre, devenant le principal mécanisme d'enlèvement de l'azote après 140 jours d'opération et que celui-ci avait un comportement cyclique dans le temps.

Différentes études ont démontré que la NDS s'effectue également dans d'autres procédés de traitement des eaux. Helmer et Kunst (1998) ainsi qu'Helmer *et al.* (1999) ont supposé que la population bactérienne autotrophe était responsable de la disparition de 90% de l'azote sous forme de  $\text{N}_2$  lors du traitement, sur un disque biologique rotatif, du lixiviat d'un site d'enfouissement sanitaire sous des conditions limitantes en oxygène. Münch *et al.* (1996), Pochana et Keller (1999) ainsi que Pochana *et al.* (1999) ont étudié l'influence de l'oxygène dissous, de la concentration en substrat carboné et de la taille des floes sur ce phénomène dans un réacteur biologique séquentiel (RBS) et ont trouvé que la NDS est fortement dépendante des deux premiers paramètres. De plus, les résultats obtenus par Pochana et Keller (1999) ainsi que par Pochana *et al.* (1999) supportent l'hypothèse que la NDS est un phénomène gouverné par la diffusion de l'oxygène à l'intérieur des floes. Puznava *et al.* (2001) ont également pu constater la présence de la NDS à l'intérieur d'un biofiltre à support inorganique.

Garzón (2001) a émis l'hypothèse que la nitrification et la dénitrification, dans un biofiltre aéré sur support organique traitant du lisier de porc, ont lieu à l'intérieur du même biofilm et que ces processus de transformation sont simultanés dans l'espace et dans le temps. Ceci suggère que c'est l'épaisseur du biofilm, en réduisant la diffusion de l'oxygène à travers les couches les plus profondes, qui contrôle la présence de la dénitrification au sein d'un biofilm bactérien nitrifiant.

Suite à la prise de connaissances de ces travaux, plusieurs questions sont restées en suspens:

- Dans un biofiltre aéré, à quelle hauteur dans le biofiltre ont lieu les différentes transformations biologiques de l'azote?

- Les processus de nitrification et la dénitrification ont-ils réellement lieu au même endroit ou s'effectuent-ils à des hauteurs différentes, là où les niches écologiques sont plus favorables à la croissance de chacun des microorganismes?
- Dans l'optique d'une optimisation du procédé et afin de réaliser une dénitrification complète de l'azote, quel est le potentiel du système dans les conditions d'opération usuelles?

La présente recherche vise donc à répondre à ces questions en déterminant le potentiel d'enlèvement de l'azote du procédé alimenté avec du lisier de porc, par l'évaluation de l'activité de la biomasse et par la quantification des différents types de microorganismes impliqués, durant les périodes de démarrage et pseudo-stationnaires et ce, à différentes hauteurs dans le biofiltre.

## **1.2 Revue de littérature**

Le but de cette section est de présenter les connaissances actuelles concernant la biologie et les phénomènes physico-chimiques du cycle de l'azote ainsi que les techniques de quantification et d'évaluation de l'activité des microorganismes présents dans un échantillon environnemental. Ceci permettra d'avoir une idée plus complète des différentes façons de caractériser la biomasse nitrifiante et dénitrifiante et de mieux comprendre ce qui a guidé le choix des méthodes utilisées lors de ce projet. De plus, la première partie de la revue de littérature porte plus spécifiquement sur la biofiltration sur support organique et sur les caractéristiques générales du lisier de porc afin de comprendre chacun des aspects de son traitement.

### **1.2.1 Biofiltration sur support organique**

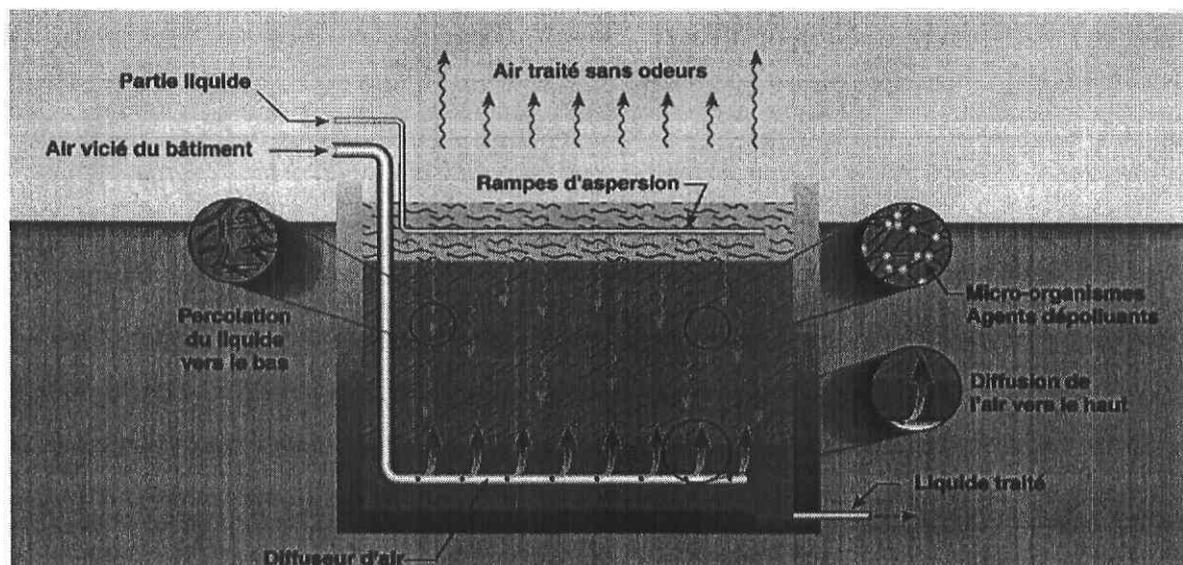
La biofiltration est un procédé de traitement des eaux pour lequel un médium solide sert à la fois de support à la croissance microbologique et de filtre. Les polluants (carbone, azote, phosphore) sont enlevés de la phase aqueuse par différents phénomènes physiques et biologiques (Hodkinson *et al.* 1999). En effet, les microorganismes présents sur le support utilisent les composantes de l'eau à traiter comme source de nourriture pour leur croissance et transforment ainsi la matière soluble en biomasse, en sous-produits de dégradation et en

matière gazeuse. De plus, la très faible dimension des pores du milieu filtrant permet de retenir une importante proportion de la matière particulaire plus difficilement biodégradable présente dans l'affluent; la portion organique de ces particules pouvant ensuite être hydrolysée et utilisée comme source de nutriments par certains microorganismes (Grady *et al.* 1999; Metcalf et Eddy 2003).

Plusieurs systèmes sont conçus avec un support inorganique ou synthétique, comme de la pierre poreuse, du polystyrène ou du plastique très poreux (Hodkinson *et al.* 1999) tandis que d'autres utilisent plutôt un matériel poreux organique, comme la paille, le charbon activé ou la tourbe (Garzón 2001). La charge hydraulique pouvant être appliquée sur un système à support organique est cependant beaucoup plus faible que pour les autres types de biofiltres. Effectivement, celle-ci peut varier de 0,015 à 0,84 m<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> pour les biofiltres à tourbe (Couillard 1994) comparativement à plus de 120 m<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> pour certains filtres à sable utilisés en dénitrification (Metcalf et Eddy 2003).

La biofiltration sur tourbe est depuis longtemps utilisée pour traiter différents types d'effluents et plusieurs exemples d'application peuvent être trouvés (Viraraghavan et Ayyaswami 1987; Couillard 1994; Roberge *et al.* 1999). Plus récemment, ce procédé a été utilisé avec succès pour traiter le lisier de porc (Dubé *et al.* 1995; FPPQ 2001). La Figure 1.1 représente de façon schématique le mode de fonctionnement de ce biofiltre.

Dans ce procédé, la portion liquide du lisier est acheminée à la surface du biofiltre par une rampe d'aspersion; par filtration lente, le liquide percole ensuite à travers le milieu filtrant. L'air apporté au biofiltre par les diffuseurs, situés au bas du système, sert à l'approvisionnement en oxygène des bactéries qui transforment les matières polluantes en composés moins nocifs pour l'environnement (Dubé *et al.* 1995). Pour une application agricole, la charge hydraulique maximale pouvant être appliquée au procédé est de 0,032 m<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, la charge en DBO<sub>5</sub> est de 0,20 kgO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> et celle en NTK est de 0,055 kgN m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>.



Source : CRIQ

Figure 1.1. Représentation schématique du BIOSOR<sup>MD</sup>-Lisier

La composition du matériel filtrant doit correspondre à certains critères afin que celui-ci puisse être utilisé adéquatement dans un système de biofiltration. Malhautier (1996) rapporte qu'un support organique devrait avoir les caractéristiques suivantes:

- une flore microbiologique abondante et diversifiée;
- une surface spécifique élevée, permettant d'optimiser les transferts de matières entre la phase solide, liquide et gazeuse et afin de favoriser la fixation et la croissance des microorganismes;
- un comportement hydrodynamique adapté;
- une source de nutriments pour la croissance de la biomasse (N, P, K, S);
- une capacité de rétention d'eau acceptable pour la croissance bactérienne.

La tourbe est un support organique répondant à ces paramètres. Cette dernière est constituée de matière végétale partiellement dégradée et fossilisée, formée dans les zones marécageuses peu oxygénées où la vitesse de production de la biomasse végétale est plus élevée que sa dégradation. La tourbe peut être formée à partir de différents types de plantes, tels les sphaignes, les ériophores, les carex et le bois (Garzón 2001). La proportion des différentes composantes de la tourbe est fonction de son degré de décomposition. Ce

dernier est influencé par la durée de la dégradation, la présence d'eau, l'acidité, la faible concentration en oxygène ainsi que la nature de la matière végétale originelle. Selon le Centre Québécois de Valorisation de la Biomasse (CQVB 1987), les éléments de la tourbe peuvent être définis de la façon suivante:

- hydrates de carbones (hémicellulose et cellulose);
- polyphénols (lignine et acides humiques);
- lipides (cires, résines, stéroïdes, terpènes).

Toujours selon le CQVB (1987), la tourbe peut être classifiée selon l'échelle de Von Post, de H1 à H9 (annexe 1). La classe H1 correspond à une tourbe non décomposée tandis que la tourbe H9 est pratiquement totalement décomposée et ne contient pas de structure végétale facilement identifiable.

Plus la décomposition de la tourbe est avancée, plus sa capacité de rétention en eau sera élevée et moins la capacité de drainage sera grande (Couillard 1994). Il sera ainsi avantageux de choisir une tourbe partiellement décomposée où la matière végétale facilement biodégradable est disparue et où la charge hydraulique applicable est grande. Dans les procédés de traitement utilisant la tourbe comme support organique, un degré d'humification situé entre H3 et H4 sera donc favorisé (Buelna 1998).

Ce type de tourbe possède une surface spécifique d'environ  $200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  et une porosité de 95% (Garzón 2001). Ces caractéristiques sont particulièrement importantes pour un traitement biologique efficace. En effet, Couillard (1994) rapporte que ces paramètres influencent directement la quantité de biomasse pouvant se fixer dans le système.

### 1.2.2 Caractéristiques du lisier de porc

La composition du lisier varie d'une ferme à l'autre, dépendant des techniques d'élevage, du type d'animal et de son alimentation. Cependant, les composantes suivantes y sont retrouvées dans des proportions variables:

- urine et fèces mélangées;
- eau de lavage, eau pluviale, eau de boisson;
- aliments, paille, litière, poils.

Les principaux éléments polluants du lisier de porc sont la matière organique, l'azote et le phosphore, qu'ils soient sous forme soluble ou particulaire. On retrouve dans la littérature différentes études livrant la composition moyenne du lisier de porc par rapport au poids humide: carbone total 2,6%, azote total 0,61%, azote ammoniacal 0,31%, phosphates 0,33%, matière sèche 8,3%, matière organique 6,7% (Garzón 2001).

Buelna *et al.* (1998) ont présenté les caractéristiques du lisier de porc brut de la fosse d'entreposage d'une ferme québécoise située sur l'Île d'Orléans, près de Québec, et celles-ci peuvent être retrouvées au Tableau 1-1. Ces données constituent un exemple typique de concentrations retrouvées dans le lisier de porc. Cependant, celles-ci peuvent varier de façon importante en fonction de la région d'élevage et du mode de récupération du lisier de porc à l'intérieur des bâtiments.

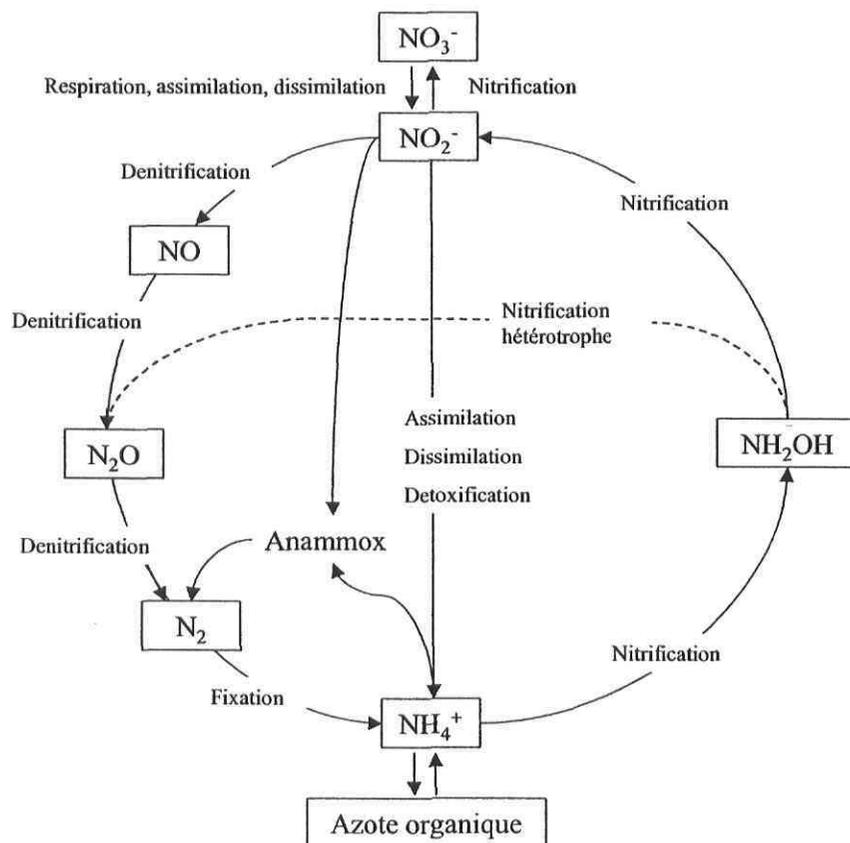
Tableau 1-1. Caractérisation du lisier de porc brut

Paramètres	Lisier brut (mg L <sup>-1</sup> )	
	Variation	Moyenne
DBO <sub>5</sub>	10 000 – 20 000	13 000
MES	10 000 – 20 000	16 000
Phosphore total	500 – 900	650
Azote total Kjeldahl (NTK)	2000 – 3800	2300

Source: Buelna *et al.* 1998

### 1.2.3 Biologie du cycle de l'azote

La Figure 1.2 montre les différents processus impliqués dans la transformation de l'azote. L'enlèvement biologique de l'azote dans un affluent liquide implique généralement deux processus successifs : la nitrification suivie de la dénitrification, lesquels seront décrits dans les sections suivantes. À l'intérieur même de ces processus, certaines exceptions existent; elles seront également décrites brièvement dans le texte. L'assimilation et l'ammonification ne sont pas des processus conduisant à un enlèvement très important de l'azote dans un procédé où la nitrification et la dénitrification jouent un rôle majeur, mais ils ont une place importante pour la croissance bactérienne et pour que, justement, la nitrification et la dénitrification puissent s'effectuer. Pour ces raisons, ces deux phénomènes seront décrits sommairement dans les prochaines sections. De plus, quoique la fixation de l'azote atmosphérique ne soit pas un phénomène courant dans le traitement d'effluents municipaux et agroalimentaires, cette transformation sera décrite afin de situer son apport au cycle de l'azote.



Source : Richardson et Watmough 1999

Figure 1.2. Cycle de l'azote

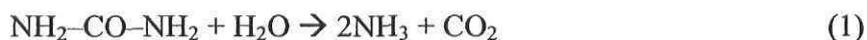
### 1.2.3.1 Assimilation

L'azote est un élément présent dans la plupart des structures cellulaires, comme les acides nucléiques (ARN, ADN), les protéines, certaines coenzymes et plusieurs autres composantes des cellules. C'est pourquoi il est primordial pour les microorganismes d'assimiler l'azote de leur environnement, nécessaire à leur croissance et à leur survie. La plupart des bactéries incorpore l'azote sous forme d'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Étant déjà sous une forme réduite, il nécessite peu de dépense énergétique pour son assimilation. Certains microorganismes peuvent toutefois assimiler l'azote sous forme de nitrite ou de nitrate (Prescott *et al.* 1995).

Garzón (2001) s'est basé sur la productivité générale des organismes hétérotrophes, nitrifiants et dénitrifiants (Henze 1995) ainsi que sur l'activité observée de ces microorganismes dans un biofiltre à support organique, pour calculer de façon semi-empirique la quantité d'azote assimilée dans un biofiltre. Les résultats obtenus ont indiqué que l'assimilation contribuait à l'enlèvement de 12 à 17% de l'azote, pour les charges carbonées et azotées testées. Ces charges variaient respectivement entre 0,31 à 0,59 kg  $\text{DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  pour la  $\text{DBO}_5$  et entre 0,063 à 0,121 kg  $\text{NTK m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  pour le NTK.

### 1.2.3.2 Ammonification

Une partie importante de l'azote retrouvé dans les effluents agroalimentaires et domestiques se retrouve sous forme organique (urée, protéines, acides nucléiques). Avant de pouvoir être utilisé par les microorganismes afin d'être assimilé ou nitrifié, l'azote doit être séparé de la molécule organique et passer sous forme d'ammoniaque ( $\text{NH}_4^+$ ) (Knowles 1982). La plupart des plantes, animaux et microorganismes sont capables d'accomplir ce processus appelé ammonification. Le système enzymatique impliqué dans la formation du  $\text{NH}_4^+$  dépend de l'organisation de la molécule organique (Atlas et Bartha 1998). Par exemple, l'uréase permet la coupure de l'urée en deux molécules d'ammoniaque et une de dioxyde de carbone selon l'équation suivante:



### 1.2.3.3 Fixation de l'azote

Étant donnée la très grande concentration d'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) présente dans l'atmosphère, il serait aisé de penser que les microorganismes possèdent une source inépuisable de ce nutriment. Cependant, un très petit nombre d'organismes possède le bagage enzymatique (nitrogénase) pour l'utilisation de cette molécule, préalablement transformée en ammoniacque avant son assimilation par la biomasse.

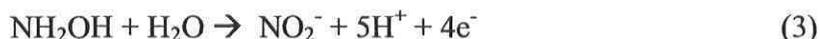
Seuls quelques microorganismes vivant en symbiose avec des plantes comme *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Anabaena*, certaines bactéries libres du sol comme *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Clostridium* et *Methanococcus*, et des cyanobactéries comme *Nostoc* sont capables de procéder à la fixation de l'azote atmosphérique vers la phase organique (Prescott *et al.* 1995; Atlas et Bartha 1998).

Dans la grande majorité des cas, les microorganismes vont utiliser l'azote le plus facilement assimilable et, puisque la fixation de l'azote nécessite une dépense énergétique très importante, ceux-ci opteront plutôt pour l'ammoniacque lorsque sa concentration est suffisamment importante. Dans le cas des procédés de traitement des eaux, particulièrement pour l'épuration du lisier de porc, l'ammoniacque est très rarement limitant. La fixation de l'azote n'est donc pas un processus important et est généralement négligé lors de l'analyse de la performance des systèmes de traitement.

### 1.2.3.4 Nitrification

Ce processus est accompli exclusivement en phase aérobie et peut être effectué par divers types de microorganismes, dans la plupart des cas autotrophes, mais parfois hétérotrophes (Castignetti et Holoher 1984; Anderson *et al.* 1993; Hu et Kung 2000; Mével et Prieur 2000; Littleton *et al.* 2002). Des études phylogénétiques, impliquant l'analyse de l'ARNr 16S des organismes nitrifiants, ont conclu que la majorité des organismes autotrophes nitrifiants connus est affiliée avec une des différentes subdivisions des Protéobactéries, dont la plupart est incluse dans la classe des  $\beta$ -Protéobactéries. La classe des  $\gamma$ -Protéobactéries est constituée de nitrifiantes retrouvées spécifiquement dans les milieux marins (Jetten *et al.* 1997).

La nitrification peut-être divisée en deux transformations chimiques, la nitrification et la nitrification. La première s'effectue en deux étapes, via la formation d'hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH) :



Les bactéries impliquées font partie des genres *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio*. Les réactions sont respectivement catalysées par les enzymes ammonia monooxygénase (AMO), codée par l'opéron *amo*, et hydroxylamine oxydoréductase (HAO), codée par le gène *hao* (Richardson et Watmough. 1999; Bothe *et al.* 2000; Dionisi *et al.* 2002b). L'AMO démontre une forte homologie avec la pMMO des bactéries méthanotrophes, enzyme catalysant l'oxydation du méthane, suggérant une origine commune et une similitude au niveau de la séquence de ces gènes (Bothe *et al.* 2000; Kowalchuk et Stephen 2001).

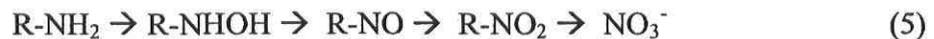
La seconde transformation implique l'oxydation du nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) par des microorganismes du genre *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus* et *Nitrospina* par la réaction suivante :



L'enzyme impliquée dans ce processus est la nitrite oxydoréductase (Atlas et Bartha 1998; Colliver et Stephenson 2000). On a longtemps cru que *Nitrobacter* était la bactérie oxydatrice de nitrite (NOB: nitrite oxidizing bacteria) la plus commune dans les systèmes de traitement des eaux (Belser 1979). Cependant, l'utilisation de techniques récentes, impliquant la biologie moléculaire, a permis de démontrer que *Nitrospira* y était souvent retrouvé en grand nombre et même de façon majoritaire dans la plupart des cas (Burrell *et al.* 1998; Schramm *et al.* 1998; Schramm *et al.* 1999; Daims *et al.* 2000; Dionisi *et al.* 2002a, 2002b).

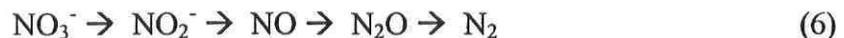
Plusieurs études ont démontré que certains microorganismes hétérotrophes étaient également capables d'effectuer la nitrification, mais à un taux beaucoup plus faible que les organismes autotrophes (van Loosdrecht et Jetten 1998). Leur potentiel à effectuer la nitrification n'est pas à négliger, puisque les hétérotrophes ont un taux de croissance très rapide et colonisent rapidement les systèmes d'épuration, particulièrement dans les zones où

l'environnement ne favorise pas la croissance des autotrophes (Castignetti et Holocher 1984; Hu et Kung 2000). Toutefois, d'autres études ont permis de constater que la faible activité apparente de ces organismes pouvait hypothétiquement être attribuée à deux processus ayant lieu de façon simultanée dans la cellule : la nitrification hétérotrophe, menant à la formation de nitrite à partir de l'ion ammonium, et la dénitrification aérobie, réduisant le nitrite en N<sub>2</sub>O ou en azote atmosphérique (Roberston *et al.* 1989; Colliver et Stephenson 2000; Hu et Kung 2000). Robertson *et al.* (1989) indiquent cependant que les organismes hétérotrophes nitrifiants ne peuvent probablement pas tous dénitrifier en conditions aérobies. La littérature trouvée sur ce sujet semble indiquer que les enzymes impliquées ont les mêmes fonctions, mais sont différentes de celles retrouvées chez les organismes nitrifiants autotrophes (Roberston *et al.* 1989; Jetten *et al.* 1997). Il y a également certaines évidences montrant que la voie métabolique suivante pourrait être empruntée par la nitrification hétérotrophe (Killham 1986) :



#### 1.2.3.5 Dénitrification

Lors de la dénitrification, un oxyde d'azote sert d'accepteur d'électrons afin de générer un potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique du microorganisme. Les électrons, provenant généralement d'une source de carbone organique, mais pouvant aussi dériver d'une molécule inorganique, cheminent jusqu'à différentes oxydoréductases, chacune spécifique à un oxyde d'azote particulier (Zumft 1997). L'action concertée de toutes ces enzymes conduit donc à la formation de N<sub>2</sub> à partir du nitrate, selon la chaîne de transformations suivante (Zumft 1997; Bothe *et al.* 2000):



Certains organismes, ne produisant pas certaines réductases, doivent utiliser un oxyde d'azote partiellement réduit comme premier accepteur d'électrons ou ne peuvent tout simplement pas se rendre jusqu'au N<sub>2</sub>. Jusqu'à récemment, les chercheurs ne s'entendaient pas sur la formation de monoxyde d'azote (NO) lors de la dénitrification. Cependant, il a été récemment établi que cette molécule est un intermédiaire obligatoire de la dénitrification (Zumft 1997; Watmough *et al.* 1999; Bothe *et al.* 2000).

La capacité à dénitrifier est largement répandue dans le monde bactérien, les gènes nécessaires étant présents chez une très grande variété d'espèces et de genres. Les microorganismes dénitrifiants sont généralement hétérotrophes, mais les oxydes d'azote peuvent également être réduits par certains organismes autotrophes nitrifiants sous des conditions limitantes en oxygène (Kuenen et Robertson 1994; Jetten *et al.* 1997; Colliver et Stephenson 2000; Kowalchuk et Stephen 2001) ou par une réaction chimique ayant lieu dans des conditions légèrement acides, appelée chimiodénitrification (Conrad 1990; Colliver et Stephenson 2000; Garzón 2001; Kappelmeyer *et al.* 2003).

Parmi les organismes hétérotrophes pouvant dénitrifier, on retrouve des bactéries aérobies facultatives communes, comme *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*, *Pseudomonas* et *Alcaligenes* en plus de genres moins communs comme *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas* et *Propionobacterium* (Atlas et Bartha 1998). Certaines espèces des genres *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* et *Moraxella* peuvent toutefois respirer le  $\text{NO}_3^-$  dans des conditions aérobies. Les avantages physiologiques de ce phénomène et sa contribution au cycle de l'azote sont néanmoins incertains pour l'instant (Carter *et al.* 1995). Certains microorganismes peuvent oxyder un composé inorganique pour effectuer la dénitrification. En effet, *Thermothrix*, *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* et *Thiosphaera* oxydent le soufre, *Alcaligenes*, *Bradyrhizobium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* peuvent oxyder l'hydrogène tandis que *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, tel qu'indiqué précédemment, peuvent utiliser respectivement le  $\text{NH}_4^+$  et le  $\text{NO}_2^-$  pour effectuer une dénitrification partielle ou complète en conditions limitantes en oxygène (Colliver et Stephenson 2000).

L'enzyme catalysant la première transformation (équation 7) est la nitrate réductase (NAR), enzyme membranaire codée par l'opéron *nar* (Jetten *et al.* 1997; Richardson et Watmough 1999).



Certains organismes eucaryotes aptes à effectuer la dénitrification produisent également une nitrate réductase, mais celle-ci ne possède aucune homologie de séquence avec celle retrouvée dans le monde bactérien (Richardson et Watmough 1999).

La seconde étape de la dénitrification est contrôlée par la nitrite réductase (NIR), codée par le gène *nir*, et constitue l'étape clé du processus, puisque l'azote soluble passe sous forme gazeuse. Elle permet donc de discerner entre un microorganisme respirant seulement le  $\text{NO}_3^-$  et un vrai dénitrifiant (Hallin et Lindgren 1999). L'équation suivante montre la réduction du nitrite en oxyde nitrique:



Il existe deux types de nitrite réductase chez les bactéries dénitrifiantes : entre le quart et le tiers d'entre elles produit une nitrite réductase contenant du cuivre (NIRK) tandis que les autres produisent une enzyme porteuse d'un groupement hème *cdl* (NIRS) (Knowles 1982; Jetten *et al.* 1997; Braker *et al.* 1998; Hochstein et TomLinson 1998; Richardson et Watmough 1999; Michotey *et al.* 2000). Aucune étude n'a pu démontrer jusqu'à maintenant qu'un microorganisme pouvait produire simultanément les deux types d'enzymes (Watmough *et al.* 1999). Certains organismes eucaryotes produisent une nitrite réductase très similaire à la NIRK bactérienne (Kobayashi et Shoun 1995) et on a récemment découvert que certaines AOB possédaient une nitrite réductase du type NIRK (Casciotti et Ward 2001).

La réduction de l'oxyde nitrique est catalysée par l'oxyde nitrique réductase (nitric oxide reductase : NOR) selon la réaction suivante (Richardson et Watmough 1999) :



Une version autotrophe de cette enzyme a également été observée chez les AOB (Casciotti et Ward 2005).

La dernière étape du processus de dénitrification est effectuée par l'oxyde nitreux réductase (nitrous oxide reductase : NOS) selon l'équation suivante :



Cette dernière est fortement inhibée par une concentration en acétylène ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) d'environ 0.1 kPa (Knowles 1990), par le monoxyde de carbone (CO), l'azide ( $\text{N}_3$ ), le cyanure (CN) et les sulfures (Knowles 1982; Hochstein et TomLinson 1998).

L'identification récente d'un autre phénomène lié à la transformation de l'azote a permis d'observer la dénitrification autotrophe de l'azote en conditions anaérobies (van Loosdrecht et Jetten 1998; Richardson et Watmough 1999). Effectivement, l'oxydation anaérobie de l'ammoniaque (Anaerobic Ammonium Oxidation : Anammox) permet la réduction du nitrite jusqu'à l'azote atmosphérique selon la réaction qui suit :



van de Graaf *et al.* (1995, 1997) ont démontré que ce processus était réellement catalysé de façon biologique et ont suggéré une voie métabolique possible pour la formation du  $\text{N}_2$ , via la formation d'hydrazine ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ). Le taux de conversion de l'azote par ce processus est relativement élevé lorsque la biomasse impliquée est bien établie dans le système de traitement (van Loosdrecht et Jetten 1998). Pour l'instant, l'effet de cette transformation n'a pu être observé dans un procédé de traitement conventionnel. Cependant, le nombre d'études démontrant des pertes d'azote inexplicables dans certains procédés augmente significativement, indiquant que ce processus est peut-être plus répandu que supposé précédemment (Jetten *et al.* 1999).

#### 1.2.3.6 Chimiodénitrification

Il a été démontré qu'il existe une transformation non enzymatique dans les sols organiques acides (Kappelmeyer *et al.* 2003), où une réaction d'oxydoréduction transforme le nitrite en  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  et en  $\text{N}_2$ . Thorn et Mikita (2000) ont démontré que la matière organique joue un rôle très important dans ce processus puisque le nitrite réagit avec les acides fulviques et humiques pour former des nitrosophénols avant d'être libéré sous une de ses formes gazeuses. Garzón (2001) a émis l'hypothèse que, lors du traitement de lisier de porc sur un biofiltre aéré à support organique, la chimiodénitrification pouvait être une des causes expliquant la perte de près de 10% de l'azote sous forme de  $\text{N}_2\text{O}$ , en combinaison avec la dénitrification autotrophe des organismes nitrifiants et la dénitrification incomplète.

## 1.2.4 Caractérisation de la biomasse

La caractérisation microbiologique d'un échantillon environnemental implique généralement l'évaluation de l'activité de microorganismes visés, la quantification de ces derniers ou l'observation du profil de la population microbienne. Ce type d'analyse permet de mieux comprendre les différentes interactions biologiques ayant lieu dans un environnement donné (Atlas 1993).

Les prochaines sections décrivent les techniques les plus répandues, utilisées pour caractériser la microbiologie d'échantillons environnementaux. Étant donné que le cycle de l'azote est un aspect majeur de ce projet, les méthodes concernant les organismes impliqués dans la transformation de l'azote seront plus spécifiquement visées.

### 1.2.4.1 Quantification de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante

Les méthodes décrites dans la littérature pour quantifier les organismes nitrifiants (ammonia oxidizing bacteria : AOB; nitrite oxidizing bacteria : NOB) et dénitrifiants concernent généralement la culture sur milieu sélectif et la biologie moléculaire.

Jusqu'à très récemment, seules les méthodes de culture sur milieu sélectif étaient utilisées pour la quantification de ces microorganismes. La technique du nombre le plus probable (NPP) permet d'estimer la quantité d'organismes nitrifiants et dénitrifiants en utilisant des milieux de culture liquides spécifiques à ces organismes (Schmidt et Belser 1982; Tiedje 1982). Cette méthode consiste à faire croître une suspension de microorganismes à différentes dilutions et ce, en plusieurs réplicats pour chacune des concentrations. Suite à une incubation d'une durée donnée, les milieux sont testés afin de vérifier la disparition d'un substrat ou l'apparition d'un produit. Une analyse statistique des résultats positifs et négatifs pour chaque dilution permet de déterminer le NPP des microorganismes ciblés (Cochran 1950; Alexander 1982; Belser et Mays 1982; Both *et al.* 1990). Cette méthode est toutefois reconnue pour sous-estimer la quantité d'organismes présents dans un échantillon donné puisqu'elle est sélective et ne tient pas compte des agglomérats d'organismes pouvant se former dans l'échantillon analysé (Belser 1979; Both *et al.* 1990; Wagner *et al.* 1993; Konuma *et al.* 2001). De plus, la durée d'incubation nécessaire devient restrictive

pour les organismes nitrifiants, qui nécessitent généralement une croissance d'environ 100 jours avant l'analyse des résultats (Schmidt et Belser 1982).

L'utilisation de marqueurs fluorescents est à la base de nouvelles techniques en biologie moléculaire permettant la quantification de microorganismes. Ces méthodes impliquent l'utilisation de la microscopie en épifluorescence (Rebillard et Torre 1993) par immunofluorescence (Szweringi *et al.* 1985; Pickup 1991; Sandén *et al.* 1994; Voytek et Ward 1995; Bonnet *et al.* 1997; Phillips *et al.* 2000) ou à l'aide de sondes d'acides nucléiques marquées (fluorescence *in situ* hybridization : FISH) (Schramm *et al.* 1996; Wagner *et al.* 1998). Il est cependant reconnu que l'immunofluorescence risque de surestimer la quantité de microorganismes, étant donné une certaine non spécificité des anticorps vers la matière organique, comme la tourbe (Malhautier *et al.* 1998). De plus, l'interférence du biofilm dans la fixation des anticorps sur la surface antigénique, pour les biomasses fixées, nuit à l'analyse des résultats (Szweringi *et al.* 1985). Le FISH est également influencé par la présence d'impuretés, car les sondes d'acides nucléiques ont tendance à se fixer sur les particules de matière organique (Konuma *et al.* 2001). Le signal de fond rend ainsi ces techniques plus ou moins sensibles à de faibles quantités de microorganismes cibles.

La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) implique plutôt la réplication sélective d'une portion d'un gène, spécifique à l'organisme visé, afin de produire une quantité d'ADN suffisante pour être détectée et caractérisée (Muyzer et Ramsing 1995; Prescott *et al.* 1995). Il est essentiel de connaître la séquence du gène à reproduire, car deux amorces d'ADN, contenant les séquences initiales et finales de la portion du gène en question, doivent être conçues. Le choix de ces amorces est très important puisque ces dernières doivent être suffisamment spécifiques pour éviter la réplication de gènes non désirés tout en ciblant tous les microorganismes à quantifier.

Étant donné la difficulté et le temps nécessaire pour faire croître les organismes nitrifiants sur un milieu spécifique, le PCR s'avère très intéressant, puisqu'il n'implique pas la réplication des cellules bactériennes et est beaucoup plus rapide que la culture cellulaire (Bothe *et al.* 2000). De plus, puisqu'elle implique la séparation de l'ADN du support solide, l'interférence causée par les particules organiques, notamment lors de l'utilisation

de marqueurs fluorescents, est réduite au minimum (Tebbe et Vahjen 1993). Cette méthode est d'autant plus intéressante qu'en plus d'identifier la présence d'un microorganisme, elle permet maintenant de quantifier ce dernier dans un échantillon d'eau, de sol ou de sédiments (Degrange et Bardin 1995; Heid *et al.* 1996; Michotey *et al.* 2000).

Il faut d'abord concevoir une paire d'amorces, oligonucléotides de 15 à 30 paires de base, dont la séquence est complémentaire avec une région flanquant un fragment du gène à amplifier. Pour ce faire, une recherche dans les banques de données de séquences géniques, comme Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), doit être effectuée afin de cibler, à l'aide de logiciels, une séquence conservée retrouvée uniquement chez la bactérie ou le groupe bactérien visé. Une fois les amorces conçues, celles-ci doivent être testées sur les microorganismes visés, sur des groupes apparentés et sur des groupes phylogénétiques différents, afin de s'assurer qu'elles ne sont spécifiques qu'aux organismes désirés.

Le PCR s'effectue dans une solution contenant l'ADN à amplifier, une polymérase résistante à la chaleur, les amorces, des nucléotides triphosphorylés (désoxynucléotide triphosphorylés : dNTP), qui serviront de monomères pour la construction des amplicons, et des sels permettant le bon fonctionnement de l'enzyme. La solution est initialement chauffée à 94 °C afin de briser les liaisons entre les doubles brins d'ADN. Puis, elle est refroidie à une température variant entre 50 et 60°C afin de permettre l'hybridation des amorces sur leur séquence complémentaire et ensuite chauffée à 72 °C, température idéale de fonctionnement de la polymérase qui permettra l'élongation des brins d'ADN à partir des amorces. Ces trois étapes seront par la suite répétées de trente à quarante fois afin de produire une quantité de fragments suffisante pour l'étude du gène en question (Figure 1.3).

La quantification d'un organisme par PCR peut s'effectuer par PCR compétitif (Steffan et Atlas 1991; Michotey *et al.* 2000; Phillips *et al.* 2000; Bjerrum *et al.* 2002; Dionisi *et al.* 2002a), par NPP-PCR (Degrange et Bardin 1995; Féray *et al.* 1999; Michotey *et al.* 2000; McGilloway *et al.* 2002) ou par PCR en temps réel (Heid 1996; Grüntzig *et al.* 2001; Hermansson et Lindgren 2001; Ginzinger 2002; Hall *et al.* 2002; Harms *et al.* 2003; Mackay 2004). L'avantage du PCR en temps réel, comparativement aux deux autres alternatives, est la réduction des manipulations nécessaires pour la visualisation des résultats. En effet, cette méthode permet d'observer la réaction durant l'amplification du

gène étudié tandis que le NPP-PCR et le PCR compétitif demandent une migration sur gel d'agarose avant l'analyse des résultats.

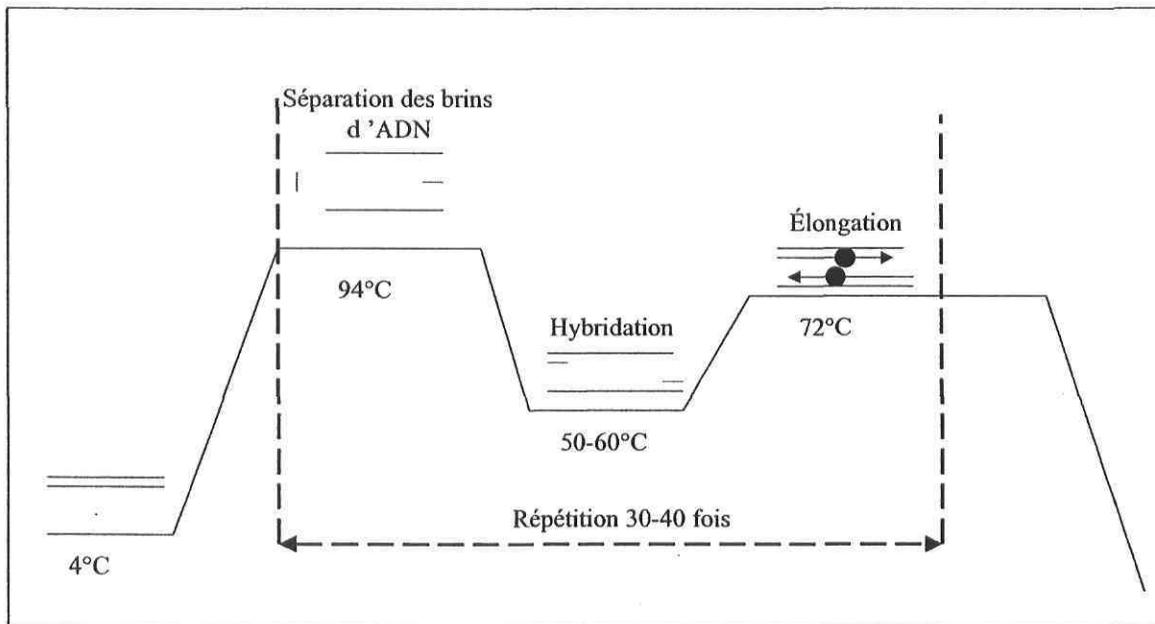


Figure 1.3. Schéma typique d'une réaction de PCR

Le PCR en temps réel permet de quantifier le nombre de copies d'un gène cible dans un extrait d'ADN provenant d'un échantillon environnemental. L'ajout d'un fluorochrome spécifique à l'ADN amplifié aide au suivi, durant l'amplification, de la prolifération des brins d'ADN. Cette molécule fluorescente peut être soit spécifique aux doubles brins d'ADN et produire sa fluorescence lorsque fixée sur l'acide nucléique, comme le SYBR<sup>®</sup>Green, soit présente sur une sonde d'oligonucléotides et profiter de l'activité exonucléase de la polymérase, un procédé connu sous le nom de Taqman<sup>®</sup>.

Dans le cas de la méthode Taqman<sup>®</sup>, la sonde d'oligonucléotides sur laquelle sont fixées une molécule fluorescente (F) et une molécule masquant (Q) la fluorescence de la première (Figure 1.4), est spécifique à une séquence située à l'intérieur du fragment à amplifier. La seconde molécule (Q), lorsque fixée sur la sonde en même temps que le fluorochrome (F), absorbe la fluorescence de la première, l'empêchant ainsi d'être détectée. Cependant, lors de l'étape d'élongation à 72 °C, l'activité nucléase de la polymérase clive la sonde lors de son passage et sépare le fluorescent de son masqueur. Ainsi, à chaque cycle du programme, un fluoromètre intégré à l'appareil évalue la variation de la fluorescence qui augmente avec

la libération de la molécule fluorescente. Cette réaction a l'avantage, comparativement au SYBR<sup>®</sup>Green, d'ajouter une spécificité accrue grâce à l'oligonucléotide supplémentaire.

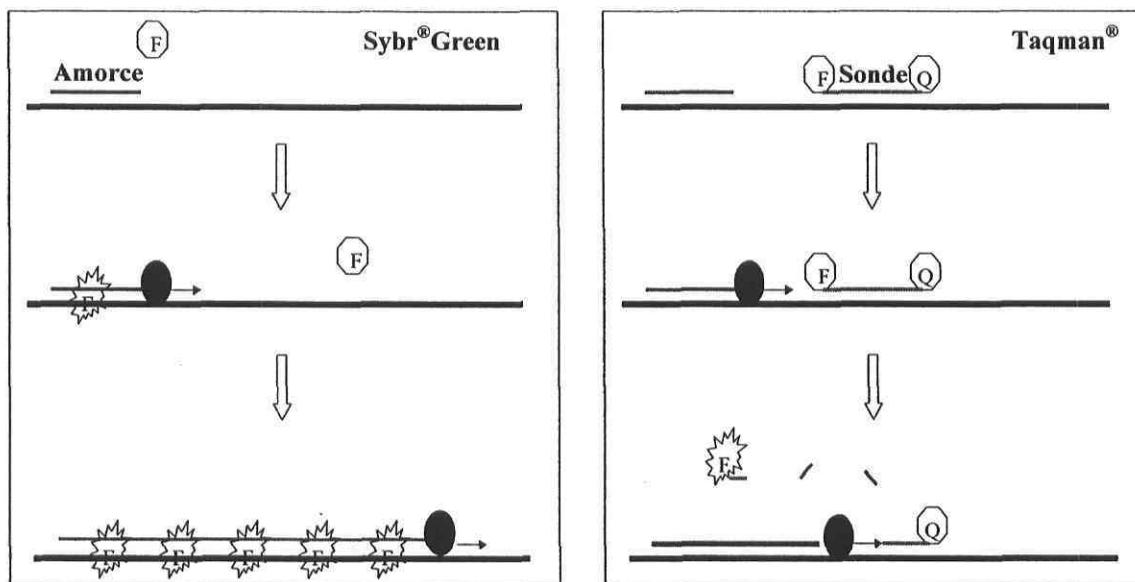


Figure 1.4. Phase d'élongation lors d'une réaction de PCR en temps réel: Méthode SybrGreen vs Taqman

La Figure 1.5 représente un exemple de courbes d'amplification obtenues lors de la quantification d'un étalon par PCR en temps réel. Un niveau seuil est établi arbitrairement dans la phase exponentielle d'amplification, où la vitesse de réaction est maximale. Le cycle où une courbe traverse ce niveau seuil constitue le cycle seuil (Cycle Threshold :  $C_T$ ) de l'échantillon testé. Plus le nombre de copies du gène initialement présent dans le mélange réactionnel est grand, plus la fluorescence sera détectée tôt. Il est ainsi possible de concevoir une courbe étalon où, avec un nombre connu de copies du gène à amplifier, le cycle où apparaît la fluorescence est inversement proportionnelle au logarithme de la quantité de gènes cibles.

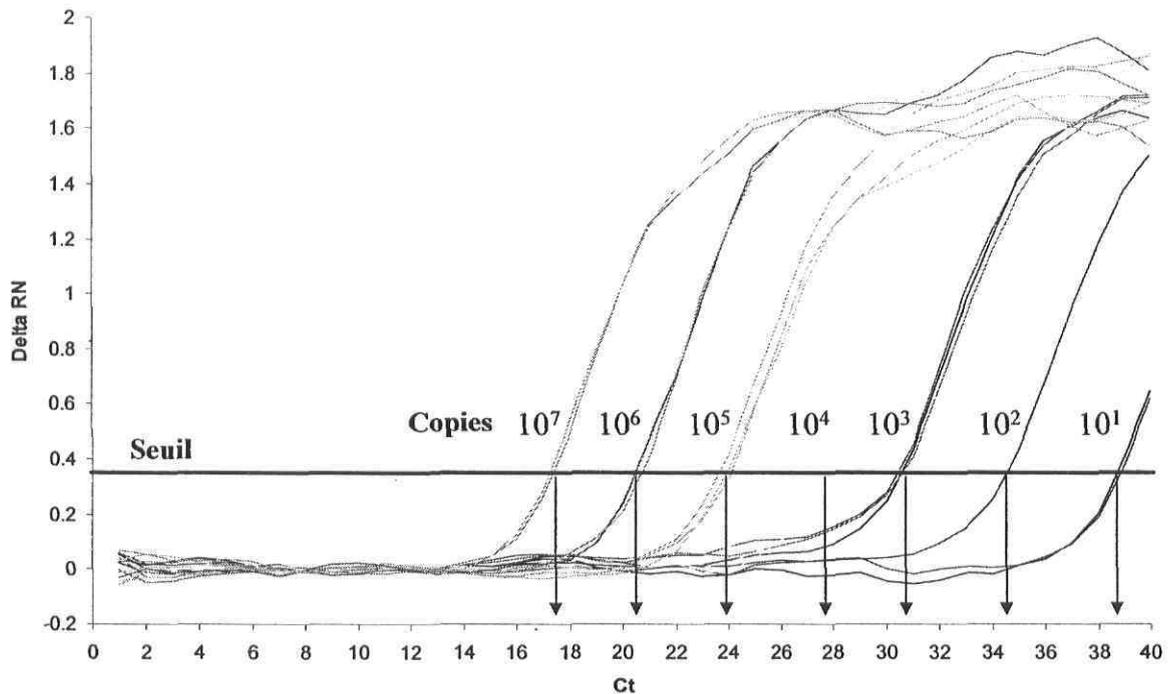


Figure 1.5. Courbe d'amplification d'un étalon d'ADN lors d'un PCR en temps réel

Dans la phase exponentielle d'amplification, le nombre de copies dans le tube PCR augmente selon l'équation :

$$X = X_0 2^n \quad (12)$$

où  $n$  : Nombre de cycles

$X$  : Nombre de copies du gène après  $n$  cycles

$X_0$  : Nombre initial de copies

Il est possible d'intégrer une notion d'efficacité ( $E$ ) de la PCR dans l'équation 12, où le doublement des copies à chaque cycle est maximal lorsque  $E$  égale à 1, selon l'équation suivante :

$$X = X_0 (1+E)^n \quad (13)$$

On suppose que pour un même fragment amplifié, le nombre de molécules d'ADN accumulées ( $X$ ) au niveau du seuil ( $C_t$ ) est le même quel que soit  $X_0$ . Le logarithme de cette équation est donc :

$$\log_{10}X = \log_{10}X_0 + C_t \cdot \log_{10}(1+E) \quad (14)$$

Pour deux concentrations initiales différentes,  $X_1$  et  $X_2$ , on a :

$$\log_{10}X = \log_{10}X_1 + C_{t1} \cdot \log_{10}(1+E) = \log_{10}X_2 + C_{t2} \cdot \log_{10}(1+E) \quad (15)$$

Ainsi,

$$\log_{10}X_1 - \log_{10}X_2 = \log_{10}(1+E) \cdot (C_{t2} - C_{t1}) \quad (16)$$

La pente du graphique de  $C_t$  en fonction de la quantité initiale  $X_0$  est alors :

$$\text{Pente} = -1/\log_{10}(1+E) \quad (17)$$

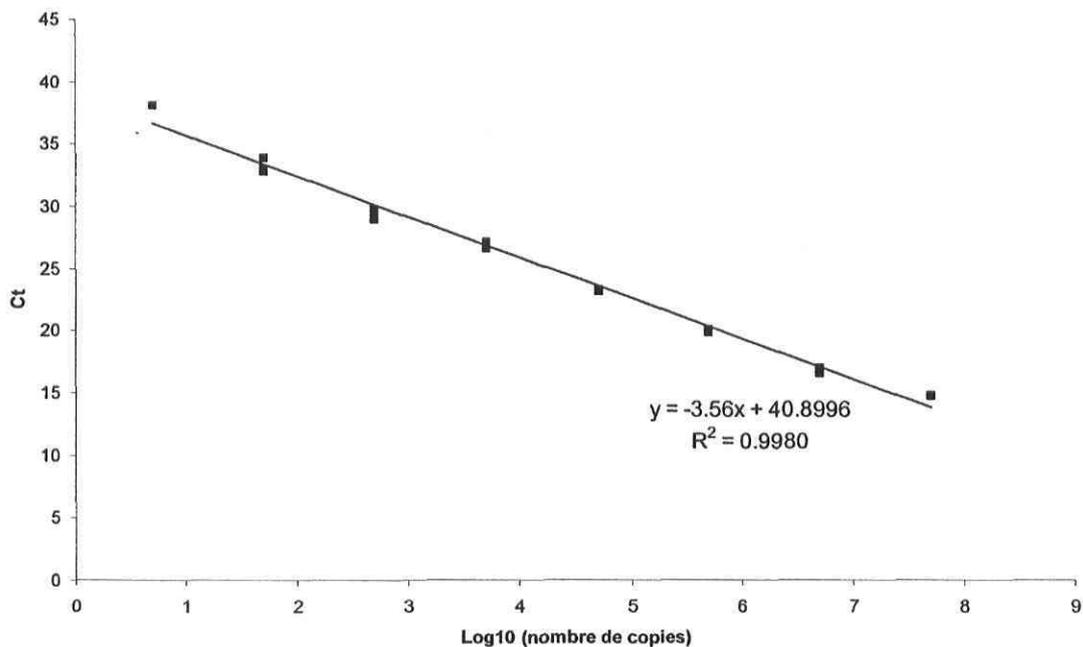


Figure 1.6. Exemple de courbe étalon obtenue lors d'une réaction de PCR en temps réel

On peut voir à la Figure 1.6, un exemple montrant la courbe étalon obtenue à l'aide de cet essai. Pour cet exemple, l'efficacité de l'amplification, calculée à l'aide de l'équation 17,

serait de 90,9 %. Une valeur supérieure à 90% est considérée comme acceptable, tandis qu'une efficacité inférieure nécessite généralement une optimisation de la réaction (Ginzinger 2002). Une efficacité hors de cette marge indique souvent la présence d'inhibiteurs dans la solution réactionnelle ou une mauvaise spécificité des amorces et des sondes d'oligonucléotides utilisées.

Lors du PCR, il est possible de cibler des gènes directement impliqués dans le métabolisme suivi ou des séquences du génome spécifiques au groupe visé, n'ayant pas nécessairement de lien avec l'activité observée. L'ADN codant pour l'ARN ribosomal (ADNr), notamment celui de l'ARNr 16S, constitue une portion de l'ADN riche en information. En effet, l'importance de cet ARN pour la survie des microorganismes restreint la variation possible au niveau de la séquence comparativement à d'autres gènes. Cela signifie que ces séquences sont très conservées pour un même groupe bactérien, permettant ainsi leur utilisation pour le suivi spécifique de ce groupe (Pickup 1991; Rittman 2002).

Plusieurs études se sont penchées sur l'utilisation de l'ADNr 16S (Philips *et al.* 2000; Harms *et al.* 2003) et du gène *amoA* (Rotthauwe *et al.* 1997; Bjerrum *et al.* 2002) pour la caractérisation des AOB. Cependant, le nombre élevé de copies de l'opéron *amo* dans ces microorganismes amène une surestimation importante de ceux-ci (Klotz et Norton 1998; Hermansson et Lindgren 2001). Pour les NOB (*Nitrobacter* et *Nitrospira*), aucune étude n'a pu être trouvée quant à l'utilisation de gènes « métaboliques » pour leur quantification. De nombreux travaux ont toutefois dénombré ces microorganismes à partir de leur ADNr 16S (Féray *et al.* 1999; Hall *et al.* 2002; Harms *et al.* 2003).

Tel que décrit à la section 1.2.3.5, un large éventail de microorganismes sont capables de réaliser la dénitrification. Il n'est donc pas possible de développer des outils moléculaires à partir de l'ADNr 16S afin de cibler l'ensemble de ces bactéries, la variabilité au niveau des séquences étant beaucoup trop importante. Il est toutefois possible d'utiliser les séquences reliées à des gènes directement impliqués dans ce processus biologique, comme les réductases de la chaîne respiratoire. En effet, il a été démontré que le gène de la nitrate réductase (*narG*) (Mergel *et al.* 2001; Gregory *et al.* 2003), celui de la nitrite réductase (*nirS* et *nirK*) (Braker *et al.* 1998, 2000; Throbäck *et al.* 2004) et celui de l'oxyde nitreux

reductase (*nosZ*) (Scala et Kerkhof 1998; Mergel *et al.* 2001) sont adéquats afin de détecter ces groupes de microorganismes dans des échantillons environnementaux.

#### 1.2.4.2 Évaluation de l'activité de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante

Il existe différentes méthodes permettant d'évaluer l'activité des microorganismes nitrifiants et dénitrifiants et le choix repose généralement sur la disponibilité des appareils nécessaires et la simplicité de la technique. Bien sûr, l'aspect économique concernant l'application routinière de techniques très précises est un paramètre important lorsque vient le moment de choisir une méthode. La section suivante constitue une énumération non exhaustive des techniques les plus utilisées pour l'évaluation de l'activité des organismes nitrifiants et dénitrifiants.

L'activité des organismes nitrifiants peut être évaluée en mesurant:

- la fixation du  $^{14}\text{CO}_2$  à la noirceur (Pearl 1998);
- l'évolution du  $\text{N}_2\text{O}$ , produit de façon relativement constante durant l'oxydation du  $\text{NH}_4^+$  dans les cultures pures et les communautés microbiennes simples (Anderson *et al.* 1993; Pearl 1998);
- le taux de consommation du  $\text{NH}_4^+$  ou le taux de production de  $\text{NO}_3^-$  et de  $\text{NO}_2^-$  (Belser et Schmidt 1980; Belser et Mays 1982; Liu et Capdeville 1996; Carvallo *et al.* 2002);
- l'activité respirométrique spécifique aux organismes nitrifiants (Horn et Hempel 1997; Chandran et Smets 2001; Rother *et al.* 2001; Carvallo *et al.* 2002; Marsili-Libelli et Tabani 2002);
- et par l'utilisation d'isotope  $^{15}\text{N}$  (Pearl 1998; Béline *et al.* 2001; Wyffels *et al.* 2003).

L'utilisation d'isotopes d'azote ou de carbone est particulièrement utile afin d'étudier de façon précise l'activité des organismes nitrifiants. Cependant, cette technique nécessite un appareillage et des réactifs onéreux qui rendent économiquement difficiles, pour plusieurs laboratoires, son application routinière.

La production de  $N_2O$  dans une culture pure de microorganismes nitrifiants est relativement constante et est généralement proportionnelle à leur activité. Toutefois, lorsque la communauté bactérienne se complexifie, il n'est plus possible de constater une constance dans l'évolution de la quantité de  $N_2O$  produite par ces microorganismes (Pearl 1998), rendant impossible l'utilisation de cette technique afin d'évaluer l'activité des organismes nitrifiants dans l'environnement.

Le suivi de la consommation de  $NH_4^+$  ou de la production de  $NO_2^-$  et de  $NO_3^-$  par la biomasse nitrifiante est une technique relativement précise permettant d'évaluer l'activité des bactéries nitrifiantes. Le désavantage de cette méthode, contrairement à la respirométrie, est l'obligation de soutirer régulièrement un échantillon de la suspension de biomasse afin d'en évaluer la concentration en ammoniacque, en nitrite ou en nitrate. Elle demande ainsi un surplus de manipulations que la respirométrie évite d'accomplir. En effet, cette dernière permet d'évaluer indirectement le taux de consommation de l'ammoniacque en mesurant la vitesse à laquelle les bactéries nitrifiantes consomment l'oxygène, à l'aide d'une sonde branchée à un système d'acquisition de données.

Pour la dénitrification, il existe également plusieurs techniques permettant d'en évaluer l'activité, dont:

- la mesure du  $N_2O$  produit lors du blocage de l'oxyde nitreux réductase par l'acétylène ( $C_2H_2$ ) (Yoshinari et Knowles 1976; Ryden *et al.* 1987; Knowles 1990; Seitzinger *et al.* 1993; Teissier et Torre 2002);
- l'utilisation d'isotopes  $^{15}N$  (Myrold 1990; Seitzinger *et al.* 1993; van de Graaf *et al.* 1997; Beline *et al.* 2001) et  $^{13}N$  (Pearl 1998);
- la mesure directe du  $N_2$  et du  $N_2O$  produits dans un environnement purgé avec un gaz inerte (Garzón 2001).

Comme expliqué précédemment, l'utilisation d'isotopes n'est pas une technique accessible à tous les laboratoires. La technique impliquant la mesure du  $N_2$  et du  $N_2O$  à la sortie du procédé nécessite un volume de gaz inerte, utilisé pour la purge de l'azote moléculaire pouvant être présent, proportionnel à la dimension du système. Pour une application de

laboratoire, cette technique peut être envisagée, mais son utilisation sur des procédés à grande échelle demanderait une infrastructure importante et coûteuse. Cette méthode ne peut donc pas être appliquée de façon routinière afin de suivre la biomasse dénitrifiante dans un biofiltre à support organique.

Le blocage à l'acétylène est une méthode intéressante pour évaluer le potentiel de dénitrification, car elle implique la mesure de la production de  $N_2O$  par les organismes dénitrifiants au lieu du  $N_2$ ; cette molécule est beaucoup plus facile à évaluer que le  $N_2$ , la contamination possible par l'azote atmosphérique étant moins importante et un plus large éventail d'appareils étant capable d'en effectuer la mesure.

Que ce soit pour les organismes nitrifiants ou dénitrifiants, l'activité obtenue avec une ou l'autre de ces méthodes est qualifiée "d'activité potentielle", car les essais ne sont généralement pas effectués dans des conditions identiques à celles retrouvées dans l'environnement naturel des microorganismes (Sigunda 2003).

### 1.3 Problématique

Bien que la biomasse, confrontée à diverses conditions de croissance, soit résistante et adaptée, la biofiltration à support organique requiert tout de même une surveillance au point de vue microbiologique. Ce suivi consiste en l'évaluation qualitative (type de microorganisme) et/ou quantitative (masse, activité biologique, etc.) de la biomasse et s'avère primordial pour bien cerner l'évolution des différentes espèces microbiennes; évolution qui, dans certains cas, peut se traduire par l'apparition d'espèces indésirables ou la disparition d'espèces désirables, et conséquemment une perte d'efficacité au niveau de l'enlèvement de la matière organique ou la transformation des composés azotés. Le développement d'outils analytiques simples et rapides est donc essentiel à une application routinière pour le suivi d'un procédé à échelle réelle; suivi qui est principalement axé sur le maintien des bonnes performances et du type de biomasse adéquat, particulièrement pour l'enlèvement de l'azote.

La biomasse impliquée dans la nitrification et dans la dénitrification a déjà été caractérisée (Mobarry *et al.* 1996; Bothe *et al.* 2000; Kowalchuk *et Stephen* 2001) dans les procédés

avec biomasse en suspension (Kristensen et al. 1992; Surmacz-Gorska et al. 1996; Etchebere et al. 2002; Lee et al. 2002) et certains procédés à biomasse fixée (Sakano et Kerkhof 1998; Gieseke et al. 2001; Tal et al. 2003). Différents types de sols (Stephen et al. 1996; Kowalchuk et al. 1997, 1999; Mergel et al. 2001; Avrahami et al. 2002) ainsi que divers sédiments (Seitzinger et al. 1993; Bonnet et al. 1997; Gregory et al. 2003), ont également été étudiés pour la caractérisation de ces microorganismes, tous ces milieux contenant une proportion relativement faible de matière organique.

À part un nombre très limité d'études sur la biomasse du compost (Malik *et al.* 1994; Kowalchuk *et al.* 1999; Peters *et al.* 2000; LaMontagne *et al.* 2002; Howeler *et al.* 2003), peu de travaux ont porté sur le suivi des microorganismes dans un milieu entièrement organique comme la tourbe (Malhautier 1996; Khammar *et al.* 2005), spécialement ceux impliqués dans les transformations de l'azote. Quoique quelques travaux aient permis de mieux connaître la biomasse nitrifiante et dénitrifiante dans des systèmes de traitement à biomasse fixée, aucune d'entre elles ne correspond au type de support et au type d'affluent appliqué au système de biofiltration de ce projet. L'interférence causée par la présence importante de matière organique avec les différentes méthodes de caractérisation et d'extraction de la biomasse et de ses composantes peut expliquer pourquoi peu d'études ont été réalisées jusqu'à maintenant.

L'originalité du projet repose donc principalement sur le suivi microbiologique des phénomènes de nitrification et de dénitrification dans un biofiltre à support organique, tant du point de vue de l'activité de la biomasse impliquée dans la transformation de l'azote que de la quantification de celle-ci, à différentes hauteurs dans le procédé et en cours de colonisation.

Les plus grandes difficultés du projet concernent la représentativité des échantillons de milieu filtrant recueillis par rapport à l'ensemble du biofiltre, la sélectivité des méthodes de quantification et la modification des conditions environnementales lors de l'évaluation de l'activité des microorganismes. En effet, l'hétérogénéité du support organique et la colonisation inégale des strates de milieu filtrant amène un problème de représentativité lors de l'échantillonnage. De plus, la plupart des méthodes de quantification de microorganismes sous-estiment la biomasse présente, car elles sont habituellement

sélectives pour un type ou un petit groupe d'organismes donnés. Finalement, les conditions auxquelles sont soumis les microorganismes lors de l'évaluation de leur activité ne sont généralement pas celles retrouvées à l'intérieur du procédé, ce qui risque de biaiser les résultats obtenus.

## 1.4 Objectifs du projet

Ce projet a donc pour but de mieux comprendre l'implication de la flore nitrifiante et dénitrifiante dans l'enlèvement de l'azote du lisier de porc dans un biofiltre à support organique et de décrire son comportement dans le procédé. De façon plus spécifique, les objectifs sont de :

1. Déterminer quelles méthodes de caractérisation sont susceptibles d'être utilisées de manière routinière dans un procédé de traitement des eaux avec biomasse fixée sur support organique;
  - Préparer et adapter ces techniques pour la caractérisation des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes dans un biofiltre à support organique;
  - Évaluer la variabilité et la sensibilité des techniques désignées;
2. Caractériser la colonisation d'un biofiltre à base de milieu organique par la biomasse nitrifiante et dénitrifiante;
  - Effectuer la quantification des microorganismes impliqués dans la transformation de l'azote, à différentes hauteurs dans le biofiltre et en cours de colonisation;
  - Évaluer l'activité potentielle des microorganismes impliqués dans la transformation de l'azote, à différentes hauteurs dans le biofiltre et en cours de colonisation;
  - Décrire le comportement des polluants carbonés et azotés à l'effluent, à l'intérieur de la colonne de biofiltration et dans les effluents gazeux.

Cette thèse est divisée en cinq chapitres, chacun traitant d'un aspect particulier du projet et étant complet en soit. La première partie de cette thèse est dédiée à la présentation de la recherche doctorale, de la problématique ainsi que des objectifs.

Le second chapitre est plutôt axé sur la préparation de la réaction de la polymérase en chaîne (PCR) en temps réel pour son application sur le milieu filtrant, afin d'y quantifier les microorganismes impliqués dans l'enlèvement de l'azote. Un court texte permettant d'introduire les microorganismes ciblés durant cette étude est présenté et est suivi d'une section amalgamant la méthodologie appliquée avec les résultats obtenus.

La troisième partie traite de la mise au point des méthodes de suivi des activités nitrifiante et dénitrifiante potentielles. Les principes de base de chacune des techniques choisies sont présentés dans l'introduction. Les sections suivantes de ce chapitre traitent de la façon dont celles-ci ont été adaptées pour une application sur des échantillons de milieu filtrant et d'une analyse des données récoltées permettant de s'assurer que ces méthodes sont adéquates pour ce type de support lors de l'évaluation de ces activités.

Le quatrième chapitre de cette thèse constitue le cœur du présent document et décrit le suivi de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante dans des biofiltres pilotes. Une courte introduction permet de resituer les objectifs du projet, tandis que la section suivante expose en détails le montage et l'opération des unités pilotes ainsi que les suivis physico-chimique et microbiologique qui ont été réalisés sur ces derniers. Les résultats obtenus sont ensuite analysés afin de bien comprendre la colonisation du procédé par la biomasse impliquée dans les transformations de l'azote

Les chapitres deux, trois et quatre comportent tous une courte conclusion permettant de faire ressortir les points majeurs concernant les expérimentations réalisées dans leur partie respective. Le cinquième chapitre constitue une conclusion générale rapportant de quelle façon les résultats obtenus répondent aux objectifs du projet. De plus, cette partie de la thèse présente les limites de l'étude ainsi que les implications futures de celle-ci.

À la suite de ce projet, certaines questions restées en suspens lors du projet de Garzón (2001) trouveront une réponse. En effet, le suivi du procédé à différentes hauteurs ainsi que

la caractérisation microbiologique des différents phénomènes biologiques de transformation de l'azote permettront de déterminer où s'effectuent la nitrification et la dénitrification : dans les mêmes sections ou dans des zones distinctes.

De plus, les connaissances acquises sur ces biomasses, c'est-à-dire sur leur activité et leur quantité, permettront d'évaluer le potentiel du procédé pour l'enlèvement de la matière azotée. Ce potentiel ainsi que la compréhension de la colonisation du système par les biomasses nitrifiantes et dénitrifiantes aideront à modifier adéquatement les conditions d'opération actuelles afin d'optimiser la transformation biologique de l'azote jusqu'au  $N_2$ .

L'aspect microbien qui gère les phénomènes de nitrification et de dénitrification ayant lieu dans ce type de biofiltre sera approfondi et certaines connaissances importantes sur la colonisation des différentes couches d'un biofiltre par les organismes du cycle de l'azote seront acquises.

Les données recueillies pourront également servir à d'autres études, notamment à l'élaboration d'un modèle permettant de prévoir les performances potentielles du procédé pour l'enlèvement de l'azote et la dynamique des populations bactériennes.

De plus, les méthodes utilisées lors de ce projet pourront éventuellement être appliquées afin de caractériser la biomasse nitrifiante et dénitrifiante d'un échantillon de milieu filtrant provenant de biofiltres soumis à des conditions d'opération différentes (type de substrat appliqué, taux d'aération, charge hydraulique, charge massique, etc.).

## Chapitre 2

### Préparation de la quantification des microorganismes nitrifiants et dénitrifiants par PCR en temps réel

#### 2.1 Introduction

Afin de réaliser la caractérisation des microorganismes nitrifiants et dénitrifiants dans un biofiltre à support organique, la colonisation a entre autre été suivie à l'aide du PCR en temps réel. Certains essais préliminaires étaient cependant nécessaires afin de déterminer spécifiquement quels groupes bactériens allaient être caractérisés et pour la préparation de la technique. Ce chapitre décrit donc l'ensemble des tests qui ont été réalisés afin de préparer la méthode pour son application sur le milieu filtrant organique de biofiltres pilotes: préparation des courbes étalons, vérification de l'inhibition de la réaction et évaluation de l'efficacité du PCR en temps réel.

Le choix des microorganismes s'est porté vers ceux reconnus comme étant les plus représentatifs de la biomasse impliquée dans la transformation de l'azote et dont les amorces étaient déjà conçues: les AOB, *Nitrospira*, *Nitrobacter* et les organismes dénitrifiants (Tableau 2.1). Il existe, tel que décrit dans la section 1.2.3.5, deux types de nitrite réductase, enzyme clé de la dénitrification, générés par des gènes spécifiques à ceux-ci: *nirS* et *nirK*. C'est pourquoi les gènes de ces deux enzymes ont été ciblés de façon à

maximiser la quantification des organismes dénitrifiants. Les bactéries totales ont également été dénombrées afin d'évaluer de façon relative chacun des microorganismes, c'est-à-dire la proportion des groupes quantifiés par rapport à la biomasse totale. Ceci permet de réduire le biais causé par la perte d'ADN lors des étapes d'extraction et de purification des acides nucléiques, tel que décrit dans les sections suivantes.

Tableau 2-1. Microorganismes visés et méthodes utilisées

Organismes	Gène ciblé	Méthode	Témoin Positif	Références
AOB	ADNr 16S	Taqman	ADN environnemental	Hermansson et Lindgren 2001
<i>Nitrospira</i>	ADNr 16S	Taqman	ADN environnemental	Harms <i>et al.</i> 2003
<i>Nitrobacter</i>	ADNr 16S	SybrGreen	ADN environnemental	Féray <i>et al.</i> 1999
Dénitrifiantes	<i>nirS</i>	SybrGreen	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Throbäck <i>et al.</i> 2004
	<i>nirK</i>	SybrGreen	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	Throbäck <i>et al.</i> 2004 Henry <i>et al.</i> 2004
Totales	ADNr 16S	Taqman	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	Suzuki <i>et al.</i> 2000

## 2.2 Travaux réalisés et résultats

### 2.2.1 Clonage des amplicons

Quoique de nouveaux protocoles de quantification soient en développement (Rutledge 2004), le PCR en temps réel est présentement réalisable dans la mesure où il est possible d'appliquer la méthode à un échantillon d'ADN dont la concentration du gène visé est connue, de manière à pouvoir élaborer une courbe étalon. Celle-ci servira de référence pour la quantification d'échantillons d'ADN environnementaux dont le nombre de copies de ce gène est inconnu.

Afin de produire une solution étalon, pour chaque microorganisme visé, l'amplicon provenant du gène cible a été cloné à l'aide d'un vecteur plasmidique, tel qu'illustré à la Figure 2.1; chacune des étapes est détaillée dans le texte qui suit.

Pour les gènes dont le témoin positif était disponible au laboratoire (*nirS*, *nirK* et totales), ce dernier a été mis en culture dans un bouillon nutritif (Nutrient Broth, DIFCO™) et incubé 24 heures à 37°C. Pour cette partie du travail, un témoin positif consistait en un microorganisme possédant la séquence génomique d'intérêt. L'ADN de la culture a ensuite été extrait à l'aide d'une trousse DNeasy Tissue (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. Pour les gènes dont le témoin positif n'était pas disponible au laboratoire ou difficilement accessible en culture pure (AOB, *Nitrospira*, *Nitrobacter*), de l'ADN a été extrait de milieu filtrant provenant d'une colonne de biofiltration déjà en opération, à l'aide du "FastPrep DNA Soil Isolation kit" de Qbiogene, selon le protocole du fournisseur (Voir annexe A2.9). Ce biofiltre fonctionnait depuis deux ans et était alimenté avec du lisier prétraité de façon physico-chimique. Le taux d'aération était d'environ  $7 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  et la charge hydraulique était approximativement de  $0.020 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ .

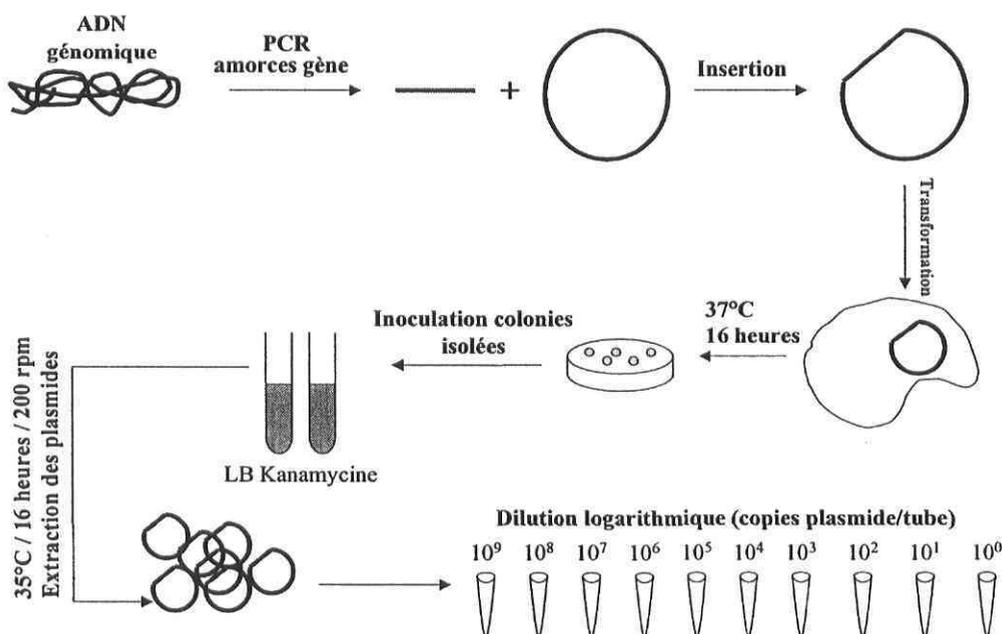


Figure 2.1. Clonage de l'amplicon pour l'élaboration de la courbe étalon

Des PCR ont ensuite été réalisés sur les témoins positifs afin de s'assurer que les amorces utilisées étaient efficaces dans les conditions de réaction données dans la littérature (annexe

5: A5.1, A5.3 et A5.4). La polymérase utilisée provient du "Taq PCR Master Mix Kit" de Qiagen et a été utilisée selon les indications du fournisseur. Les amplifications ont été faites en duplicata ou en triplicata. Une électrophorèse sur gel d'agarose 1% a ensuite été réalisée (annexe 2, A2.2 à A2.5), sur le produit des réactions, de façon à s'assurer qu'une amplification avait bien eu lieu et que l'amplicon était de la bonne longueur (Figure 2.2).

On remarque à la Figure 2.2 qu'il y a eu amplification pour chacun des gènes à l'étude, car des bandes sont visibles sur tous les gels. On s'attendait à obtenir un amplicon de 425, 472 et 397 paires de bases (pb) pour *nirS*, *nirK* et *Nitrobacter* respectivement et, en observant le marqueur de taille moléculaire, à gauche du gel, on voit que la taille obtenue correspond effectivement à celle attendue. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les AOB, *Nitrospira* et les bactéries totales pour lesquels on attendait respectivement 116, 151 et 123 pb. Ces résultats permettent de croire que les amorces amplifient effectivement les bons gènes chez chacun de ces microorganismes.

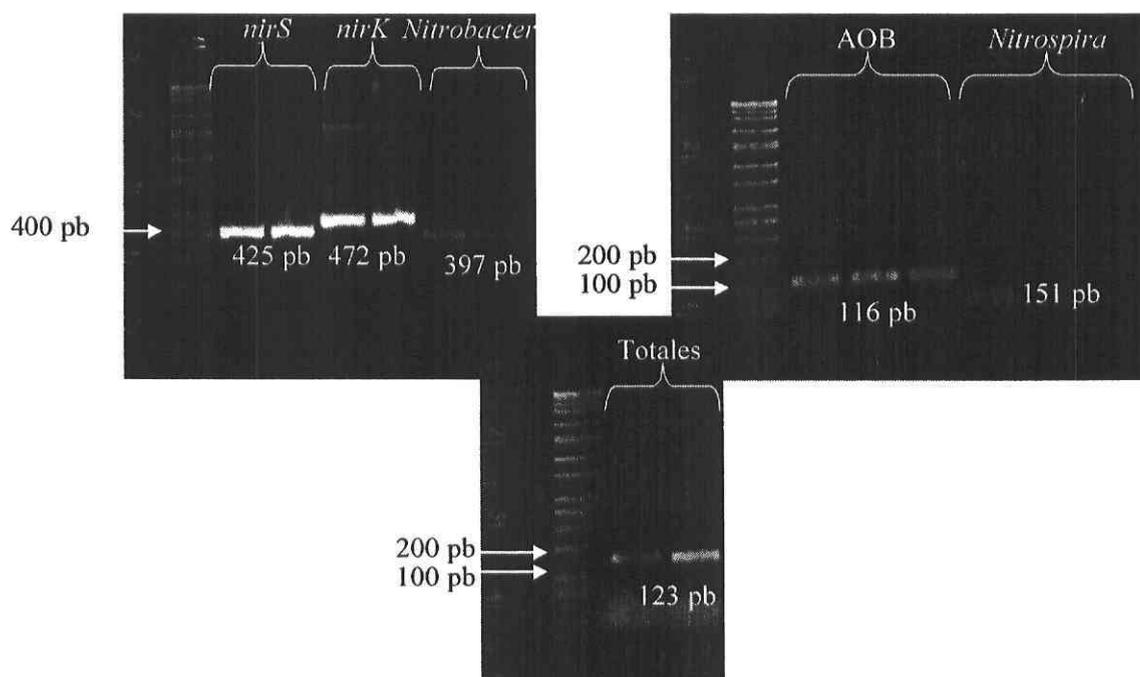


Figure 2.2. Vérification de l'amplification par électrophorèse sur agarose 1%

Les produits de la réaction PCR ont été purifiés à l'aide d'un kit "QIAquick Spin" de Qiagen, selon le protocole du fournisseur, afin de nettoyer les amplicons des amorces, dNTP et enzymes résiduelles. Les amplicons purifiés ont ensuite été clonés à l'aide de la

trousse "QIAGEN PCR Cloning<sup>plus</sup> kit" de Qiagen selon les indications du fournisseur. Le vecteur contenait un gène de résistance à la kanamycine; seuls les microorganismes ayant acquis le vecteur peuvent donc croître sur le milieu de culture LB-Kanamycine X-gal/IPTG. De plus, le plasmide est conçu de façon à ce que l'insertion se fasse au niveau du gène LacZ  $\alpha$ -peptide. Ce dernier confère aux microorganismes une activité  $\beta$ -galactosidase qui, en présence de X-gal et IPTG, produisent une colonie bleue. Lorsque ce gène a été inactivé par l'insertion d'un amplicon, les microorganismes sont dans l'incapacité d'utiliser ces deux sucres et produisent alors une colonie blanche ou bleue pâle, dépendant de la longueur de l'amplicon. Il est ainsi plus aisé de discerner les clones ayant été transformés par un plasmide sans insert de ceux dans lesquels un insert est présent. Pour obtenir des informations concernant le clonage, la préparation des milieux de culture et les autres méthodes utilisées, voir l'annexe 2 (A2.7 et A2.8).

Pour chacun des gènes à l'étude, cinq clones positifs ont été contrôlés afin de s'assurer que l'insert à l'intérieur du plasmide provenait effectivement de l'amplicon désiré. Pour ce faire, un PCR a été réalisé sur chacun de ces clones avec des amorces spécifiques au plasmide et côtoyant le site d'insertion: SP6 (5'-CAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3') et T7 (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA G-3'). Une électrophorèse a ensuite été effectuée avec les produits de PCR pour vérifier la longueur de l'insert. Un témoin négatif, c'est-à-dire une colonie bleue, a également été soumis à un PCR afin de comparer la longueur obtenue en absence d'insert (Figure 2.3).

On remarque à la Figure 2.3, pour *Nitrospira*, *Nitrobacter*, les AOB, *nirS* et les bactéries totales, que la longueur de l'amplicon des clones contrôlés correspond à la longueur attendue, inscrite sous les bandes. Pour *nirK*, deux des clones contiennent un insert d'une longueur beaucoup plus grande que celle attendue, d'environ 2000 pb. Cela signifie probablement que, lors de la ligation des amplicons avec le vecteur, de l'ADN génomique ou des concatémères de l'insert ont pu se lier au plasmide. Ces clones ont été mis de côté, étant considérés comme des résultats négatifs.

On peut également observer certaines colonnes du gel où aucune bande ne peut être décelée. Ceci est dû au fait que lors du PCR, certains tubes n'ont pas été fermés de façon adéquate, causant l'évaporation de la solution réactionnelle. L'accroissement de la

concentration en réactif a inhibé la réaction, ce qui ne signifie pas que ces clones étaient négatifs pour l'insert recherché. Par souci d'économie de temps et de réactifs, et parce qu'un seul clone positif était suffisant pour le reste des manipulations, ces réactions n'ont pas été reprises.

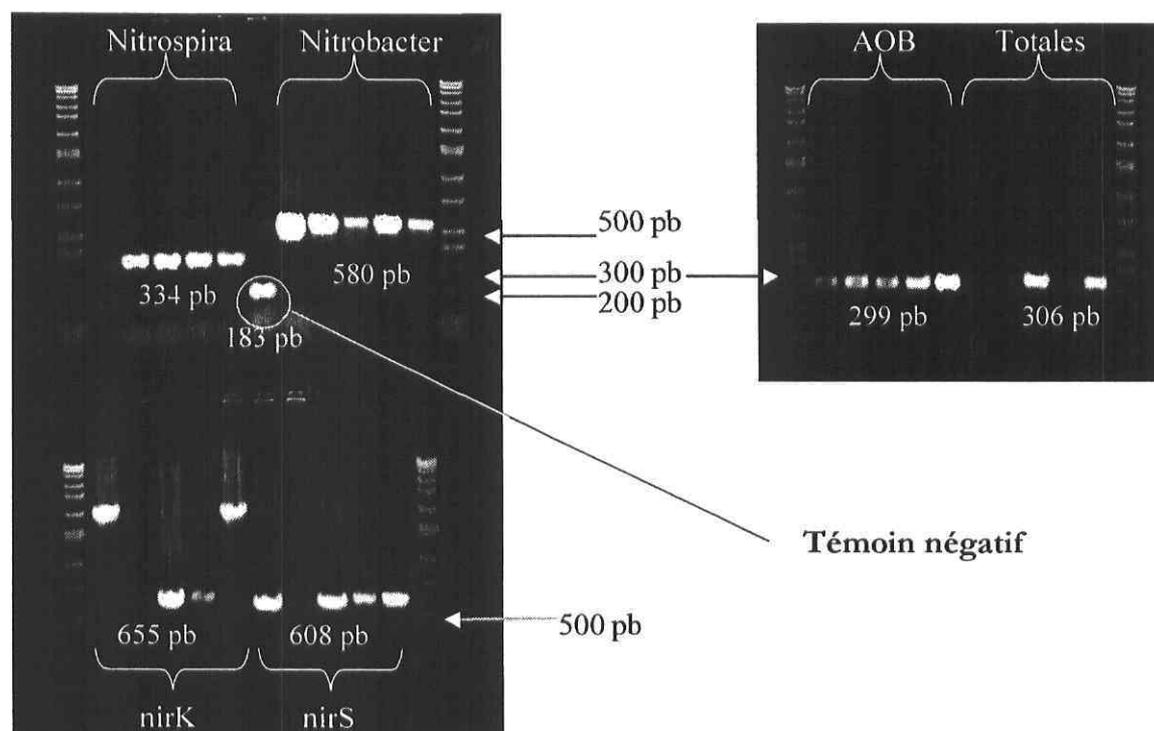


Figure 2.3. Vérification de l'insert des clones par électrophorèse sur agarose 1%

Il est aussi possible de voir que le témoin négatif montre une bande de longueur attendue (183 pb) (Figure 2.3). Cette manipulation avait pour but de s'assurer que le nombre de paires de bases associées à la séquence plasmidique, nécessairement ajoutées à la longueur de l'insert lors de l'amplification avec T7 et SP6, correspondait réellement au schéma du plasmide fourni dans le guide du fournisseur.

Après l'obtention de ces résultats, un clone positif pour chaque gène a été inoculé en duplicata dans un bouillon LB-Kanamycine, puis incubé pour la nuit à 37°C et agité à 200 rpm. Les cultures ont ensuite été centrifugées à 5000 g, 1 minute, dans le but de récolter la fraction bactérienne. Les plasmides de celle-ci ont été extraits à l'aide d'un kit "QIAprep Miniprep" de Qiagen selon le protocole du fournisseur et dosés avec un spectrophotomètre Genequant (Amersham Bioscience) à 230, 260 et 280 nm (Tableau 2.2).

Tableau 2-2. Dosage des extraits plasmidiques

Organisme visé	Clones	260/230	260/280	Conc. (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Copies $\mu\text{L}^{-1}$
<i>Nitrobacter</i>	N1-1	2,314	1,780	162,0	34,8E09
	N1-2	2,110	1,729	115,0	24,7E09
<i>Nitrospira</i>	SP1-1	2,220	1,747	196,5	44,8E09
	SP1-2	2,322	1,779	137,0	31,2E09
AOB	A13-1	2,417	1,871	116,0	26,7E09
	A13-2	1,941	1,684	165,0	37,9E09
<i>nirS</i>	S1-1	2,328	1,832	142,0	30,3E09
	S1-2	2,243	1,870	129,0	27,5E09
<i>nirK</i>	K7-1	2,208	1,769	191,0	40,3E09
	K7-2	2,426	1,799	156,5	33,0E09
Totales	T5	2,459	2,000	75,0	17,2E09

Lors d'un dosage par spectrophotométrie, les ratios de l'absorbance à 260/280 et 260/230 permettent d'évaluer la quantité d'impuretés résiduelles, respectivement sous forme protéiques ou phénoliques, dans la solution d'ADN; de l'ADN pur montre un ratio supérieur à 1,8 pour les deux rapports (Phillips et Deutsch 2003). On peut remarquer dans le tableau 2.2 que les extraits obtenus ont un degré de pureté élevé.

Les plasmides retenus ont également été séquencés, à partir de l'amorce T7, au Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CRCHUL). Leur séquence a été déterminée par électrophorèse capillaire suite à une réaction de polymérisation avec la chimie des Big Dye sur des thermocycleurs pour microplaques de 96 puits. Tous les échantillons ont été résolus à l'aide de la plateforme ABI 3730xl (Applied Biosystems, CA). Ces séquences sont disponibles sous les numéros d'accèsion DQ386157-DQ386160 sur Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) et à l'annexe 5 (A5.5). Celles-ci ont été comparées avec les banques de données disponibles via l'Internet sur Genbank et la similarité avec des séquences analogues a été vérifiée. Pour *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *nirS* et les bactéries totales, la séquence correspondait aux microorganismes visés, quoique les amplicons ne provenaient pas de souches pures pour *Nitrobacter* et *Nitrospira*, tel que mentionné à la section 2.1.

Dans le cas de *nirK*, il n'était pas possible de retrouver la séquence de l'amorce R3Cu dans l'insert tandis que pour les AOB, la séquence de la sonde TMP1 n'a pu être retrouvée que partiellement à l'intérieur de l'insert. Par contre, une comparaison avec les banques de

données (Genbank) a permis de constater que la séquence de l'insert avait tout de même beaucoup de similarité avec les AOB et la séquence des deux amorces était présente aux extrémités de l'ADN. Ceci laisse croire que l'insert provenait effectivement d'un organisme nitrifiant, puisque les amorces utilisées avaient une forte spécificité pour ce groupe. Pour ces raisons, le PCR en temps réel utilisant la technologie Taqman<sup>®</sup> n'a pu être utilisé pour ce groupe de microorganismes étant donné l'inefficacité de la sonde. Par contre, puisque les amorces fonctionnaient correctement et que la séquence avait une forte homologie avec le groupe visé, il a été possible de réaliser la réaction par Sybr<sup>®</sup>Green.

Étant donné la difficulté à obtenir une droite étalon pour *nirK* tant du point de vue de la séquence du plasmide que de la spécificité des amorces, il a été décidé que seuls les organismes possédant le gène *nirS* seraient quantifiés lors de la caractérisation de la biomasse dénitrifiante. Il serait par contre intéressant lors de projets futurs d'arriver à quantifier les deux types de microorganismes étant donné que leur proportion respective a rarement été évaluée dans des échantillons environnementaux (voir section 1.2.3.4).

En connaissant la longueur totale du plasmide, la longueur de l'insert et le poids moléculaire d'une paire de base, il a été possible de calculer le nombre de copies du vecteur par unité de volume. La valeur obtenue (dernière colonne du tableau 2.2; copies  $\mu\text{l}^{-1}$ ) a servi de base aux calculs de dilution logarithmique lors de l'élaboration de la courbe étalon. Un exemple de calcul est présenté à l'annexe 4 (A4.2).

### 2.2.2 Conception des courbes étalons

Tel qu'expliqué à la section 2.2.1, des dilutions ont été réalisées en série pour élaborer la courbe étalon qui permet de quantifier, dans un échantillon d'ADN environnemental, les organismes visés. Pour chacun de ces gènes, des dilutions contenant de  $10^1$  à  $10^8$  copies du gène par tube réactionnel ont été soumises, en duplicata, à des réactions de PCR en temps réel. Les conditions de réaction sont résumées à l'annexe 5 (A5.2 et A5.4). Les programmes d'amplification et les conditions de réactions ont été conçus à l'aide des conditions usuelles de PCR tirées des références associées et avec les indications du fournisseur du mastermix PCR (Invitrogen Canada inc.). Pour les AOB, une validation de l'inefficacité de la sonde

TMP1 a été réalisée en effectuant deux PCR en temps réel: un avec la technologie Taqman® et l'autre par Sybr® Green.

Les courbes d'amplification et les droites étalons obtenues à la suite des essais sont présentées aux Figures 2.4 à 2.9, tandis qu'un résumé des résultats est fourni au tableau 2.3. Les figures de gauche représentent l'ensemble des courbes d'amplification pour toutes les concentrations testées et tous les duplicats réalisés. Les efficacités de réaction ont été calculées tel que décrit dans la section 1.2.4.1. Les Figures 2.10 et 2.11 permettent d'observer, à l'aide de la courbe de fusion des amplicons, qu'il n'y a pas eu de faux positifs par l'amplification de séquences non désirées lors du PCR sur les AOB et les organismes totaux. En effet, dans la situation où un brin d'ADN non visé avait été amplifié en parallèle du gène désiré, il aurait été possible d'observer plusieurs pics de fusion, ce qui n'est manifestement pas le cas ici.

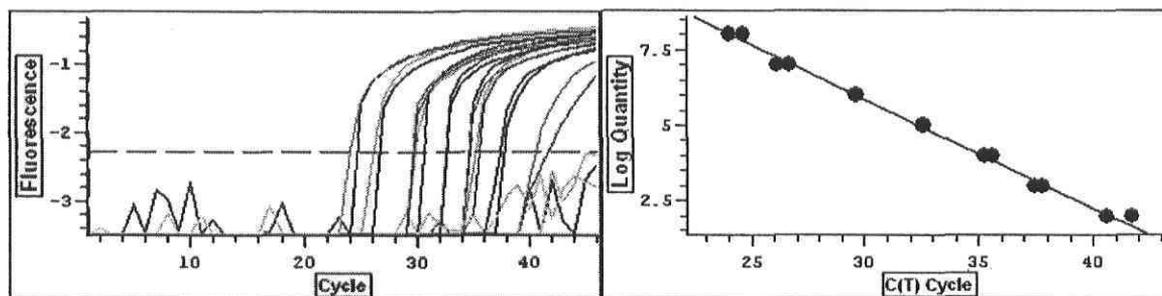


Figure 2.4. Amplification PCR en temps réel des étalons *Nitrobacter*

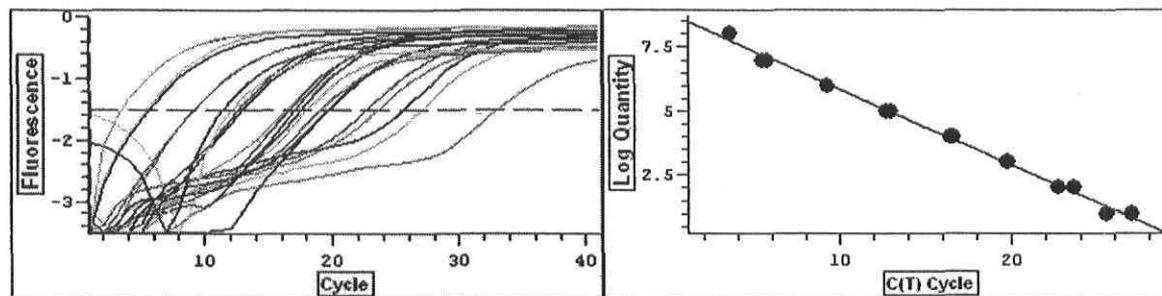


Figure 2.5. Amplification PCR en temps réel des étalons *nirS*

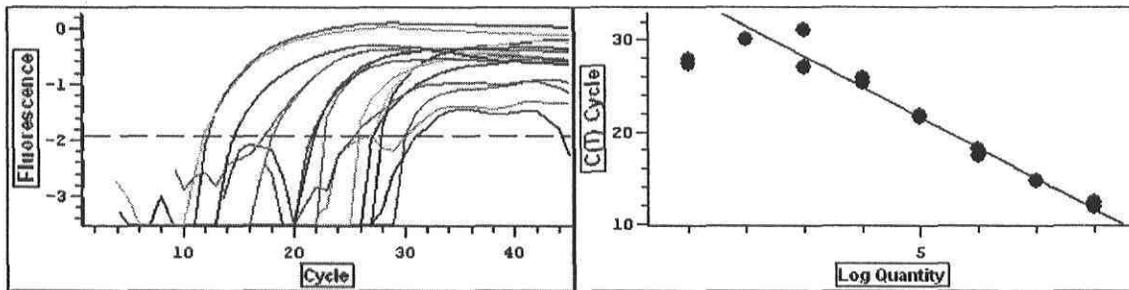


Figure 2.6. Amplification PCR en temps réel des étalons Totaux

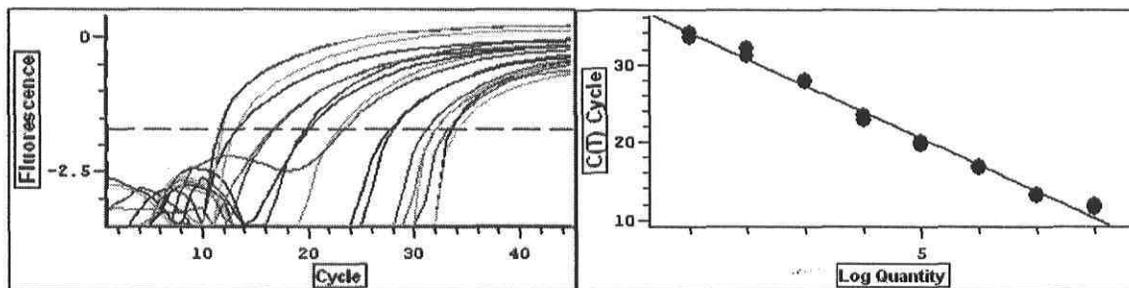


Figure 2.7. Amplification PCR en temps réel des étalons *Nitrospira*

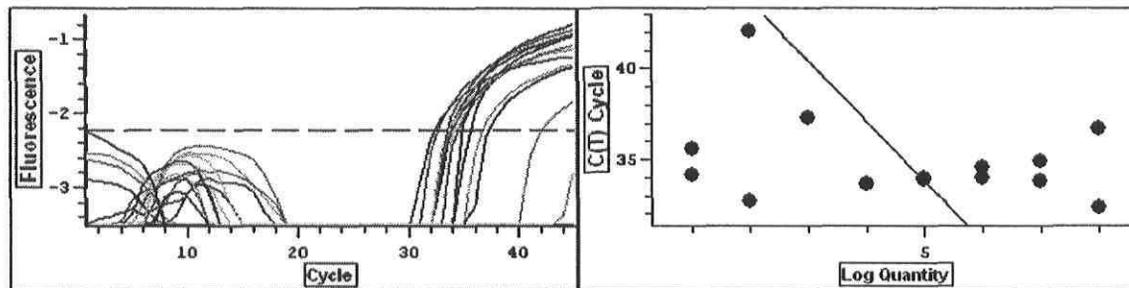


Figure 2.8. Amplification PCR en temps réel des étalons AOB par Taqman<sup>®</sup>

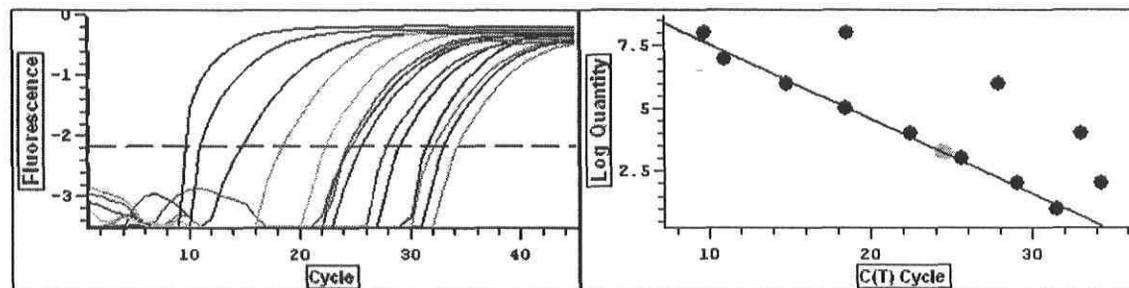


Figure 2.9. Amplification PCR en temps réel des étalons AOB par Sybr<sup>®</sup> Green

Pour tous les microorganismes dont la quantification a été réalisée à l'aide de la molécule fluorescente Sybr<sup>®</sup> Green, il a été nécessaire d'effectuer ce type de vérification. Dans tous les cas, un seul pic pouvait être visible, dont la température de fusion dépendait de la

longueur de l'amplicon et du pourcentage de guanine et cytosine (%G+C). Plus la longueur est importante et plus le %G+C est élevé, plus la température de fusion ( $T_m$ ) est élevée. Par exemple, pour les microorganismes totaux et les AOB, la  $T_m$  se situe respectivement autour de 85°C et 82°C pour des amplicons de 143 pb et 117 pb et contenant respectivement 56,7% et 54,7% de G+C, comparativement à environ 90°C pour *nirS* dont la longueur était d'environ 411 pb et d'un %G+C de 63,8%. De plus, il est possible de voir que tous les échantillons ne montrent pas nécessairement exactement la même  $T_m$  pour un même gène ciblé; cela est causé par le fait que les amorces sont dégénérées sur plusieurs bases et qu'elles visent donc des groupes microbiens plutôt que des espèces spécifiques. Ceci permet l'amplification de séquences ayant quelques dissimilarités, ce qui se répercute nécessairement sur les courbes de fusion.

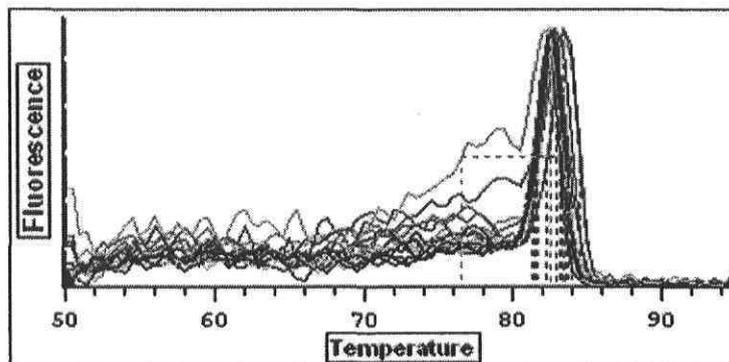


Figure 2.10. Courbes de fusion de l'amplification PCR en temps réel des étalons AOB

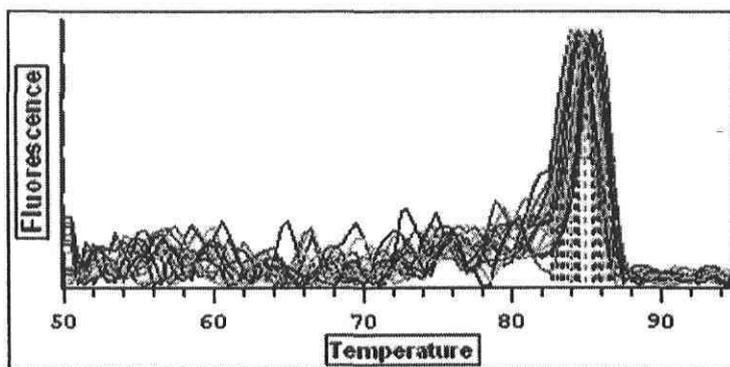


Figure 2.11. Courbes de fusion de l'amplification PCR en temps réel des étalons Totaux

On peut voir dans le tableau 2.3 que l'efficacité avoisine les 100% pour tous les microorganismes. Le coefficient de corrélation des courbes étalons démontre que les droites expliquent bien la relation entre les paramètres mis en graphique. Les valeurs obtenues sont

similaires à celles retrouvées dans la littérature pour ce type de réaction (Ginzinger 2002; Malinen *et al.* 2003). L'obtention de pourcentage dépassant légèrement 100% d'efficacité peut sembler étrange. Ceci peut s'expliquer principalement par une certaine subjectivité lors de la conception de la droite étalon reliée à:

- La fixation arbitraire du niveau seuil;
- Le lissage des courbes réalisé de façon informatique;
- Le choix du nombre de cycles servant à la soustraction du bruit de fond.

Tableau 2-3. Résultats des PCR en temps réel sur *Nitrobacter*, *nirS* et *nirK*

Gène	Efficacité <sup>a</sup>	R <sup>2a</sup>	Intervalle (copies tube <sup>-1</sup> )
ADNr 16S AOB	100 %	0,994	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>8</sup>
ADNr 16S <i>Nitrobacter</i>	107 %	0,987	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>8</sup>
ADNr 16S <i>Nitrospira</i>	100 %	0,989	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>8</sup>
<i>nirS</i>	99,7 %	0,979	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>8</sup>
ADNr 16S Totaux	106 %	0,972	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>8</sup>

<sup>a</sup> Pour chaque gène, ces résultats représentent la moyenne de 4 courbes étalons, chacune faite en duplicata

La plupart des auteurs indique que l'utilisation d'amplicons variant entre 50 et 150 pb constitue l'approche donnant la meilleur efficacité d'amplification. Cependant, certains autres affirment qu'il est possible de se rendre, pour le Sybr<sup>®</sup>Green, jusqu'à 300 pb (Ginzinger 2002) et même jusqu'à 400 pb (Dorak 2004). Ceci explique les résultats positifs obtenus pour *nirS* et *Nitrobacter*, dont la longueur de l'amplicon avoisine 400 pb.

À la lumière de l'ensemble des résultats, il est donc permis de croire que pour les AOB, *nirS*, *Nitrospira*, les bactéries totales et pour *Nitrobacter*, la quantification par PCR est applicable pour quantifier des extraits d'acides nucléiques provenant d'échantillons environnementaux. Pour les AOB et *Nitrospira*, ces résultats étaient prévisibles puisqu'une méthode avait déjà été développée pour leur quantification. Cependant, c'était la première fois que *Nitrobacter* et les microorganismes dénitrifiants possédant le gène *nirS* étaient énumérés par PCR en temps réel.

### 2.2.3 Effet des impuretés sur l'efficacité de la PCR en temps réel

La présence d'impuretés dans l'extrait d'ADN, comme les acides humiques, nuit aux enzymes impliquées dans la réaction d'amplification. La nature du milieu filtrant utilisé dans les biofiltres organiques constitue un obstacle important à la réalisation de PCR en temps réel, car il est pratiquement assuré qu'une certaine quantité d'acides humiques se retrouve dans l'extrait d'acides nucléiques. Afin de réduire l'action de ces substances sur la réaction enzymatique, il est possible de diluer l'extrait d'ADN de façon à diminuer la concentration en inhibiteurs. Cependant, une dilution trop importante réduit le seuil minimal de détection des microorganismes ciblés.

Ces substances indésirables peuvent changer l'efficacité de la réaction, rendant difficile une quantification fiable des échantillons d'ADN. Ginzinger (2002) mentionne qu'il est préférable que les efficacités soient similaires ou du moins supérieures à 90% pour comparer des résultats entre eux.

Des essais ont été réalisés afin de vérifier l'influence d'impuretés provenant du milieu filtrant sur le PCR en temps réel. Pour ce faire, des solutions d'inhibiteurs représentatives de la réalité ont été préparées en digérant des extraits d'ADN environnementaux avec de la DNase (voir annexe 2, A2.6), enzyme permettant la monomérisation des acides désoxyribonucléiques. Cette digestion avait pour objectif d'éliminer les brins d'ADN pouvant être amplifiés lors des essais, tout en conservant les substances potentiellement inhibitrices. L'ADN environnemental provenait d'un échantillon de milieu filtrant extrait avec le "Fast DNA spin kit for soil" de Qbiogene (Mp Biomedicals, Ohio), à partir d'un biofiltre ayant servi à l'enrichissement de biomasse dénitrifiante (section 3.2.2.1). Le digestat a ensuite été dilué en série de 10 à 10000 fois, par échelon de 10X, afin de vérifier l'effet des inhibiteurs à différentes concentrations sur l'amplification de l'ADNr 16S de *Nitrospira*. Cinq courbes étalons ont donc été réalisées avec 1,0E03, 1,0E05 et 1,0E08 copies par tube réactionnel : une courbe sans inhibiteur et les quatre autres avec 2 µl de la dilution de digestat. Ce volume correspond à la quantité de solution d'ADN normalement ajoutée lors des réactions de PCR.

Les résultats obtenus (tableau 2.4) montrent que la présence d'inhibiteurs influence à la baisse l'efficacité de la réaction sans toutefois nuire à la réplicabilité de l'essai en ne changeant pas le coefficient de rendement de la droite de régression. En effet, l'efficacité passe de 103 % en absence d'inhibiteur et diminue graduellement jusqu'à 92% lorsque réalisée avec un extrait dilué 1:10.

Tableau 2-4. Influence des impuretés sur l'efficacité de l'amplification de l'ADNr 16S de *Nitrospira*

Dilution	Efficacité (%)	R <sup>2</sup>
1:10	92,0	0,997
1:100	95,3	0,997
1:1000	98,4	0,998
1:10000	104	0,997
Sans impuretés	103	0,995

Quoique ces résultats montrent que l'efficacité est négativement influencée par les inhibiteurs, un échantillon dilué dix fois permet encore d'obtenir une efficacité suffisamment élevée pour comparer les résultats entre eux. Afin de permettre une amplification se rapprochant le plus possible d'une efficacité maximale et pour éviter de trop accroître le seuil minimal de quantification, une dilution de 1:100 sera réalisée sur les extraits d'ADN avant leur quantification. Même si une dilution 1:10 permet d'augmenter le seuil de détection d'un ordre de grandeur en ne diminuant que de 3% l'efficacité, il est apparu important de réaliser des réactions dont l'efficacité se rapprochait le plus de 100% étant donnée une certaine imprécision au niveau de la conception de la droite étalon (section 2.2.2).

Pour une dilution de 1:100, d'un extrait d'ADN environnemental réalisé sur 0,4g humide de milieu filtrant ayant une teneur en eau "humide" (TEEh) de 70%, le seuil minimal détectable est de 4,2E05 copies du gène par gramme sec de milieu filtrant. Pour de la pouzzolane ayant une TEEh de 40%, ce seuil est d'environ 9,3E04 copies par gramme sec (calculs à l'annexe 4, A4.3).

## 2.3 Conclusion

Pour l'application de la biologie moléculaire comme outil analytique permettant la caractérisation microbiologique d'un milieu filtrant organique, il était essentiel de concevoir les stocks de plasmides utilisés comme canevas des courbes étalons qui, à leur tour, permettent la quantification des microorganismes visés.

Une vérification des courbes étalon a été réalisée afin de s'assurer que ces dernières permettaient effectivement, à l'aide des amorces et pour certains, de sondes fluorescentes, la quantification des groupes bactériens désirés. La qualité de l'amplification des plasmides lors de l'élaboration de la courbe étalon ainsi que le séquençage de ces derniers a permis de constater que la méthode est adéquate pour effectuer une quantification moléculaire des microorganismes ciblés.

Des essais ont été réalisés afin de s'assurer que la présence d'inhibiteurs provenant des échantillons de milieu filtrant organique ne constituait pas un obstacle majeur à cette quantification. Les résultats obtenus permettent de croire que les substances co-extraites avec les acides nucléiques, à l'aide d'une trousse d'extraction de Qbiogene, ne nuisent pas de façon significative à la réaction d'amplification. En effet, même une dilution aussi faible que 10 fois permet d'obtenir une efficacité suffisante pour permettre l'utilisation des données obtenues. Cependant, une dilution de 100 fois a été utilisée pour la suite des essais afin de s'assurer que l'inhibition soit minimale.

L'ensemble des données récoltées lors de ces expérimentations démontre que la quantification par PCR en temps réel de *Nitrobacter*, *Nitrospira*, AOB, bactéries totales et les dénitrifiantes possédant le gène *nirS* est possible et applicable pour des échantillons contenant une concentration élevée en matière organique, comme le milieu filtrant du procédé de biofiltration.

## **Chapitre 3**

### **Développement de méthodes pour l'évaluation de l'activité des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes**

#### **3.1 Introduction**

La caractérisation de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante implique le suivi de l'activité de ces microorganismes dans le procédé. Tel que décrit dans la section 1.2.4.2, il existe plusieurs méthodes permettant d'évaluer leur activité. Cependant, seulement quelques-unes d'entre elles sont facilement applicables de façon routinière. La respirométrie azotée et le blocage à l'acétylène constituent des techniques de suivi aisément réalisables en laboratoire. Aucune étude n'a cependant utilisé ces méthodes afin d'évaluer l'activité de ces microorganismes lorsque présents sur un support organique traitant des eaux usées.

Ce chapitre traitera donc des travaux accomplis au cours de ce projet de doctorat afin de vérifier l'applicabilité de ces deux techniques, c'est-à-dire leur sensibilité ainsi que leur variabilité, pour une biomasse fixée sur le milieu filtrant organique, et de les préparer à être utilisées pour le suivi d'un procédé à l'échelle pilote.

### 3.1.1 Activité des bactéries nitrifiantes: respirométrie azotée

La respirométrie constitue une méthode rapide et précise permettant d'évaluer l'activité de microorganismes aérobies (Spanjers et Vanrolleghem 1995) et est déjà utilisée pour le suivi de l'activité de la biomasse hétérotrophe dans un biofiltre à support organique (Gilbert *et al.* 2005). Quoique la respirométrie ait déjà été utilisée pour évaluer l'activité des microorganismes nitrifiants (Surmacz-Gorska *et al.* 1996; Ginestet *et al.* 1998; Kim *et al.* 2001), aucune étude n'a porté sur l'application de cette méthode pour les organismes nitrifiants présents sur un support organique. Il était donc essentiel de vérifier si la technique est applicable à ce type de biomasse.

L'utilisation de certains inhibiteurs, ciblant spécifiquement l'activité des organismes nitrifiants, permet de connaître précisément la vitesse à laquelle ceux-ci consomment l'oxygène pour réaliser la nitrification. En effet, l'allylthiourée (ATU) est largement reconnu dans le monde scientifique comme étant un inhibiteur spécifique de l'activité des AOB (Surmacz-Gorska *et al.* 1996; Ginestet *et al.* 1998; McCarty 1999). De plus, des essais réalisés avec l'azide ( $N_3^-$ ) et le chlorate ( $ClO_3^-$ ) ont permis d'observer la pertinence d'utiliser ces molécules comme inhibiteurs spécifiques de l'activité des NOB (Belser et Mays 1980; Hynes et Knowles 1983; Surmacz-Gorska *et al.* 1996; Ginestet *et al.* 1998). Ginestet *et al.* (1998) ainsi que Surmacz-Gorska *et al.* (1996) ont démontré la faisabilité d'une utilisation successive d'inhibiteurs pour différencier l'activité des AOB de celle des NOB lors d'essais sur des communautés bactériennes en suspension. La différence de pente en présence et en absence de l'inhibiteur spécifique permet de déterminer l'activité de chacune des biomasses, qu'elle soit nitritante, nitratante ou hétérotrophe, au sein du même essai.

Le but de certains tests réalisés lors de ce projet était de vérifier l'influence des différents inhibiteurs sur l'activité respirométrique des organismes nitrifiants présents dans un échantillon de milieu filtrant organique. En effet, l'application des techniques de Ginestet *et al.* (1998) et de Surmacz-Gorska *et al.* (1996) n'impliquait généralement pas une communauté bactérienne aussi complexe que celle retrouvée sur des particules de milieu filtrant organique traitant du lisier de porc. Il est ainsi possible que ces substances aient une influence sur l'activité endogène de la biomasse et sur la respiration des microorganismes hétérotrophes, auquel cas l'activité respirométrique obtenue à l'aide de ces méthodes serait

biaisée. Il importe donc de s'assurer que les inhibiteurs de NOB n'influencent pas l'activité des organismes hétérotrophes et la respiration endogène de la flore bactérienne, afin d'être certain que l'activité mesurée est effectivement due à la respiration de la biomasse visée.

D'autres essais ont également été réalisés afin de déterminer si la respirométrie azotée est sensible, c'est-à-dire si elle permet de discerner une biomasse active d'une biomasse moins active. Pour ce faire, différentes concentrations de milieu filtrant à l'intérieur du respiromètre, donc de biomasse, ont été soumises à l'essai, de façon à simuler diverses activités ou degrés de colonisation.

### **3.1.2 Activité des bactéries dénitrifiantes: blocage de l'oxyde nitreux réductase par l'acétylène**

Le blocage de l'enzyme catalysant la dernière étape de la dénitrification, la  $N_2O$  réductase (NOS), permet d'évaluer indirectement la vitesse de formation du  $N_2$  en mesurant le taux de production du  $N_2O$ . En effet, l'acétylène ( $C_2H_2$ ) inhibant cette enzyme, l'accumulation du  $N_2O$  devient un indice précis de l'activité des organismes dénitrifiants. De plus, la mesure du  $N_2O$  est beaucoup plus facile que celle du  $N_2$  et un large éventail d'appareils peut en faire l'analyse.

Cette méthode est largement répandue afin d'évaluer *in situ* la perte d'azote dans les champs agricoles suite à l'épandage de fertilisants (Hallmark et Terry 1985; Ryden *et al.* 1987; Klemetsson *et al.* 1990; Well *et al.* 2003). Elle a également été utilisée pour quantifier l'activité des organismes dénitrifiants présents dans les sédiments (Seitzinger *et al.* 1993; Teisser et Torre 2002; Bernot *et al.* 2003). L'application *in situ* de celle-ci dans un biofiltre à support organique est problématique, car l'ajout d'acétylène dans le procédé risque d'influencer à long terme les performances d'enlèvement des polluants. Certains auteurs ont partiellement résolu cette problématique en réalisant l'essai *ex-situ* sur des échantillons de sols (Murray et Knowles 2003), de sédiments (Seitzinger *et al.* 1993; Tessier et Torre 2002) et de boues activées (Hallin et Pell 1994).

Le blocage à l'acétylène est une méthode intéressante pour évaluer le potentiel de dénitrification, car cette molécule inhibe également les enzymes impliquées dans la nitrification (Knowles 1990) à une pression partielle située entre 1 et 10 Pa (Keeney 1986;

Bollmann et Conrad 1997); le  $N_2O$  produit ne provient donc que du processus de dénitrification lorsqu'une pression partielle plus élevée d'acétylène est appliquée à la biomasse.

Certaines études ont démontré qu'une exposition successive à 10 Pa puis à 10 kPa permettait de discriminer la portion de  $N_2O$  produite par les organismes nitrifiants d'avec celle produite par la dénitrification incomplète et la chimiodénitrification (Klemetsson *et al.* 1990). De plus, la mesure de la dénitrification complète, évaluée en comparant la quantité de  $N_2O$  totale produite lors d'une exposition à 10 kPa de  $C_2H_2$  avec celle à 10 Pa, est possible (Figure 3.1).

On sait qu'une portion de la biomasse dénitrifiante effectue une dénitrification incomplète, c'est-à-dire qu'elle transforme l'azote en  $N_2O$  sans se rendre jusqu'au  $N_2$  (Knowles 1982; Hanaki *et al.* 1992). Plusieurs auteurs ont également montré qu'un processus abiotique appelé chimiodénitrification produit du  $NO$ , du  $N_2O$  et du  $N_2$  à partir de  $NO_2^-$  dans les sols humides et acides (Conrad 1990; Thorn et Mikita 2000; Kappelmeyer *et al.* 2003). De plus, tel que décrit précédemment, certains organismes nitrifiants produisent du  $N_2O$  lors d'une déficience en oxygène dans leur milieu. La quantité de  $N_2O$  normalement produite par un échantillon environnemental provient donc de ces trois phénomènes et constitue la production de base de cet échantillon. À la Figure 3.1, cette situation est représentée par la première colonne, où aucun inhibiteur n'est présent.

Puisque la présence de 10 Pa d'acétylène inhibe spécifiquement la biomasse nitrifiante, il est possible, en soumettant la biomasse à ces conditions, de distinguer la production de  $N_2O$  des nitrifiants de celle provenant des deux autres processus (chimiodénitrification et dénitrification incomplète). Cette situation est présentée par la seconde colonne de la Figure 3.1, où la production de  $N_2O$  par les nitrifiantes est absente.

L'inhibition spécifique de la biomasse dénitrifiante accomplissant une dénitrification complète, par l'application de 10 kPa de  $C_2H_2$ , permet ensuite d'évaluer le taux de transformation de l'azote par ces microorganismes en évaluant l'augmentation de la production de  $N_2O$  dans ces conditions (3<sup>e</sup> colonne de la Figure 3.1), par rapport à la deuxième condition.

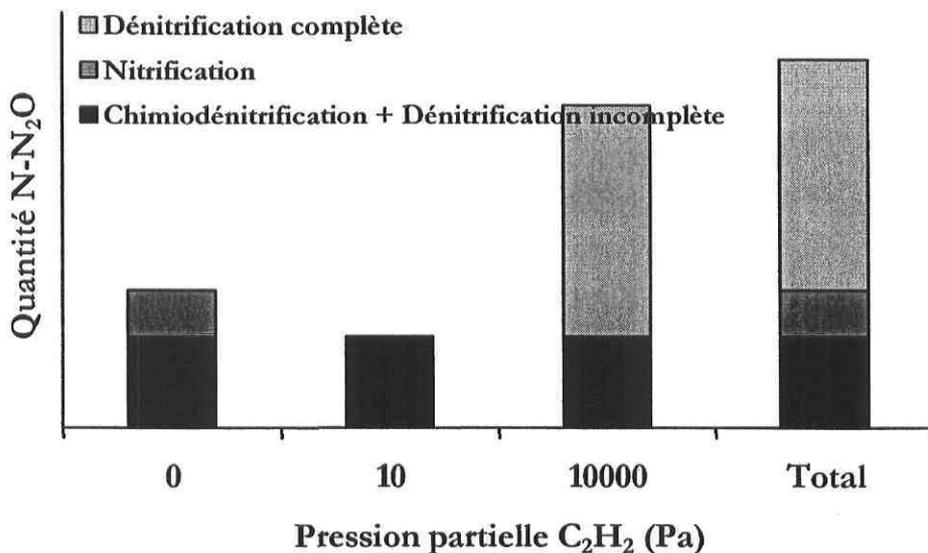


Figure 3.1. Description de la compartimentation de la production de N<sub>2</sub>O lors du blocage au C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>

Des essais ont été réalisés afin de vérifier l'influence de l'acétylène sur la biomasse nitrifiante et dénitrifiante présente dans le milieu filtrant organique, de manière *ex-situ*. Il est en effet important de s'assurer que l'analyseur de gaz utilisé est capable de discerner les variations de production du N<sub>2</sub>O lors de l'ajout d'acétylène, et ce, dans des délais raisonnables permettant d'observer rapidement les changements de la concentration.

Ces essais ont également permis de vérifier la sensibilité de la méthode, c'est-à-dire de déterminer si elle permettait de discerner une biomasse active d'une biomasse moins active. Pour ce faire, des quantités variables de milieu filtrant, donc de biomasse, ont été soumises à l'essai de façon à simuler divers degrés de colonisation. De plus, les tests ont été réalisés en réplicats de manière à vérifier la variabilité des mesures obtenues.

Ce chapitre présente donc l'expérimentation réalisée afin de vérifier la réponse de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante aux deux techniques d'évaluation de l'activité. De plus, différents essais y sont présentés afin d'observer si la compartimentation des différentes activités au sein d'un même essai était possible (Respirométrie azotée: nitritante vs nitratante; Blocage à l'acétylène: production de N<sub>2</sub>O par les nitrifiantes vs les dénitrifiantes).

## 3.2 Matériel et méthodes

### 3.2.1 Vérification de l'applicabilité de la respirométrie pour évaluer l'activité des bactéries nitrifiantes du milieu filtrant

Afin de réaliser les essais, des échantillons de milieu filtrant d'environ 500 g ont été récoltés en haut et bas, de chaque côté d'un biofiltre organique traitant du lisier de porc déjà en opération dans les laboratoires du CRIQ. Ces trois échantillons ont été mélangés dans un sac stérile afin d'homogénéiser la biomasse dans tout le milieu filtrant.

Un lavage du milieu filtrant a été réalisé avant tous les essais selon le protocole décrit dans le paragraphe suivant. Certaines variations de cette méthodologie étaient nécessaires aux essais; celles-ci sont décrites dans chacune des sections spécifiques aux tests en question.

Une portion du mélange de milieu filtrant (300 g) a été mise en suspension dans 3 000 mL d'une solution saline isotonique contenant 0,89 % (p/v) NaCl. La suspension a ensuite été mélangée manuellement et débarrassée des granules de calcite et des copeaux par transvasement dans 3 bouteilles à centrifuger de 1 L. On suppose que le biofilm s'est bien décollé des particules de calcite et des copeaux et, étant donnée que la surface spécifique des copeaux est beaucoup moins élevée que celle de la tourbe, la quantité de microorganismes qui pourrait être perdue est considérée comme négligeable. Une centrifugation de 10 minutes à 7 000 g a été réalisée et le surnageant a ensuite été séparé du culot. Ce dernier a été lavé une seconde fois dans les mêmes conditions et resuspendu une troisième fois dans la solution saline (1 L par bouteille). Ceci avait pour objectif de nettoyer la biomasse du substrat organique ou azoté ayant pu demeurer adsorbé sur le milieu filtrant et de fournir un volume suffisant de liquide pour la réalisation de répliquats.

Avant les tests, le contenu de chaque bouteille a été transféré dans un contenant de 2 L et agité manuellement afin d'aérer la suspension et d'homogénéiser la biomasse. Une portion de la suspension (430 mL) a ensuite été transférée dans le respiromètre de verre (Figure 3.2 et Figure A6.8) et ce dernier a été clos hermétiquement avec un bouchon de caoutchouc. Un pore situé sur le dessus du réacteur permettait d'évacuer la pression causée par l'injection de la solution nutritive ou inhibitrice. Un système d'acquisition de données PCM 800 Orion Sensorlink et une sonde à oxygène dissous Orion 083005D (Thermo Electron Corporation)

ont été utilisés lors des essais. Après chaque injection de substrat dans l'appareil, la concentration en oxygène dissous a été évaluée pendant environ 30 minutes à intervalle de 10 secondes.

Toutes les suspensions de biomasse ont été conservées à 4 °C à la fin des tests afin d'évaluer les matières volatiles en suspension (MVES) et les matières en suspension (MES), permettant d'évaluer indirectement la quantité de biomasse présente dans le réacteur.

Après l'évaluation de l'activité respirométrique, les résultats ont été statistiquement analysés à l'aide d'un test de Fisher (F-Test) afin de s'assurer de l'homogénéité des variances et avec un test de Student (T-test) afin de vérifier si l'ajout des différents réactifs dans la solution respirométrique avait un effet significatif sur les métabolismes spécifiquement visés par l'essai. Lorsque le test de Fisher montrait des variances non homogènes entre les séries de données, le test de Welch a été utilisé pour vérifier s'il existait une différence entre les résultats obtenus. Pour une description détaillée des analyses statistiques utilisées, se référer à l'annexe 3 (A3.4).

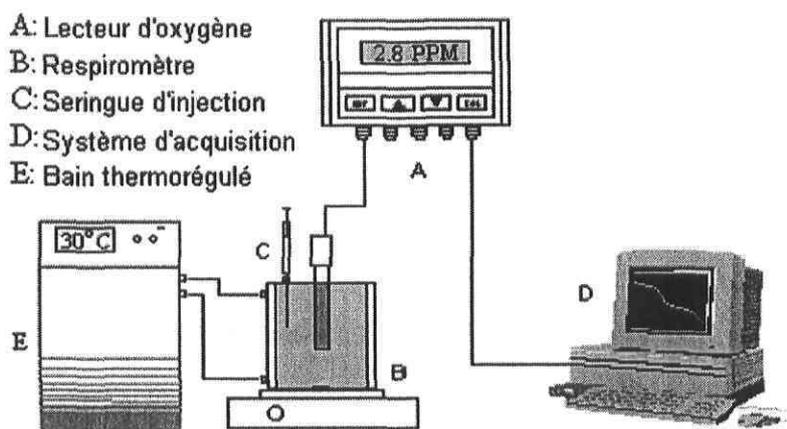


Figure 3.2. Schéma du respiromètre utilisé

### 3.2.1.1 Effet du chlorate et de l'azide sur l'activité hétérotrophe

Des essais ont été réalisés afin de vérifier l'effet des inhibiteurs de nitrates sur l'activité des microorganismes hétérotrophes. Ainsi, lors du lavage de la biomasse, de l'ATU a été ajouté à la solution saline, pour une concentration finale de 21 mg L<sup>-1</sup>, afin d'inhiber

l'activité des organismes nitrifiants. De cette façon, la respiration obtenue n'était reliée qu'à la biomasse hétérotrophe.

Un millilitre d'une solution d'acétate de sodium trihydratée ( $243,7 \text{ g L}^{-1}$ ) a été injecté afin d'obtenir une concentration finale de  $100 \text{ mgC L}^{-1}$  dans le respiromètre. Cet ajout avait pour but d'évaluer l'activité hétérotrophe optimale de la biomasse présente sur le milieu filtrant. Cependant, l'ajout de 1 mL d'une solution carbonée synthétique (16 % peptone (p/v), 3 % extrait de bœuf (p/v), 10 % acétate de sodium (p/v),  $123,3 \text{ mL L}^{-1}$  d'éthanol 99 %, 16 % extrait de levure (p/v)) à la fin du premier réplicat a permis de constater que l'acétate, à cette concentration, ne permettait pas d'atteindre l'activité hétérotrophe maximale des échantillons. Pour cette raison, le reste des essais a par la suite été effectué avec la solution de carbone synthétique ( $\sim 300\,000 \text{ mgDCO L}^{-1}$ ), pour une concentration finale dans le respiromètre avoisinant  $700 \text{ mgDCO L}^{-1}$ . Une injection de 4 mL d'une solution de chlorate de sodium ( $228 \text{ g L}^{-1}$ ) a ensuite été effectuée afin d'obtenir une concentration finale de 20 mM dans le respiromètre (Hynes et Knowles 1983; Surmacz-Gorska 1996). Le même essai a ensuite été effectué deux autres fois sur des suspensions bactériennes distinctes afin d'obtenir trois réplicats. Trois autres essais ont subséquemment été réalisés sur des suspensions distinctes en injectant 1 mL d'une solution d'azide de sodium ( $0,670 \text{ g L}^{-1}$ ), au lieu du chlorate de sodium, pour une concentration finale de  $24 \text{ }\mu\text{M}$  (Ginestet *et al.* 1998).

### 3.2.1.2 Effet du chlorate et de l'azide sur la respiration endogène

Des essais ont également été effectués afin d'observer l'effet des inhibiteurs de nitratantes sur la respiration endogène de la biomasse. Ainsi, afin d'éviter que l'activité nitrifiante ne vienne compliquer l'analyse des résultats, de l'ATU a été ajouté à la solution saline lors du lavage de la biomasse. Un millilitre d'eau distillée a été injecté au début du test afin d'évaluer la variation d'activité lors de l'ajout d'un volume supplémentaire d'une substance « inerte » dans le respiromètre. Les résultats obtenus ont permis de s'assurer qu'une variation de l'activité est réellement due à la substance ajoutée et non à l'ajout d'un volume de liquide dans le réacteur par effet de dilution, d'un changement de pression ou d'une variation de la température. Du chlorate ou de l'azide ont ensuite été injectés dans le respiromètre, tel que décrit à la section 3.2.1.1, afin d'observer leur effet sur la respiration endogène de la biomasse présente dans le réacteur.

### **3.2.1.3 Compartimentation des activités hétérotrophes, nitritantes et nitratantes**

Les derniers essais consistaient à vérifier s'il était possible de compartimenter au sein d'un même essai, les activités nitritantes, nitratantes et hétérotrophes. Pour y parvenir, 1 mL d'une solution de  $\text{NaNO}_2$  ( $120 \text{ g L}^{-1}$ ), 1 mL d'une solution de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ( $140 \text{ g L}^{-1}$ ) et 1 mL d'une solution carbonée synthétique (section 3.2.1.1) ont été injectés au début de l'essai. Après avoir observé la respiration globale de la biomasse, un volume de 1,5 mL d'une solution d'ATU  $6 \text{ g L}^{-1}$  a été ajouté au respiromètre afin d'inhiber l'activité des bactéries nitritantes. Du chlorate ou de l'azide ont ensuite été injectés dans le respiromètre, tel que décrit à la section 3.2.1.1. Ces essais avaient pour but de vérifier le comportement de la biomasse lors d'ajouts successifs de substrat et d'inhibiteurs, spécifiques à l'un ou l'autre des microorganismes.

### **3.2.1.4 Vérification de la sensibilité du test**

Des essais respirométriques ont été réalisés sur différentes dilutions de la suspension de milieu filtrant de manière à simuler diverses activités nitrifiantes. La solution bactérienne a été diluée en série afin d'obtenir des facteurs de dilution variant de 1:1 à 1:8. Pour y parvenir, 750 mL de la solution saline ont été ajoutés à 750 mL de la suspension brute (1:1) afin d'obtenir une dilution 1:2. À 750 mL de cette nouvelle solution, 750 mL de solution saline ont été ajoutés pour créer la dilution 1:4 et ainsi de suite pour 1:8. Trois essais ont été réalisés sur chacune de ces concentrations en injectant 1 mL de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ( $140 \text{ g L}^{-1}$ ) puis en ajoutant 1,5 mL d'ATU ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ), tout en mesurant l'évolution de l'oxygène dissous après chacune des injections.

## **3.2.2 Vérification de l'applicabilité du blocage à l'acétylène adapté pour évaluer l'activité des bactéries dénitrifiantes du milieu filtrant**

### **3.2.2.1 Montage de colonnes de biofiltration enrichies de dénitrifiantes**

Deux colonnes de biofiltration ont été montées afin d'obtenir un milieu filtrant enrichi de bactéries dénitrifiantes (Figure 3.3). Celles-ci étaient constituées d'un tuyau de PVC clair de 100 mm de diamètre et de 500 mm de hauteur. Un bouchon de PVC de 100 mm a été collé au bas des biofiltres et rendu hermétique avec un joint de silicone. Au centre de ce bouchon, une fêrule de laiton d'environ 12 mm de diamètre a été vissée afin de servir de

sortie pour l'effluent traité. À l'intérieur des biofiltres, une grille de plastique avec un maillage de 2 mm a été placée sur le fond afin de retenir le milieu filtrant à l'intérieur de la colonne. Une couche de gravier, d'un diamètre équivalent de 12,5 mm, a été disposée sur une hauteur de 50 mm à la surface de ce grillage de manière à bien drainer le liquide ayant percolé dans le biofiltre. Un mélange de matériel organique (30 % tourbe, 70 % copeaux (v/v)), a été placé sur une hauteur de 300 mm en prenant soin de ne pas trop compacter le milieu. Des copeaux situés à la surface ont permis une distribution uniforme du débit sur le biofiltre.

Ces colonnes ont été alimentées pendant près d'un an avec une solution synthétique ( $1,7 \text{ g L}^{-1}$  acétate de sodium trihydraté,  $1,44 \text{ g L}^{-1}$  nitrate de potassium et  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ FeCl}_3$ ,  $0,1 \text{ mg L}^{-1} (\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ CdSO}_4$ ,  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuSO}_4$ ,  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $16,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$ ) (Ouellette 1994). Cette solution contenait une concentration finale de  $300 \text{ mgC L}^{-1}$  et  $200 \text{ mgN-NO}_3 \text{ L}^{-1}$  et était alimentée à une charge hydraulique de  $0,050 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $400 \text{ mL d}^{-1}$ ). Le débit a été vérifié de façon hebdomadaire. Afin de s'assurer de la présence de dénitrification dans les biofiltres, la concentration en nitrate a été évaluée à l'entrée et à la sortie des biofiltres avant la récolte des échantillons, à l'aide de la méthode Hach 8039 (Cadmium Reduction method) et avec un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda EZ210 (Wellesley, MA, USA). Le principe de cette technique repose sur la réduction du nitrate par le cadmium métallique en nitrite. Ce dernier réagit, en conditions acides, avec l'acide sulfanilique pour former un sel de diazonium intermédiaire. Ce sel se lie avec l'acide gentisique pour former une solution ambrée, dont l'intensité est évaluée à 500 nm.

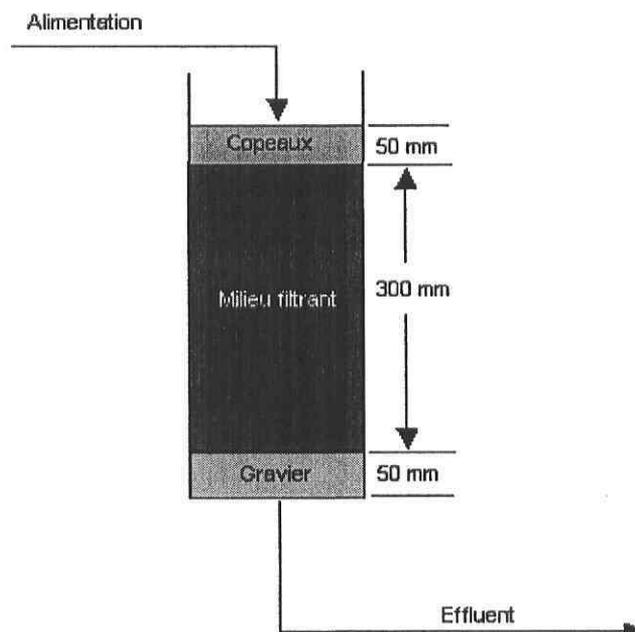


Figure 3.3. Schéma des colonnes de biofiltration pour l'enrichissement de bactéries dénitrifiantes

### 3.2.2.2 Montage et opération d'une cellule permettant d'évaluer l'activité des organismes dénitrifiants

Une cellule permettant d'évaluer l'activité des organismes dénitrifiants a été conçue et montée selon les Figures 3.4 et 3.5. Celle-ci était constituée de PVC clair de 50 mm de diamètre intérieur et de 280 mm de longueur. Un adaptateur a été collé sur chacun des bouts afin de pouvoir y visser un bouchon de façon hermétique. Une grille d'acier inoxydable maillée à 2 mm a été installée à 75 mm du fond de la cellule pour retenir le milieu filtrant testé, tout en laissant passer le flux gazeux appliqué sur ce dernier.

Un réseau a ensuite été installé tel qu'illustré à la Figure 3.5, de manière à appliquer de l'azote gazeux et de l'acétylène à la cellule dénitrifiante. Un débitmètre gazeux (0,04-0,5 litre par minute (LPM)) (Cole-Palmer) a également été placé à l'entrée de la cellule. Tous les joints ont été renforcés avec des collets d'acier inoxydable et la présence de fuites a ensuite été évaluée en immergeant les zones à risque avec une solution de détection « Snoop ».

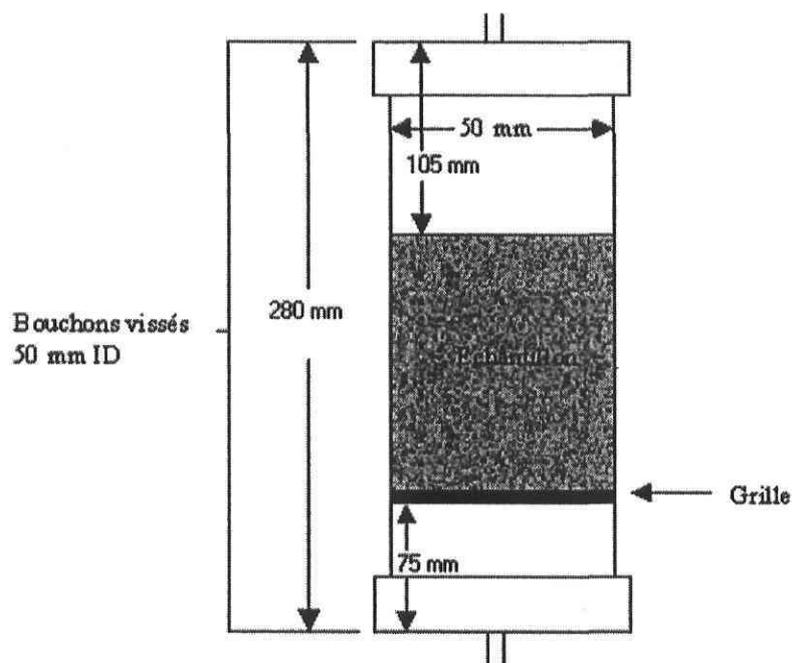


Figure 3.4. Dimensions de la cellule pour l'activité dénitrifiante

Lors des essais, l'échantillon de milieu filtrant était placé sur la grille perforée et légèrement compacté. Une solution nutritive, identique à celle utilisée pour l'alimentation des mini-colonnes de biofiltration, était ensuite appliquée au milieu filtrant avec un flacon laveur jusqu'à saturation, c'est-à-dire jusqu'au dégouttement de celle-ci sous la cellule. Cette étape avait pour objectif de mettre en contact la biomasse avec un maximum de substrat, de manière à mesurer l'activité optimale des organismes dénitrifiants.

La cellule était ensuite fermée hermétiquement avec des bouchons vissant, consolidés avec une couche de Teflon<sup>®</sup>. Un flux du gaz approprié était appliqué à la biomasse, par le bas de la cellule, à un débit de 0,2 LPM, correspondant au taux d'aération usuel appliqué sur des biofiltres aérés. Le N<sub>2</sub>O produit a ensuite été mesuré à la sortie de la cellule, à l'aide d'un analyseur de gaz utilisant la spectroscopie photoacoustique (Brüel & Kjøer modèle 1301).

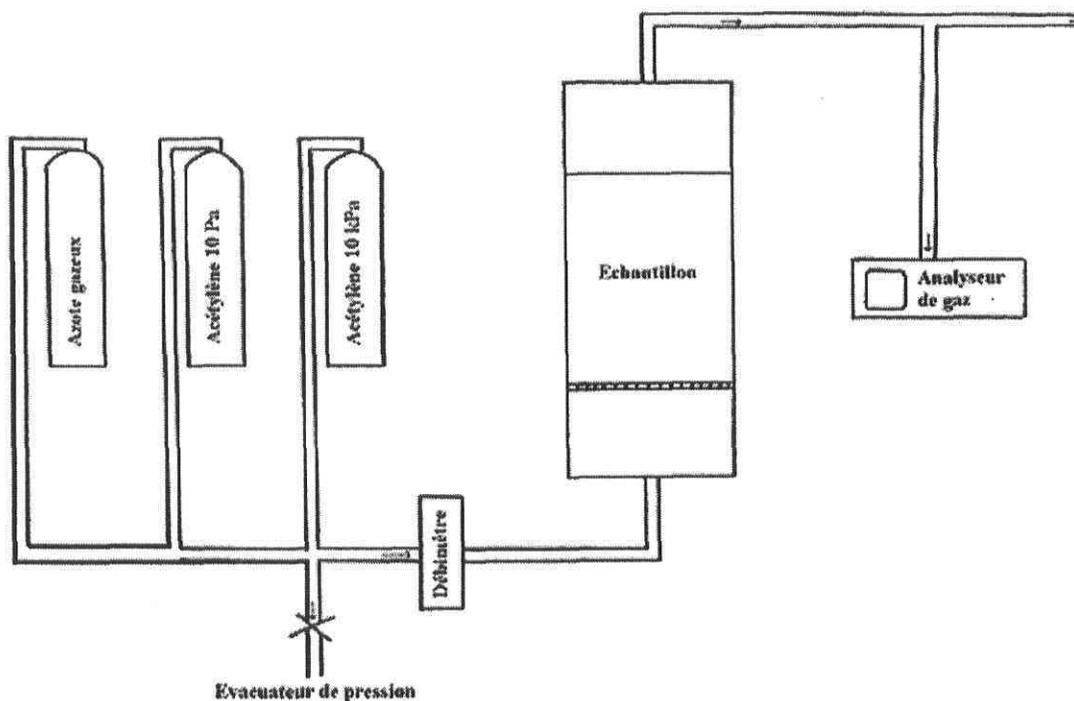


Figure 3.5. Schéma du montage pour évaluer l'activité dénitrifiante potentielle

Afin de connaître la production réelle d'un gaz par la biomasse, il était nécessaire de déterminer la concentration de celui-ci à l'entrée de la cellule. Le  $N_2O$  présent dans les bouteilles de gaz a donc été mesuré. Pour l'obtention d'une concentration représentative de l'essai, les mesures ont été faites sur une cellule vide sur laquelle ont été appliqués successivement des flux de 0,2 LPM de chacun des gaz. Cette analyse a été réalisée plusieurs fois afin de s'assurer de la stabilité de cette mesure.

### 3.2.2.3 Vérification de la sensibilité de la méthode

Une méthode est considérée sensible dans l'intervalle d'opération testée lorsque la relation entre l'activité mesurée et la quantité de biomasse est linéaire. Ainsi, dans l'optique de vérifier la sensibilité du blocage à l'acétylène, tel qu'adapté dans ce projet, différentes quantités de milieu filtrant ont été soumises à l'essai.

Pour ce faire, une des colonnes d'enrichissement a été démantelée après s'être assuré de la présence d'une biomasse dénitrifiante, en évaluant l'enlèvement du nitrate. Des performances de 86% d'enlèvement du  $NO_3^-$  ont été obtenues, démontrant la présence

importante d'une biomasse dénitrifiante. Le milieu filtrant a ensuite été homogénéisé manuellement dans une chaudière de 10 litres, de façon à obtenir des échantillons uniformes d'un essai à l'autre.

Des masses de 50, 100 et 150 grammes humides de milieu filtrant ont été soumis à un test de blocage à l'acétylène; en triplicata pour 50 et 150 g et en 4 réplicats pour 100 g. Des flux de  $N_2$  et de  $C_2H_2$  à une pression partielle de 10 kPa ont été appliqués successivement à la biomasse, durant une période variant entre 1 et 3 heures. La production de  $N_2O$  a été évaluée pour chacune des conditions de l'essai. La concentration de  $N_2O$  produite en présence de  $N_2$ , en créant des conditions optimales pour les microorganismes dénitrifiants, représente la quantité maximale de ce gaz pouvant être produite par le procédé. Celle produite en présence d'acétylène représente plutôt la production nette due tant à l'arrêt de la dénitrification complète, la dénitrification incomplète, qu'à la chimiodénitrification.

En soustrayant à la quantité de  $N_2O$  obtenue en présence d'acétylène, celle mesurée en présence de  $N_2$ , on obtient la production due aux microorganismes réalisant une dénitrification complète. Il est toutefois important de noter que la quantité de  $N_2O$  présente à l'entrée de la cellule est préalablement déduite des valeurs obtenues avant de les comparer entre elles et ce, pour chacun des gaz appliqués, car sa concentration est différente d'un mélange gazeux à l'autre.

Parce qu'un flux continu est appliqué à l'échantillon, l'activité maximale est atteinte lorsqu'une production stable de  $N_2O$  peut être mesurée. Une autre façon d'évaluer le taux de dénitrification est de calculer le  $N-N_2O$  cumulatif et de tracer la relation entre ce dernier et le temps. Le  $N-N_2O$  cumulatif peut être calculé en sommant la masse d'azote gazeux produite à chaque incrément de la période de mesure (Eq. 18).

$$N - N_2O_{cumul} = \frac{28}{44} Q \sum_{i=1}^n T_i (N_2O_i - N_2O_{inlet}) \quad (18)$$

où  $N-N_2O_{cumul}$  correspond à la masse cumulative d'azote produite entre les temps  $t = 0$  à  $t = t_n$  ( $\mu g$ ),  $N_2O_i$  à la concentration de  $N_2O$  au temps  $t = t_i$  ( $\mu g m^{-3}$ ),  $N_2O_{inlet}$  à la concentration en  $N_2O$  à l'entrée de la cellule ( $\mu g m^{-3}$ ),  $Q$  au débit gazeux appliqué ( $m^3 min^{-1}$ ),  $28/44$  au

facteur permettant d'obtenir la masse de N au lieu de celle de  $N_2O$  et  $T_i$  (min) à l'incrément de temps entre les mesures  $N_2O_i$  et  $N_2O_{i+1}$ .

L'activité maximale d'une condition donnée est atteinte lorsqu'une accumulation constante peut être observée. Les pentes obtenues donnent le taux de production de  $N_2O$  potentiel pour chacune des conditions appliquées durant l'essai. La concentration en  $N_2O$  à la sortie de la cellule a été évaluée en ppm durant ce projet et a dû être transformée pour obtenir des  $\mu g m^{-3}$  (voir calculs, annexe 4, A4.1).

À la fin de chacun des tests, le milieu filtrant a été conservé à  $4^\circ C$  pour une durée maximale ne dépassant pas sept jours, afin d'évaluer la matière sèche (MS), selon la méthode MA-4059 (CRIQ 1997). La MS est évaluée en faisant sécher pendant 24 heures à  $105^\circ C$  l'échantillon à tester, puis à le peser. La valeur obtenue correspond à la masse sèche de cet échantillon. Cette valeur a ensuite été utilisée comme référence de la quantité de biomasse mise à l'essai. L'activité potentielle obtenue, c'est-à-dire le taux de production de N- $N_2O$  en présence d'acétylène à une pression partielle de 10 kPa, a ensuite été mise en relation avec la quantité de biomasse afin d'observer la linéarité de la droite de régression.

#### 3.2.2.4 Évaluation de la production de $N_2O$ par les organismes nitrifiants

Afin de vérifier si la technique du blocage à l'acétylène, telle que mise au point lors de ce projet, permettait d'évaluer la production de  $N_2O$  par les bactéries nitrifiantes, tel que mentionné par Klemetsson *et al.* (1990), la biomasse a été placée dans des conditions inhibitrices en présence d'une pression partielle de 10 Pa de  $C_2H_2$ . Ces essais ont été réalisés sur trois échantillons testés à la section 3.2.2.3 (un échantillon par masse testée), l'acétylène 10 Pa étant appliqué préalablement à celle de 10 kPa.

La diminution de la concentration en  $N_2O$  obtenue à la sortie de la cellule, comparativement à celle obtenue en présence de  $N_2$ , devrait ainsi correspondre à la portion du  $N_2O$  produite par les organismes nitrifiants (Figure 3.1). L'augmentation de la concentration en acétylène jusqu'à 10 kPa permet ensuite d'évaluer le taux de dénitrification réalisé par la dénitrification complète (Klemetsson *et al.* 1990).

### 3.2.2.5 Vérification de la variabilité de l'essai

Afin de vérifier la variabilité du blocage à l'acétylène, la seconde colonne d'enrichissement a été démontée et la biomasse a été homogénéisée. L'analyse de la performance concernant la dénitrification, préalablement réalisée avant le démantèlement, a permis de constater un enlèvement de plus de 97% du nitrate. Quatre échantillons de 100g humide de milieu filtrant ont ensuite été soumis à un essai en plaçant la biomasse dans des conditions anoxies ( $N_2$ ) puis en appliquant un flux de  $C_2H_2$  à 10 kPa. Les valeurs d'activités potentielles obtenues ont ensuite été analysées statistiquement, en évaluant le coefficient de variation (CV) (annexe 3, A3.3) et en vérifiant la présence de données aberrantes avec la méthode de Huber (annexe 3, A3.2), pour chacune des séries de réplicats, afin d'évaluer la similitude entre les résultats. Les données recueillies lors des essais décrits à la section 3.2.2.3 ont également été soumises à cette analyse statistique.

### 3.3 Résultats et discussion

#### 3.3.1 Applicabilité de la respirométrie azotée pour évaluer l'activité des bactéries nitrifiantes du milieu filtrant

L'utilisation de la respirométrie pour évaluer l'activité de la biomasse d'un échantillon environnemental nécessite généralement que la différence d'activité avant et après l'ajout d'un substrat ou d'un inhibiteur soit significative. De plus, il est essentiel que les inhibiteurs utilisés agissent exclusivement sur la biomasse visée. Les essais réalisés et décrits dans ce chapitre avaient pour objectif de vérifier la réaction de la biomasse face à l'ajout des substrats et des inhibiteurs. Un exemple d'essai respirométrique obtenu lors des tests décrits dans les sections subséquentes est présenté à la Figure 3.6.

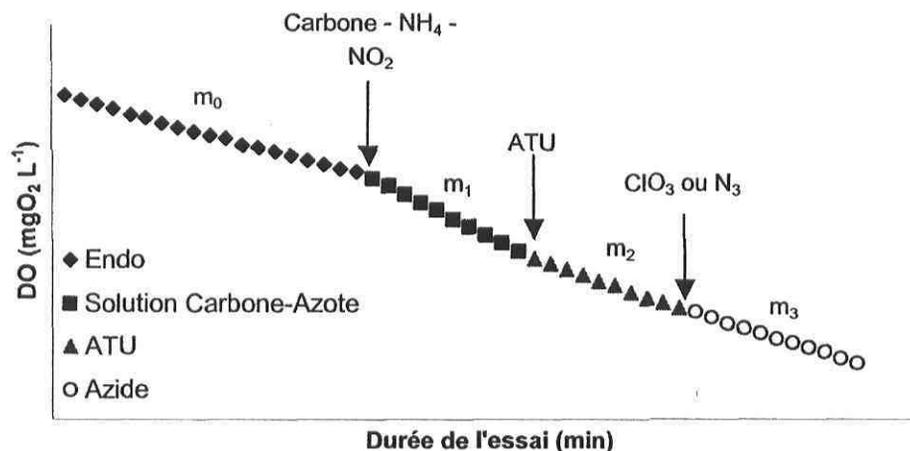


Figure 3.6. Exemple d'essais respirométriques réalisés sur un échantillon de milieu filtrant organique provenant d'un biofiltre traitant du lisier de porc

##### 3.3.1.1 Effet du chlorate et de l'azide sur la biomasse

Des essais ont été effectués afin de vérifier l'effet du chlorate et de l'azide sur la biomasse hétérotrophe. Un test de Fisher (F-Test) a été réalisé sur les résultats, afin de vérifier l'homogénéité des variances, suivi d'un test de Student (T-Test) ou d'un test de Welch, pour observer la similarité ou la disparité des données recueillies. Les résultats obtenus à la suite de l'analyse statistique (annexe 3, A3.5) sont présentés au Tableau 3.1. Les résultats indiquent, à un seuil de signification  $\alpha$  de 5 %, que l'azide (N<sub>3</sub>) à 24  $\mu$ M et le chlorate (ClO<sub>3</sub>) à 20 mM n'ont pas d'effet significatif sur l'activité des organismes hétérotrophes. L'activité d'un des échantillons, utilisé lors de la vérification de l'effet du chlorate sur

l'activité hétérotrophe, n'a pas été incluse dans l'analyse statistique, car celle-ci n'était pas maximale, tel que décrit dans la section 3.2.1.1.

Tableau 3-1. Effet des inhibiteurs de nitrates sur la biomasse

Effet testé	Activité	n	Moyenne	Écart-type	Différence ( $\alpha = 5\%$ )
			mgO <sub>2</sub> gMVES <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		
ClO <sub>3</sub> sur activité endogène	rO <sub>2</sub> endogène	6	0,60	0,05	Non
	rO <sub>2</sub> ClO <sub>3</sub>	3	0,59	0,00	
N <sub>3</sub> sur activité endogène	rO <sub>2</sub> endogène	6	0,60	0,05	Oui
	rO <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	3	0,51	0,03	
ClO <sub>3</sub> sur activité hétérotrophe	rO <sub>2</sub> Carbone	5	1,78	0,30	Non
	rO <sub>2</sub> ClO <sub>3</sub>	2	1,34	0,18	
N <sub>3</sub> sur activité hétérotrophe	rO <sub>2</sub> Carbone	5	1,78	0,30	Non
	rO <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	3	1,79	0,06	
Volume H <sub>2</sub> O sur activité endogène	rO <sub>2</sub> endogène	6	0,60	0,05	Non
	rO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	6	0,64	0,04	

Des essais ont également été réalisés afin de vérifier l'effet du chlorate et de l'azide sur la respiration endogène de la biomasse. Ceux-ci ont de plus permis de comparer l'activité endogène avant et après l'ajout d'un volume liquide afin de s'assurer que ce dernier n'avait pas d'influence sur les changements de respiration observés.

Les résultats indiquent, à un seuil de signification  $\alpha$  de 5 %, que l'ajout d'un volume "inerte" durant les essais respirométriques n'influence pas l'activité spécifique des microorganismes (Tableau 3.1). Ces essais démontrent donc que les volumes injectés dans le respiromètre, quelle que soit la substance, ne sont pas des facteurs faisant varier l'activité; la nature du produit étant la principale cause de variation observée. Les résultats montrent également, à un seuil de signification  $\alpha$  de 5 %, que le chlorate de sodium à 20 mM n'a pas d'effet significatif sur l'activité spécifique endogène des microorganismes, mais que l'azide en a un. Le fait que l'azide influence l'activité endogène spécifique des microorganismes pourrait rendre l'analyse des résultats difficile si son utilisation était envisagée lors d'essais

de compartimentation des activités; le chlorate demeure un candidat intéressant pour le reste des essais.

### 3.3.1.2 Compartimentation de l'essai respirométrique

Des essais ont été réalisés afin de vérifier la possibilité de compartimer les essais respirométriques afin d'évaluer l'activité des organismes hétérotrophes et celles des bactéries nitrifiantes (nitritantes et nitratantes) au sein d'un même test. Ceux-ci ont permis de déterminer, à chacune des injections de substrat ou d'inhibiteur, si l'activité demeurait statistiquement similaire ou si l'ajout causait une variation de l'activité.

Les résultats sont présentés au Tableau 3-2. La différence représente une comparaison statistique (F-test et T-test) entre l'activité évaluée et celle qui la précède dans le tableau, sauf pour  $rO_2 N_3$  où la comparaison est réalisée avec  $rO_2$  ATU. Les données indiquent, à un seuil de signification  $\alpha$  de 5 %, que l'ajout de  $NO_2^-$  durant les essais respirométriques n'influence pas l'activité spécifique des microorganismes, ce qui signifie probablement que l'activité de ces bactéries était insuffisante dans les échantillons étudiés, due à une faible quantité de biomasse nitratante, et que le test n'était pas en mesure de la distinguer. Il est également possible d'observer que l'ajout de  $NH_4^+$  et de carbone permet une augmentation significative de l'activité tandis que seul l'ATU permet une inhibition de la biomasse, contrairement à l'azide et au chlorate. Les analyses statistiques de ces résultats sont présentées à l'annexe 3 (A3.5).

Malgré les résultats décevants concernant les inhibiteurs de nitratantes, les essais réalisés démontrent toutefois qu'il est possible de connaître, dans un même essai respirométrique, l'activité de la biomasse hétérotrophe et celle des organismes nitrifiants, toutes espèces confondues et ce, même à un niveau d'activité relativement faible.

Tableau 3-2. Activité spécifique de la biomasse lors d'essais respirométriques visant la compartimentation du test

Effet testé	Activité	n	Moyenne	Écart-type	Différence ( $\alpha = 5\%$ )
			$\text{mgO}_2 \text{ gMVES}^{-1} \text{ h}^{-1}$		
Compartimentation avec $\text{ClO}_3$	$\text{rO}_2$ endogène	6	1,18	0,68	-
	$\text{rO}_2$ $\text{NO}_2$	6	1,05	0,39	Non
	$\text{rO}_2$ $\text{NH}_4$	6	1,53	0,33	Oui
	$\text{rO}_2$ Carbone	6	2,63	0,44	Oui
	$\text{rO}_2$ ATU	6	1,68	0,22	Oui
	$\text{rO}_2$ $\text{ClO}_3$	3	1,41	0,20	Non
Compartimentation avec $\text{N}_3$	$\text{rO}_2$ $\text{N}_3$	3	1,45	0,18	Non

### 3.3.1.3 Vérification de la sensibilité du test

Des essais respirométriques ont été réalisés sur différentes dilutions de la suspension bactérienne afin de vérifier la sensibilité du test entre 50 g et 150 g humides de milieu filtrant testés. Les résultats présentés à la Figure 3.7 indiquent que la relation existant entre la respirométrie azotée et la quantité de biomasse, évaluée sous forme de MVES, est linéaire. L'analyse statistique du coefficient de détermination ( $R^2$ ) de cette figure démontre que, pour  $n = 12$  et à un seuil de signification  $\alpha$  de 0,1%, il existe réellement un lien entre ces deux paramètres.

Il est également possible de voir que l'extrapolation de la droite ne passe pas par l'ordonnée à l'origine lorsqu'il n'y a pas de MVES dans le respiromètre, donc pas de biomasse. Cette observation peut être due à de multiples facteurs comme l'erreur expérimentale, une mauvaise extrapolation des résultats sous la valeur minimale testée, ou une dérive de la sonde à oxygène dissous lors des essais. Cette dernière hypothèse a été vérifiée en laissant la sonde dans de l'eau déminéralisée durant 24 heures. Le taux de diminution de l'oxygène mesuré était d'environ  $0,14 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  et correspondait approximativement à la valeur obtenue pour une absence de MVES ( $0,17 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

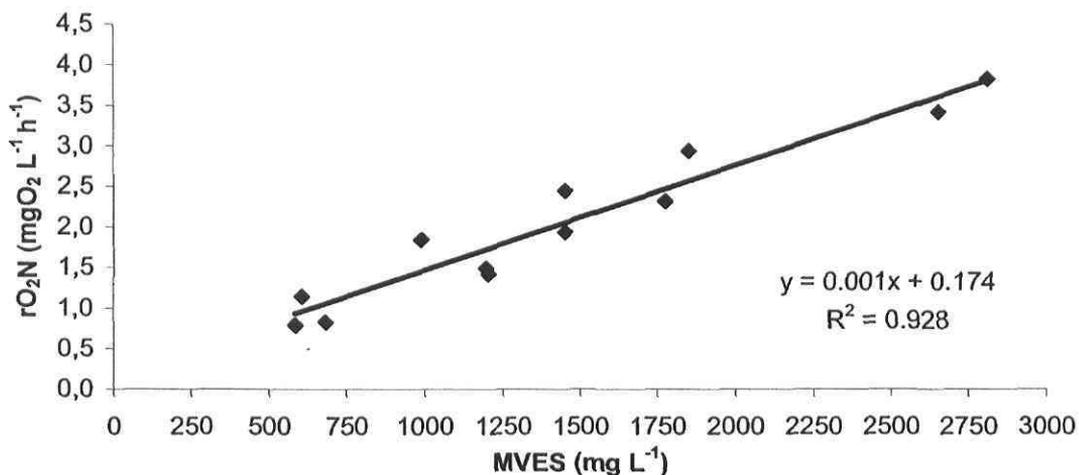


Figure 3.7. Variation de la respiration azotée en fonction de la quantité de biomasse

### 3.3.2 Vérification de l'applicabilité du blocage à l'acétylène pour évaluer l'activité des bactéries dénitrifiantes

Avant d'utiliser la technique du blocage à l'acétylène pour réaliser le suivi de la biomasse dénitrifiante dans un biofiltre à support organique, il était nécessaire d'effectuer des essais préliminaires permettant de vérifier l'applicabilité de celle-ci sur ce type de media filtrant. Ces tests consistaient à observer la réaction de la biomasse sous différentes pressions partielles d'acétylène afin de déterminer l'activité dénitrifiante des échantillons environnementaux. Cette section du rapport décrit en détails les résultats obtenus.

#### 3.3.2.1 Concentration des gaz à l'entrée de la cellule

La concentration des gaz à l'entrée de la cellule dénitrifiante a été évaluée. On retrouve une concentration de gaz contaminants importante dans le mélange d'acétylène à 10 kPa. En effet, la concentration de N<sub>2</sub>O atteint approximativement 2,5 ppm et on observe environ 200 ppm de CO<sub>2</sub> et de monoxyde de carbone (CO). Dans la bouteille de N<sub>2</sub>, la concentration de N<sub>2</sub>O n'est que de 0,6 ppm et la présence des autres gaz est négligeable. Selon le guide d'utilisation de l'analyseur de gaz, le seuil minimal de détection du N<sub>2</sub>O se situe à 0,2 ppm (0,36 mg m<sup>-3</sup>). Les valeurs obtenues sous ce seuil ont donc été considérées comme étant imprécises et ont été négligées lors de l'analyse des résultats.

### 3.3.2.2 Vérification de la sensibilité de la méthode

Afin de déterminer si la technique du blocage à l'acétylène permettait de distinguer l'activité d'une biomasse active de celle d'une biomasse moins active, différentes quantités de milieu filtrant (50 g, 100 g et 150 g (base humide)) ont été soumises à l'essai. La Figure 3.8 montre un exemple de courbes types obtenues lors de ces essais. On peut voir que la biomasse dénitrifiante réagit rapidement à l'application de conditions inhibitrices avec 10 kPa d'acétylène ( $C_2H_2$ ) en accroissant immédiatement la quantité de  $N_2O$  produite. L'atteinte de l'activité maximale (plateau) est d'autant plus rapide qu'il y a de milieu filtrant mis à l'essai. Celle-ci survient entre 1h30 et 3h00 après la mise en contact avec le  $C_2H_2$ , ce qui correspond aux durées retrouvées dans la littérature (Hallin et Pell 1994).

Les valeurs obtenues lors de ces essais ont été utilisées pour calculer la quantité cumulative de  $N-N_2O$  produite par la biomasse dénitrifiante, tel que décrit à l'équation 18 de la section 3.2.2.3. La Figure 3.9 montre un exemple de résultats obtenus à la suite de ces calculs sur un échantillon de 150 g humide de milieu filtrant mis à l'essai. La première pente représente l'activité dénitrifiante incomplète potentielle de l'échantillon, c'est-à-dire le taux de production de  $N-N_2O$  maximal pouvant être atteint dans les conditions optimales de dénitrification. La pente la plus forte montre l'activité dénitrifiante potentielle, c'est-à-dire la capacité qu'a l'échantillon à transformer le nitrate sous une forme gazeuse ( $N_2 + N_2O$ ). Afin de connaître le potentiel d'un échantillon à réaliser une dénitrification complète, l'activité dénitrifiante incomplète potentielle doit être soustraite de l'activité dénitrifiante potentielle. Dans l'exemple de la Figure 3.9, cette dernière activité serait de  $525 \mu\text{g } N-N_2O \text{ h}^{-1}$  ou de façon plus spécifique,  $3,5 \mu\text{g } N-N_2O \text{ (g humide)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

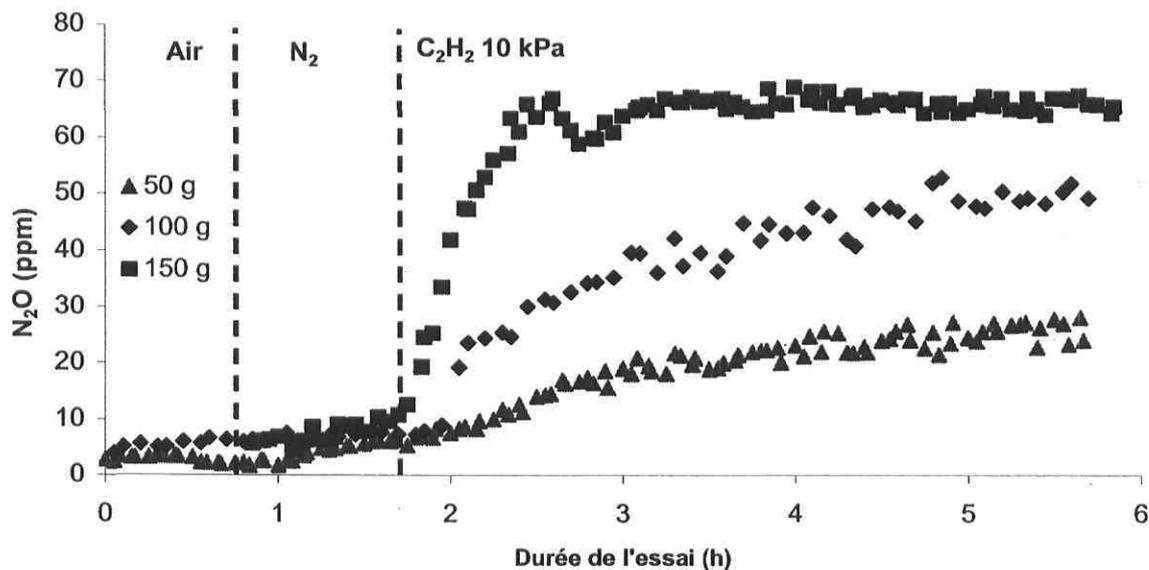


Figure 3.8. Courbes types obtenues lors de la vérification de la sensibilité du blocage à l'acétylène

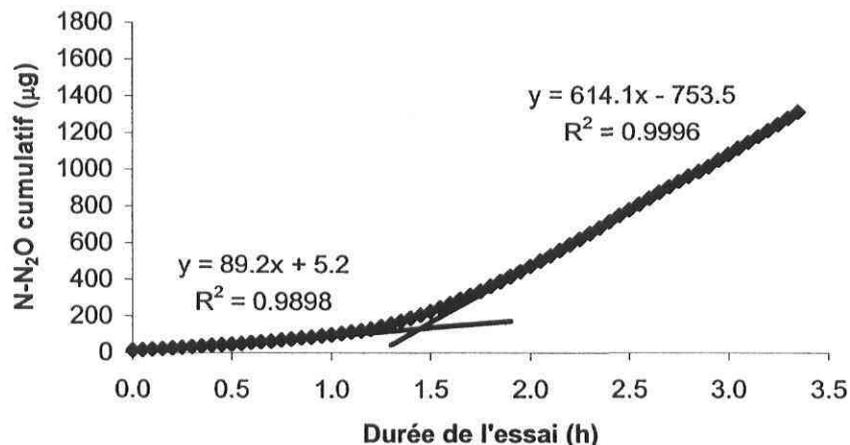


Figure 3.9. Exemple de production cumulative de N-N<sub>2</sub>O d'un réplikat de 150 g humide soumis à 10 kPa d'acétylène

L'activité dénitrifiante potentielle obtenue a ensuite été mise en relation avec la quantité de biomasse présente dans la cellule, évaluée sous forme de matière sèche (Figure 3.10). Il est possible de noter la linéarité de la droite de régression et l'importante valeur du  $R^2$ , indices démontrant la sensibilité du blocage à l'acétylène dans cet intervalle de mesure. L'analyse statistique de la corrélation de ces données indique, à un seuil de signification  $\alpha$  de 5 %,

qu'il existe réellement un lien entre elles. Une explication de la statistique utilisée est présentée à l'annexe 3, section A3.4.

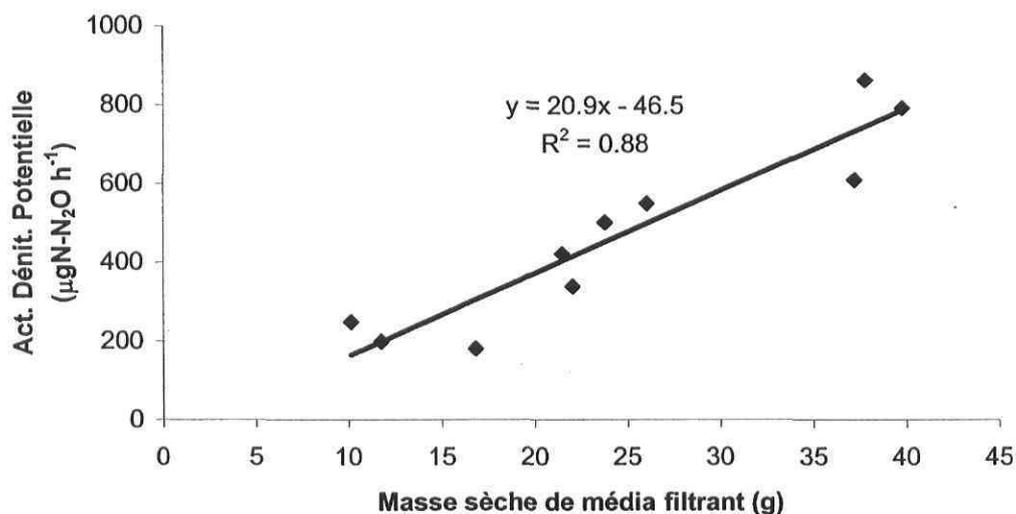


Figure 3.10. Relation entre la quantité de N<sub>2</sub>O produite en présence de 10 kPa d'acétylène et la quantité de biomasse

L'extrapolation de cette droite indique également qu'il ne serait théoriquement pas possible de mesurer, à l'aide de cette méthode de détection, une production nette de N<sub>2</sub>O lors de l'utilisation de moins de 2,2 grammes de matière sèche pour réaliser l'essai. La masse de matière sèche obtenue a été mise en relation avec la masse de milieu filtrant humide, initialement pesée avant saturation de solution nutritive (Figure 3.11). À partir d'une extrapolation de la droite de régression de la Figure 3.11, il est possible de déterminer que 2,2 grammes de milieu filtrant sec correspondent environ à 11,4 grammes de milieu filtrant humide, toujours en supposant que la linéarité de la droite se poursuit dans l'intervalle extrapolé.

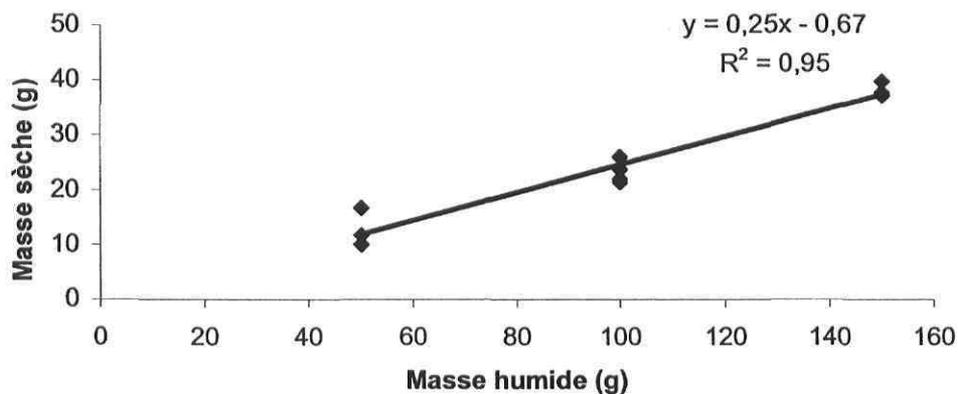


Figure 3.11. Relation entre la masse sèche et la masse humide de milieu filtrant

Ces résultats indiquent donc que la méthode est sensible lorsque 50 à 150 grammes humides de milieu filtrant sont mis à l'essai et que celle-ci ne permet théoriquement pas de discerner d'activité de la biomasse dénitrifiante lorsque moins de 11,4 grammes humides de milieu filtrant sont utilisés. Ce seuil n'étant applicable que pour un milieu filtrant dont l'activité dénitrifiante et la teneur en eau sont semblables à celles des échantillons utilisés au cours de ces essais, une quantité plus importante sera utilisée dans les tests à venir, de façon à toujours être en mesure d'évaluer une production significative de  $N_2O$ . Une valeur supérieure à 100 g humides constitue une masse raisonnable, dans la mesure où cette quantité permet de remplir une bonne proportion de l'espace disponible dans la cellule, donc d'éviter la création de chemins préférentiels, d'obtenir une activité maximale relativement rapidement (Figure 3.8) et où celle-ci correspond à l'intervalle de sensibilité de la méthode.

### 3.3.2.3 Production de $N_2O$ par les organismes nitrifiants

Lors des premiers essais de vérification de la sensibilité avec 50 g et 150 g humides de milieu filtrant, une pression partielle de 10 Pa de  $C_2H_2$  a été appliquée à la biomasse avant l'acétylène à 10 kPa, de façon à déterminer si la méthode permettait de distinguer la proportion de  $N_2O$  produite par les organismes nitrifiants. Il est probable que ceux-ci aient pu coloniser le milieu filtrant, car une aération passive était possible dans le procédé et un apport non négligeable d'azote ammoniacal était fourni aux microorganismes (section 3.2.2.1).

Il est possible de constater à la Figure 3.12 que l'ajout d'acétylène à la biomasse, à une pression partielle de 10 Pa et dans des conditions anoxiques, a causé une augmentation significative de la production de  $N_2O$ . On se serait plutôt attendu à une diminution de celle-ci, puisque les organismes nitrifiants sont censés être inhibés à ce niveau de  $C_2H_2$ . Il est toutefois important de noter que le milieu filtrant utilisé provient de biofiltres opérés dans des conditions favorisant la croissance de microorganismes dénitrifiants et qu'ainsi, la quantité de nitrifiantes pourrait être négligeable.

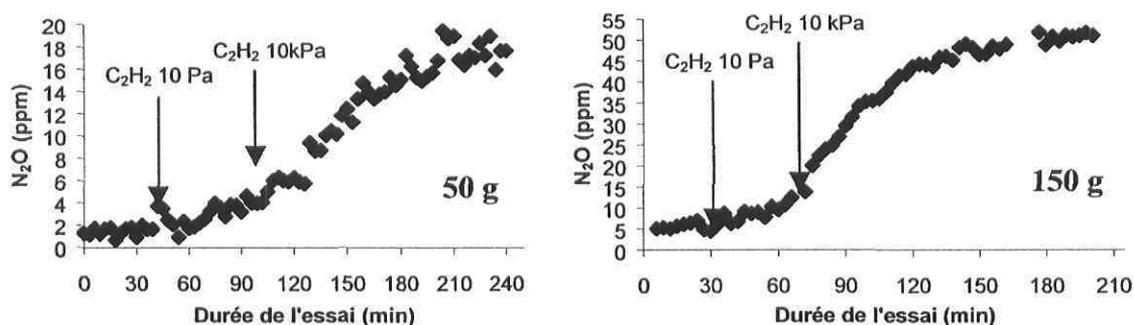


Figure 3.12. Réaction de la biomasse suite à l'ajout successif de  $C_2H_2$  à 10 Pa et 10 kPa

Cette hypothèse n'explique cependant pas l'augmentation de la production de  $N_2O$  par la biomasse. Quelques auteurs rapportent que les organismes dénitrifiants sont partiellement inhibés à partir de 1 Pa et ont même observé une diminution de près de 50% de l'activité dénitrifiante à une pression partielle de 10 Pa d'acétylène appliquée à un sol (Knowles 1990). Yoshinari et Knowles (1976) ont également démontré que l'acétylène à 1 Pa pouvait inhiber d'environ 10% la réduction du  $N_2O$  en  $N_2$  par les dénitrifiantes. Klemmedtsson *et al.* (1990) expliquent qu'il faut maintenir un équilibre délicat entre les pressions partielles inhibant les nitrifiantes de celles inhibant partiellement les organismes dénitrifiants et ce, afin de bien discerner la production de  $N_2O$  par chacun de ces organismes.

Les conditions sous lesquelles est opérée la cellule utilisée pour ce projet de doctorat rendent difficile le maintien de cet équilibre à l'intérieur du milieu filtrant. Il est probable que l'acétylène ne se distribue pas uniformément dans la cellule, inhibant ainsi une portion de la biomasse dénitrifiante. De plus, avant le début de chaque essai, le milieu filtrant est saturé de liquide afin de permettre une distribution uniforme de la solution nutritive dans la masse du support et d'augmenter la teneur en eau, permettant ainsi d'atteindre une activité

dénitrifiante optimale (Sigunda 2003). Il est possible que la haute solubilité de l'acétylène (0,928 mL/mL H<sub>2</sub>O à 101,3 kPa et 25°C; Klemetsson *et al.* 1990) conduise à une augmentation de sa concentration aqueuse et que celle-ci devienne inhibitrice pour la biomasse dénitrifiante.

La configuration actuelle de la cellule et les conditions sous lesquelles celle-ci est opérée durant les essais de blocage à l'acétylène ne permettent donc pas de discriminer la production de N<sub>2</sub>O par les organismes nitrifiants de celle des organismes dénitrifiants. Il serait nécessaire de modifier considérablement le montage de façon à mieux contrôler la pression partielle d'acétylène appliquée sur la biomasse. Cependant, ce type de modification entraînerait un changement majeur quant au principe de la mesure. En effet, un meilleur contrôle impliquerait l'utilisation d'échantillons plus petits, donc moins représentatifs de la biomasse du biofiltre. De plus, ce type de changement demanderait une modification importante des conditions environnementales par rapport à celles auxquelles la biomasse est soumise dans un biofiltre, perturbant ainsi plus fortement le milieu filtrant que l'application de l'essai tel qu'il est présentement réalisé. Pour ces raisons, et parce que le test a été conçu initialement pour évaluer spécifiquement l'activité des organismes dénitrifiants, l'essai n'a pas été modifié quant à sa forme, et l'acétylène à 10 Pa n'a plus été appliqué pour le reste du projet.

#### **3.3.2.4 Vérification de la variabilité de la méthode**

Afin d'évaluer la répétitivité d'une méthode, il est important de déterminer de façon empirique la variabilité de la technique et ensuite de décider statistiquement si l'intervalle obtenu satisfait la précision désirée. Ainsi, quatre répliqués ont été testés afin d'évaluer leur activité dénitrifiante potentielle et ainsi déterminer la variabilité de l'essai (Figures 3.13 et 3.14). On peut facilement observer que tous les répliqués montrent des taux de production de N-N<sub>2</sub>O similaires durant les essais. Les pentes calculées pour la Figure 3.14 sont présentées au Tableau 3-3. De plus, les répliqués réalisés lors de l'évaluation de la sensibilité de la méthode ont également été testés statistiquement.

Le coefficient de variation (CV) a été calculé pour chacune des conditions d'opération. Les valeurs ont varié entre 24 et 32 % en présence de N<sub>2</sub> et entre 9 et 24 % en présence

d'acétylène, suggérant une plus grande variabilité du taux de production de N-N<sub>2</sub>O au début des essais. Il est possible que ces coefficients de variation plus élevés soient dus à un étalonnage moins précis de l'analyseur de gaz à de faibles concentrations en N<sub>2</sub>O, telles que celles retrouvées en présence de N<sub>2</sub>. Parkin *et al.* (1984) ont obtenu des coefficients de variation oscillant entre 11 et 16 % lors de l'analyse répétitive de l'activité microbiologique d'un échantillon tandis que lors de l'analyse de l'activité de réplicats récoltés sur le même échantillon, comme lors de nos travaux, ces derniers ont plutôt observé des CV oscillant entre 63 et 89%. Les valeurs ont également été analysées statistiquement afin de vérifier la similarité des résultats à l'aide d'un test de Huber (annexe 3, A3.2). Les résultats obtenus ( $k = 3,5$ ) montrent qu'il n'y a pas de données aberrantes et, en considérant les risques d'erreurs associés au blocage à l'acétylène, on peut conclure que les valeurs obtenues sont similaires. Ces données suggèrent que la technique du blocage à l'acétylène, tel qu'adaptée dans ce projet, permet, sous une atmosphère d'acétylène, d'obtenir une variabilité moindre que celle retrouvée dans la littérature.

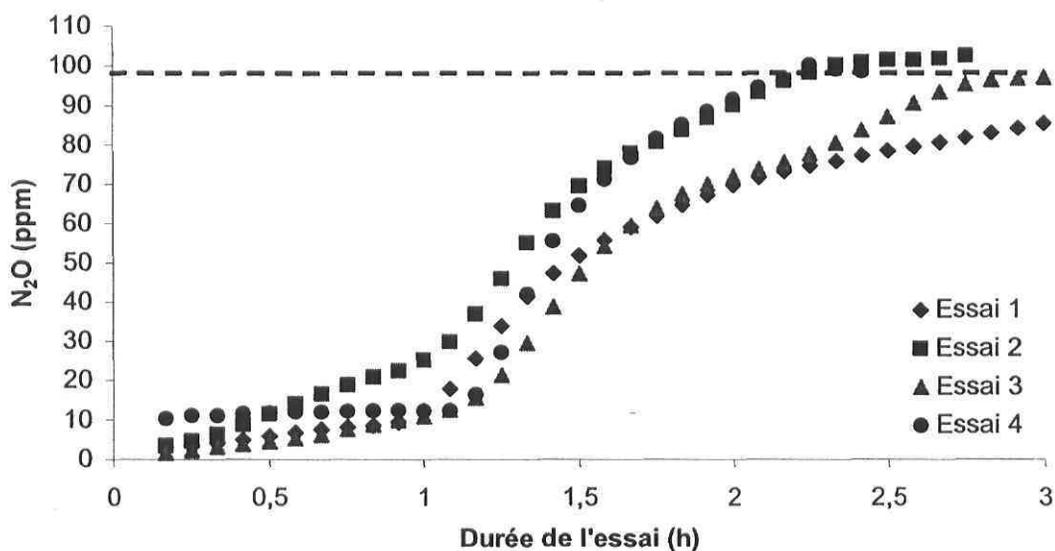


Figure 3.13. Courbes de production de N<sub>2</sub>O sur des réplicats de 100g humides

Les performances du biofiltre utilisé pour l'évaluation de la variabilité de la méthode étaient sensiblement meilleures que celles du biofiltre utilisé pour l'évaluation de sa sensibilité. Il n'est donc pas surprenant que l'activité dénitrifiante potentielle soit plus élevée pour ce média filtrant, à 1250 µgN-N<sub>2</sub>O h<sup>-1</sup> (Tableau 3.3), comparé aux résultats obtenus lors des

essais sur la sensibilité réalisés sur 100 g (base humide), avec une activité potentielle avoisinant  $465 \mu\text{gN-N}_2\text{O h}^{-1}$ . Les données semblent donc montrer que la biomasse a augmenté son potentiel à dénitrifier de près de 300 %, pour une élévation de seulement 11% des performances, évalués par l'enlèvement du  $\text{NO}_3^-$  dans les biofiltres. Cela suggère que le procédé n'a tout simplement pas atteint sa performance épuratoire maximale, à cause de conditions environnementales non optimales. Toutefois, ce type d'essai ne permet pas de déterminer si la différence est causée par une quantité plus importante de biomasse ou par une biomasse plus active et acclimatée aux conditions dénitrifiantes.

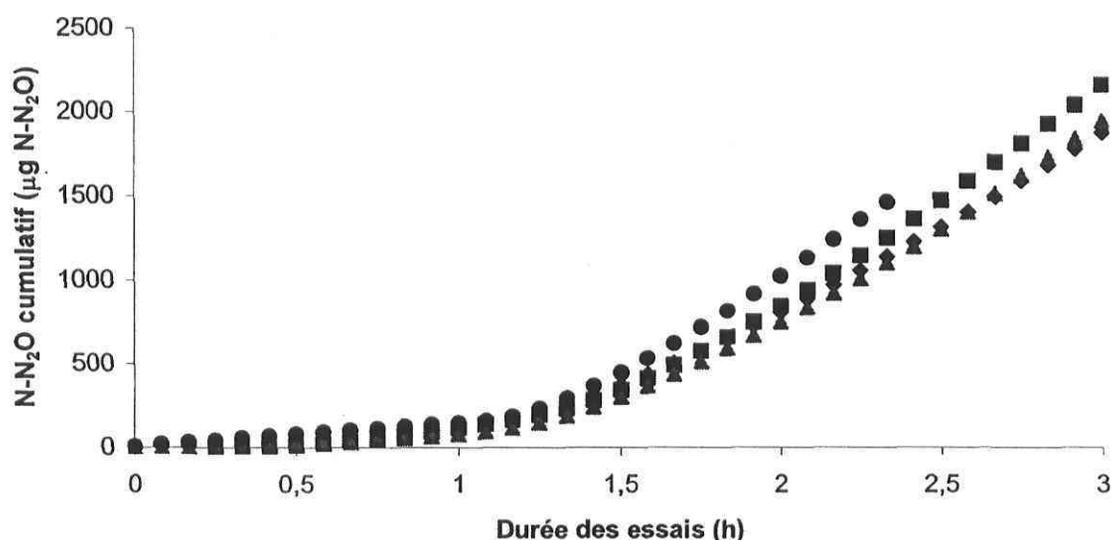


Figure 3.14. Répétitivité des essais selon la masse cumulative de N-N<sub>2</sub>O

Tableau 3-3. Activités dénitrifiantes potentielles pour l'évaluation de la variabilité de la méthode du blocage à l'acétylène

Replicats	Taux de production de N-N <sub>2</sub> O ( $\mu\text{gN-N}_2\text{O h}^{-1}$ )		
	N <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Dénitrification complète
1	90	1077	987
2	152	1347	1195
3	80	1257	1177
4	140	1320	1180
Moyenne	116	1250	1135
Écart-type	36	122	99

### 3.4 Conclusion

Des essais ont été réalisés sur deux techniques permettant d'évaluer l'activité potentielle des organismes nitrifiants et dénitrifiants: la respirométrie azotée et le blocage à l'acétylène. Ces tests avaient pour objectif de vérifier le comportement de la biomasse lorsque soumise à ces tests, c'est-à-dire d'évaluer la variabilité des méthodes ainsi que leur sensibilité. Suite à une revue de littérature exhaustive, il semble que ce soit la première fois que ces méthodes soient utilisées pour suivre l'activité potentielle d'échantillon de milieu filtrant organique.

Il a été démontré que la respirométrie azotée permet d'évaluer l'activité nitrifiante potentielle, sans toutefois pouvoir discerner l'activité des microorganismes nitritants de celle des nitratants. En effet, l'activité respirométrique des organismes nitratants semblait insuffisante pour distinguer une différence d'activité lors de l'ajout de nitrite ou d'un inhibiteur spécifique aux nitratants. Il faut noter que cette méthode est applicable dans la mesure où l'activité respirométrique de l'échantillon testé est supérieure à la dérive normale de la sonde à oxygène dissous ( $0,14 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  pour ce projet) et où la consommation de l'oxygène est suffisamment lente pour accommoder le temps de réponse de cette même sonde.

Le blocage à l'acétylène, tel qu'adapté lors de nos travaux, a montré une variabilité moindre que celle retrouvée dans la littérature pour le même type de mesure. De plus, le temps de réponse de la biomasse, lors de l'application d'un flux d'acétylène, est particulièrement rapide, rendant cette méthode très intéressante pour son application de façon routinière. Il a été démontré que plus la biomasse est active, plus ce temps de réponse est raccourci.

De plus, les résultats obtenus lors des différents essais réalisés sur les colonnes d'enrichissement ont permis de constater que le potentiel dénitrifiant n'augmente pas de façon proportionnelle à la performance épuratoire du procédé; c'est pourquoi il faut faire attention aux données recueillies lors de ce type d'essais. En effet, même si l'adaptation du blocage à l'acétylène a rendu la mesure plus représentative de l'environnement d'origine de la biomasse du milieu filtrant, celle-ci ne donne que le potentiel de la biomasse à transformer l'azote dans des conditions dénitrifiantes optimales. Cela signifie que les

données obtenues ne donne qu'un indice de la quantité de biomasse ou de l'activité dénitrifiante dans l'échantillon testé. Même si les microorganismes sont présents en grand nombre dans le procédé, cela ne signifie pas que ceux-ci soient en mesure d'accomplir ce métabolisme au maximum, les conditions du procédé ne le permettant pas.

Ces deux méthodes permettent d'obtenir l'activité potentielle de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante en très peu de temps, ce qui rend ces techniques facilement applicables de façon routinière. De plus, elles sont très faciles à réaliser et demandent un appareillage restreint. Ainsi, celles-ci pourraient aisément être utilisées régulièrement pour suivre la colonisation, par ce type de microorganismes, de biofiltres à grande échelle ou à l'échelle de laboratoire.

Une note technique était sous presse, lors du dépôt initial de cette thèse, dans "Journal of Environmental and Engineering Science", concernant l'adaptation du blocage à l'actétylène pour le suivi de la biomasse dénitrifiante dans ce type de procédé. Le manuscrit de cette note est disponible à l'annexe 7.

## **Chapitre 4**

### **Caractérisation microbiologique d'unités pilotes de biofiltration de lisier de porc**

#### **4.1 Introduction**

Les chapitres 1, 2 et 3 ont permis de constater qu'il existe différentes techniques permettant de caractériser la biomasse du cycle de l'azote. De plus, dans les deux derniers chapitres, il a été démontré que certaines de ces méthodes étaient applicables pour le suivi des microorganismes fixés sur le support d'un biofiltre organique. En effet, la respirométrie azotée permet de suivre l'activité nitrifiante potentielle, le blocage à l'acétylène, l'activité dénitrifiante potentielle, tandis que les techniques de biologie moléculaire, particulièrement le PCR en temps réel, permettent la quantification de certains microorganismes du cycle de l'azote.

Ces travaux préliminaires avaient pour but de vérifier l'applicabilité de ces méthodes pour le suivi d'un biofiltre à support organique et leur préparation. Le deuxième objectif de ce projet consistait donc principalement à caractériser la colonisation de biofiltres à support organique traitant du lisier de porc, à l'échelle pilote industrielle, par la biomasse nitrifiante et dénitrifiante. Pour ce faire, les techniques testées au début du projet ont été utilisées. Ce chapitre présente les expérimentations réalisées pour atteindre ce second objectif, ainsi que les résultats y étant rattachés.

## **4.2 Matériel et méthodes**

Afin d'atteindre l'objectif décrit à la section 4.1, trois biofiltres pilotes aérés à support organique ont été construits dans les laboratoires du CRIQ et suivis pendant 180 jours. Le ratio carbone/azote était différent pour chacun des biofiltres de manière à caractériser le procédé sous différentes conditions d'opération. Ces derniers ont été conçus de façon à permettre un échantillonnage régulier des phases aqueuse et gazeuse ainsi que du milieu filtrant et ce, à différentes hauteurs. Ce suivi avait pour but de suivre les transformations de l'azote à travers le procédé, dans le temps et dans l'espace, en plus de suivre la colonisation du milieu filtrant par la biomasse nitrifiante et dénitrifiante; colonisation qualifiée par l'activité des microorganismes ainsi que par la quantification des bactéries impliquées dans le cycle de l'azote.

### **4.2.1 Montage et suivi des unités pilotes**

#### **4.2.1.1 Description des biofiltres**

Le schéma d'une colonne type est montré à la Figure 4.1 (voir aussi les photos, annexe 6). Les colonnes étaient entièrement constituées de polyvinyle chloré (PVC), avaient un diamètre extérieur de 406 mm et l'épaisseur de la paroi était de 19 mm. Une fenêtre de PVC clair de 51 mm a été installée à l'avant de façon à permettre l'observation du milieu filtrant dans le biofiltre ainsi que l'écoulement du lisier. Chacun des biofiltres était composé de deux parties égales réunies par une bride munie d'une rondelle d'étanchéité. Cette particularité a facilité l'installation et le remplissage, lors de la mise en place. Des bouchons de PVC situés sur le dessus et le fond des colonnes, munis de rondelle de caoutchouc et de loquets ont contribué à rendre hermétique le système.

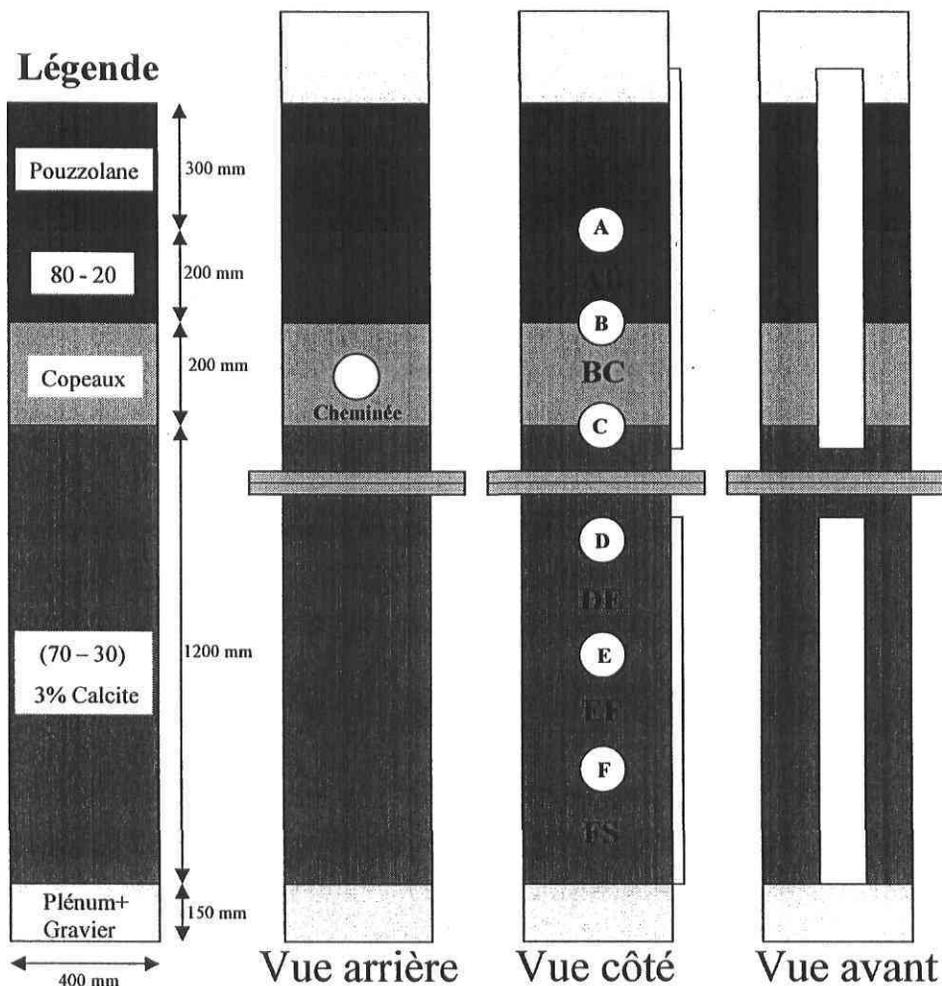


Figure 4.1. Schéma d'une colonne pilote de biofiltration

Des points d'échantillonnage pour le liquide ont été placés à des hauteurs de 450 mm, 750 mm, 1050 mm, 1350 mm, 1550 mm et 1750 mm, en calculant à partir du bas du biofiltre. Ceux-ci étaient constitués d'un trou dans lequel un adaptateur vissant de 51 mm de diamètre a été placé. Ces points ont été appelés respectivement F, E, D, C, B et A. Sauf à la hauteur de la bride unissant les deux parties du tuyau de PVC, des trous supplémentaires de 51 mm ont été forés entre chaque point d'échantillonnage, au centre de la couche, de manière à pouvoir échantillonner le milieu filtrant et ainsi caractériser la biomasse nitrifiante et dénitrifiante à une hauteur donnée. Pour chacune des couches, trois trous ont été réalisés tout autour de la colonne de façon à éviter un échantillonnage du milieu filtrant trop fréquent au même endroit. Ces trous ont également servi à analyser les gaz produits dans chacune des couches. À partir du bas du biofiltre, ces trous ont été appelés FS, EF, DE, BC

et AB, en référence aux noms des points d'échantillonnage liquide et de la sortie de l'effluent liquide entre lesquels ces trous étaient situés. Ces trous ont été bouchés à l'aide de bouchons de caoutchouc de dimensions appropriées.

Un plénum fait à partir d'un caillebotis de plastique a été placé au fond du biofiltre afin de mieux répartir l'aération sur toute la surface du procédé. Une couche de gravier a été placée sur celui-ci, sur une hauteur totale de 150 mm, de façon à favoriser le drainage du liquide traité vers la sortie du biofiltre. Ensuite, 1200 mm de milieu filtrant, constitué d'un mélange (v/v) de 3 % de calcite ( $\text{CaCO}_3$ ), 68 % de copeaux de bois et 29 % de tourbe blonde ayant un degré d'humification entre H3 et H4 selon l'échelle de Von Post (Annexe 1), ont été placés délicatement dans les colonnes, à raison de 300 mm à la fois. Le milieu filtrant a été humecté avec de l'eau du robinet lors du remplissage des colonnes de biofiltration. Cette manipulation avait pour objectif de prévenir une compaction importante lors de l'alimentation du procédé avec l'effluent liquide, l'humidification permettant une pré-compaction du milieu filtrant. Le mélange situé à proximité des parois a également été légèrement compacté sous forme de ceinturon, à l'aide d'un outil semi-circulaire (Figure A6.10, annexe 6), afin d'éviter la création d'un chemin préférentiel, pour le passage de l'air et/ou l'écoulement du liquide, entre le milieu filtrant et le bord du biofiltre.

Suite à la compaction de chacune des couches, une mèche de fibre de verre a été placée de manière à traverser horizontalement le biofiltre et à ressortir par un des points d'échantillonnage du liquide (Figure A6.9, annexe 6). Tous les trous ont ensuite été bouchés à l'aide d'une série d'adaptateurs et d'un tuyau semi-rigide permettant une manipulation plus aisée de la mèche à l'extérieur du procédé. L'ensemble du montage « mèche-tuyau » a ensuite été installé verticalement, vers le haut, afin d'éviter un écoulement continu du liquide vers l'extérieur du biofiltre.

Une couche de milieu filtrant grossier a ensuite été placée à la surface du milieu filtrant organique. Cette dernière était constituée de trois sous-couches, en ordre à partir du milieu filtrant organique: 200 mm de copeaux de bois, 200 mm d'un mélange (v/v) de 80 % copeaux de bois et 20 % tourbe blonde (couche 80-20), identique à celle utilisée pour constituer le milieu filtrant organique, et 300 mm de pouzzolane (granulométrie: 1-2 cm diamètre). La présence de la pouzzolane avait pour objectif de prétraiter le lisier de façon à

éviter un colmatage précoce du milieu filtrant organique. La couche de "80-20" permettait de retenir les flocons de biofilm se détachant de la pouzzolane par desquamation, tandis que les copeaux permettaient une transition entre le milieu grossier et le milieu filtrant organique. Une cheminée d'évacuation d'air a été placée dans la couche de copeaux de façon à détourner l'aération lors d'un colmatage éventuel de la couche grossière, réduisant ainsi les risques de créer un barbotage en surface du procédé. Ce type d'événement favorise la croissance de la biomasse et accentue le colmatage de surface. Celles-ci ont été ouvertes, pour tous les biofiltres, entre les jours 100 et 120.

Des pompes à cavités ont permis l'alimentation des biofiltres en lisier (Figure A6.4, annexe 6). Ce dernier a été conservé à 4°C durant toute la durée des essais dans un réfrigérateur horizontal surmonté d'une plaque de plexiglas. Les contenants de lisier ont été remplis une fois par semaine à partir d'un baril de 200 L, lui-même conservé à 4°C pour une durée maximale ne dépassant pas un mois. Un système de minuterie a permis de contrôler l'alimentation et l'agitation du lisier. Celui-ci était étalonné de façon à pomper et à agiter le lisier 14 secondes, toutes les 4 heures. Une valve installée sur chacun des réseaux d'alimentation permettait de régler le débit à 370 mL par pulsation, pour un total de 2,2 L d<sup>1</sup>. Ce débit correspond, pour ces biofiltres pilotes, à une charge hydraulique d'environ 0,017 m<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. De plus, le réseau d'alimentation est demeuré rempli entre chaque pulsation à l'aide d'un clapet anti-retour. Un système d'aération, provenant de l'air comprimé du CRIQ, régulé par des débitmètres (0-10 L min<sup>-1</sup>), a permis de conserver un apport d'air de 10 L min<sup>-1</sup>, correspondant à une vitesse de 4,5 m<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, dans chacun des biofiltres. Ces paramètres d'opération ont été fixés selon les critères de fonctionnement des biofiltres à grande échelle traitant du lisier de porc.

#### **4.2.1.2 Caractéristiques du lisier utilisé**

Le lisier utilisé provenait de la ferme Viaporc, située en Beauce. À cet endroit, celui-ci subit un traitement physico-chimique, afin de réduire la charge particulaire, avant son traitement par biofiltration. Une coagulation au chlorure ferrique suivie d'une floculation à l'aide de polymères permet de parvenir à cette fin.

Le lisier utilisé lors de ce projet était récupéré avant le traitement biologique et acheminé la journée même vers les laboratoires. Celui-ci possédait un rapport  $DBO_5$ :NTK (demande biologique en oxygène après 5 jours: azote total Kjeldahl) d'environ 6 et a été utilisé comme lisier de référence. Il a été décidé au début des essais que la colonisation serait suivie à l'intérieur de biofiltres soumis à divers ratios  $DBO_5$ :NTK: 3, 6 et 9. Ces rapports ont été appliqués respectivement aux biofiltres 1, 2 et 3. La biomasse dénitrifiante étant principalement responsable du processus limitant l'enlèvement de l'azote dans ce procédé, il est apparu important de vérifier l'influence d'une quantité plus ou moins grande de carbone par rapport à la concentration en azote ammoniacal.

Afin d'obtenir un lisier avec un ratio  $DBO_5$ :NTK de 3, une masse connue (270 g) de  $NH_4HCO_3$  a été ajoutée à 30 L de lisier dilué 1,5X avec l'eau du robinet. La dilution avait pour but d'éviter d'appliquer une charge massique en azote ou en carbone qui dépassait largement le corridor sécuritaire d'opération défini par le brevet d'exploitation (Buelna 1998). Enfin, pour atteindre un ratio de 9, le lisier de référence a été dilué 1,5X avec l'eau du robinet et une solution synthétique contenant différentes sources de carbone a été ajoutée afin d'augmenter la  $DBO_5$  et atteindre ces concentrations finales : 2 g  $L^{-1}$   $C_2H_5CO_2Na$  (propionate de sodium), 3,4 g  $L^{-1}$   $C_3H_6O_3$  (acide lactique), 2 g  $L^{-1}$   $C_2H_2O_2Na$  (acétate de sodium), 0,07 g  $L^{-1}$   $C_4H_8O_2$  (acide butyrique), 1,6 g  $L^{-1}$   $C_2H_6O$  (éthanol). Les caractéristiques de ces lisiers sont présentées au Tableau 4-1 tandis qu'un résumé des conditions d'opération des biofiltres est fourni au Tableau 4-2.

Tableau 4-1. Caractéristiques des lisiers utilisés pour l'alimentation des biofiltres

Paramètres	Biofiltre 1 <sup>a</sup>	Biofiltre 2 <sup>a</sup>	Biofiltre 3 <sup>a</sup>
DCO ( $mgO_2 L^{-1}$ )	15300 ± 1300	22300 ± 3100	24100 ± 1300
$DBO_5$ ( $mgO_2 L^{-1}$ )	9800 ± 800	13200 ± 1300	13400 ± 1100
COT ( $mgC L^{-1}$ )	5500 ± 200	7400 ± 1100	8100 ± 210
NTK ( $mgN L^{-1}$ )	3200 ± 150	2400 ± 400	1640 ± 240
N- $NH_4$ ( $mgN L^{-1}$ )	3100 ± 300	2400 ± 270	1560 ± 200
Alcalinité ( $mgCaCO_3 L^{-1}$ )	8700 ± 1300	6300 ± 1000	6200 ± 600
MES ( $mg L^{-1}$ )	360 ± 130	540 ± 160	360 ± 265
pH	7,7 ± 0,6	6,7 ± 0,5	7,0 ± 0,6
<b><math>DBO_5</math>:NTK</b>	<b>3,1</b>	<b>5,5</b>	<b>8,6</b>

<sup>a</sup> moyenne  $\pm$  écart type où n = 12 (DCO), 5 (DBO<sub>5</sub>), 5 (COT), 5 (NTK), 15 (N-NH<sub>4</sub>), 5 (Alcalinité), 4 (MES), 6 (pH).

Tableau 4-2. Charges appliquées sur les biofiltres pilotes

Charges appliquées	Biofiltre 1	Biofiltre 2	Biofiltre 3
DBO <sub>5</sub> (kgDBO <sub>5</sub> m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	0,20	0,27	0,28
NTK (kgN m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	0,067	0,050	0,034
Alcalinité (kgCaCO <sub>3</sub> m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	0,15	0,11	0,11
Hydraulique (m <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	0,017	0,017	0,017
Aération (m <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	110	110	110

D'après Grady *et al.* (1999), l'oxydation d'un gramme d'azote par la croissance des bactéries nitrifiantes nécessite 7,08 g (CaCO<sub>3</sub>) d'alcalinité. On peut voir dans le Tableau 4-2 que l'alcalinité appliquée au procédé est nettement insuffisante pour l'oxydation complète des NTK en nitrate. En effet, pour le biofiltre 1, 2 et 3, il aurait été nécessaire d'appliquer respectivement 0,39, 0,30 et 0,21 kgCaCO<sub>3</sub> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. L'ajout de calcite au mélange de milieu filtrant avait pour objectif de fournir le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> manquant dans l'affluent de façon à oxyder complètement l'azote. On s'est attendu également à ce que la dégradation aérobie de la matière organique ainsi que la dénitrification créent une partie de l'alcalinité consommée par les nitrifiantes, par une production importante de CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.1.3 Échantillonnage et analyses

Le suivi des biofiltres a duré 180 jours durant lequel plusieurs types d'échantillonnages ont été réalisés. En effet, les gaz, le liquide et le milieu filtrant ont été récoltés et analysés à différentes durées d'opération et à différentes hauteurs dans les trois biofiltres pilotes.

L'ammoniaque gazeux (NH<sub>3</sub>), l'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O) et le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) ont été analysés de façon hebdomadaire avec un analyseur de gaz utilisant la spectroscopie photoacoustique (Brüel & Kjøer modèle 1301) à chaque profondeur et à l'entrée et la sortie de l'aération. Lors de la mesure des gaz, la cheminée située dans la couche BC était toujours fermée pour permettre au flux gazeux de s'écouler jusqu'en haut du biofiltre.

Le N-NTK, le N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, la DCO, les MES, le phosphore, la DBO<sub>5</sub>, le carbone organique total (COT), l'alcalinité et le pH ont été mesurés mensuellement dans l'alimentation et dans l'effluent liquide à l'aide des méthodes citées au Tableau 4-3. La concentration en nitrite (N-

$\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{N-NO}_3^-$ ), en azote ammoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) et en DCO a été évaluée deux fois par mois pour chaque mèche ainsi que dans l'effluent liquide. Ces données ont été utilisées pour estimer les performances nitrifiantes et dénitrifiantes d'une couche de milieu filtrant donnée en calculant un bilan de masse sur l'azote (Figure 4.2). Étant donné que plusieurs paramètres permettant le calcul des bilans sont estimés, il est important de se rappeler que les activités obtenues ne représentent pas l'activité réelle de l'échantillon testé, mais plutôt un aperçu de celle-ci. Pour obtenir plus de détails sur le calcul du bilan de masse sur l'azote, se référer à l'Annexe A4.5.

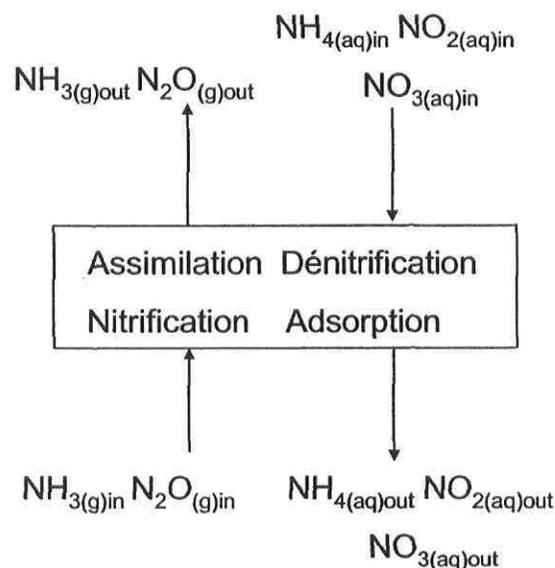


Figure 4.2. Schéma d'une couche de milieu filtrant pour le calcul du bilan sur l'azote

Les échantillons ont été conservés un maximum de deux mois à  $-20^\circ\text{C}$  avant leur analyse. Le nitrite et le nitrate ont été évalués par HPLC (high pressure liquid chromatography), tel que décrit par Fernández-Boy *et al.* (1998). L'azote ammoniacal a été évalué par la méthode de Nessler 4500-C (APHA et AWWA 1992). La DCO, mesurée sur les échantillons récoltés à l'aide des mèches de fibres de verre, a été évaluée avec la méthode 8000 de Hach, à l'aide d'un spectrophotomètre PESSW de Perkin Elmer. Ces paramètres ont été analysés à l'aide de méthodes différentes que celles décrites dans le Tableau 4.3 afin de réduire les coûts reliés au nombre important d'échantillons.

À toutes les trois semaines, des échantillons de milieu filtrant d'environ 500 mL, provenant des couches de pouzzolane, AB, DE et EF, ont été récoltés dans chaque biofiltre, de façon

alternative, afin d'évaluer l'activité potentielle nitrifiante et dénitrifiante de la biomasse. Afin d'échantillonner la pouzzolane, les deux à cinq premiers centimètres en surface du biofiltre ont été mis de côté de manière à récolter la pouzzolane au centre de la couche. Pour les sections organiques de milieu filtrant, les échantillons étaient amassés en enlevant le bouchon de caoutchouc approprié et en grattant l'intérieur du biofiltre avec une spatule métallique. Afin d'éviter de toujours puiser au même endroit et d'obtenir du milieu filtrant le plus colonisé possible, l'échantillonnage se faisait alternativement dans l'un des trois points d'échantillonnage, situés sur le pourtour de la colonne à un même niveau horizontal. Suite à la récolte de milieu filtrant ou de pouzzolane colonisé, un volume similaire de substrat vierge était replacé dans l'espace laissé vacant afin de maintenir la structure du biofiltre et d'éviter un affaissement et des chemins préférentiels à l'intérieur du procédé.

Tableau 4-3. Méthodes utilisées pour l'analyse des paramètres à l'effluent et à l'affluent des biofiltres pilotes

Paramètres	Numéro	Nom de la méthode	Références
N-NTK	MA-4049	NTK Eaux usées	CRIQ 1997
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	MA-4048	N-NH <sub>3</sub> Eaux usées	CRIQ 1997
DCO	MA-4058	DCO Eaux usées	CRIQ 1997
MES	MA-4052	MES et MVES	CRIQ 1997
Phosphore total	MA-4054	Phosphore total - Eaux usées	CRIQ 1997
DBO <sub>5</sub>	5210-B	5-Day BOD Test	APHA et AWWA 1998
COT	5310-B	High Temperature combustion method	APHA et AWWA 1998
Alcalinité	2320-B	Titration method	APHA et AWWA 1998
pH	4500-H <sup>+</sup> -B	Electrometric method	APHA et AWWA 1998

Afin de réaliser la quantification des microorganismes à l'aide de techniques de biologie moléculaire, de la tourbe provenant des mêmes trous d'échantillonnage a été mise dans un tube stérile de 2 mL, rangée à -20°C et entreposée pour une durée maximale de six mois avant l'extraction des acides nucléiques. Pour la quantification de la biomasse présente sur les particules de pouzzolane, 6 mL de la suspension de biofilm, ayant servi lors de l'évaluation de l'activité nitrifiante potentielle par respirométrie azotée, ont été centrifugés à 7000 g pendant 1 minute. Le surnageant a été jeté et le culot restant a été rangé à -20°C pour une extraction ultérieure des acides nucléiques.

#### **4.2.2 Quantification des microorganismes nitrifiants et dénitrifiants présents sur le milieu filtrant des biofiltres pilotes par PCR en temps réel**

La quantification des microorganismes a été réalisée par PCR en temps réel selon les indications décrites dans le tableau A5.2 de l'annexe 5. Pour chaque échantillon inconnu et chaque concentration connue de la courbe étalon, les réactions ont été réalisées en duplicata et la moyenne des données a été utilisée. Pour tous les groupes de microorganismes à quantifier, trois lots d'analyses ont été effectués dans lesquels on retrouvait environ 30 échantillons à quantifier, la courbe étalon ( $10^1 - 10^8$  copies tube<sup>-1</sup>), deux blancs et un témoin positif. Lors de la réalisation de chaque lot d'analyses, deux extraits d'acides nucléiques inconnus, le premier provenant d'un échantillon de pouzzolane et l'autre de milieu filtrant organique, ont été ajoutés à une quantité connue du gène à tester ( $10^6$  copies tube<sup>-1</sup>). Cette manipulation avait pour objectif de vérifier que l'efficacité de l'amplification était maintenue en présence des extraits environnementaux. En effet, la présence d'inhibiteurs dans les échantillons pourrait retarder l'amplification et biaiser négativement les résultats obtenus. Cette précaution a été prise même s'il a été démontré, tel que décrit à la section 2.2.3, que l'effet des inhibiteurs était mineur pour ce type d'échantillons lorsque l'extrait d'acides nucléiques était dilué plus de 10 fois. Dans tous les cas, l'ajout de cet échantillon n'occasionnait qu'un retard moyen de moins d'un cycle, ce que nous avons considéré comme satisfaisant.

L'ADN a été extrait du milieu filtrant à l'aide du kit "FastPrep DNA Soil Isolation kit" de Qbiogene, selon le protocole du fournisseur (Voir annexe A2.9). Le Mastermix Sybr<sup>®</sup>Green ainsi que le mastermix Taqman<sup>®</sup> utilisés provenaient d'Invitrogen Life Technologies (Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup>Green qPCR SuperMix-UDG et Platinum<sup>®</sup> Quantitative PCR SuperMix-UDG). La séquence des amorces et des sondes utilisées pour chaque microorganisme est décrite en détail au tableau A5.3 de l'annexe 5.

### 4.2.3 Évaluation de l'activité nitrifiante potentielle de la biomasse présente sur le milieu filtrant des biofiltres pilotes par respirométrie azotée

Afin d'évaluer l'activité des microorganismes nitrifiants présents sur le milieu filtrant, 100 g (base humide) de milieu filtrant organique et 150 g (base humide) de pouzzolane, ont été mis en suspension dans une solution saline isotonique (0,89 % NaCl). La température de celle-ci a ensuite été ajustée à 30°C en plaçant l'échantillon dans un bain thermorégulé. De l'alcalinité a été ajoutée à la suspension en y injectant 10 mL de  $\text{NaHCO}_3$  ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) afin d'inclure une source de carbone inorganique pour la biomasse nitrifiante et pour tamponner la suspension. L'échantillon a par la suite été aéré par agitation manuelle et transféré dans un respiromètre de type LSS agité et thermorégulé à 30°C par une double paroi (Figure 3.3 et Figure A6.8 de l'annexe 6). Le respiromètre était étalonné de manière à acquérir une mesure à toutes les 10 secondes.

Un millilitre d'une solution de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ( $140 \text{ g L}^{-1}$ ) et 1,5 mL d'une solution d'ATU ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) ont successivement été injectés dans le respiromètre. La respiration a été évaluée pendant environ 30 minutes à la suite de chaque ajout ou jusqu'à une diminution de l'oxygène dissous de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . La différence de pentes entre la respiration maximale et celle en présence d'ATU représente l'activité respirométrique azotée de la biomasse testée. Grady *et al.* (1999) estiment qu'il est possible de relier le taux de consommation d'oxygène à celui de l'oxydation du  $\text{N-NH}_4^+$ , car  $4,33 \text{ g d'O}_2$  sont théoriquement nécessaires pour oxyder  $1 \text{ g de N-NH}_4^+$ . À partir de ce facteur, on est en mesure d'estimer le potentiel de la biomasse à nitrifier l'ammoniaque pour chaque échantillon.

Pour les échantillons de pouzzolane, six millilitres de la suspension ont été centrifugés, tel que décrit à la section 4.2.1.3, pour la quantification des microorganismes par PCR en temps réel. La suspension respirométrique a ensuite été conservée à 4°C, pendant un maximum de 2 semaines, afin d'évaluer la quantité de MES et MVES. Cette valeur a permis d'obtenir une activité spécifique, c'est-à-dire un taux de respiration associé à une masse de matière en suspension ( $\text{mgO}_2 \text{ mgMVES}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), et de calculer par la suite un potentiel de nitrification pour une couche de milieu filtrant. En effet, en connaissant la masse volumique de l'échantillon (estimée lors de l'évaluation de l'activité dénitrifiante potentielle), il est

possible de relier la masse de milieu filtrant mise en suspension, l'activité respirométrique spécifique et le volume de la couche (voir calculs à l'annexe 4, A4.4).

#### **4.2.4 Évaluation de l'activité dénitrifiante potentielle de la biomasse présente sur le milieu filtrant des biofiltres pilotes par blocage à l'acétylène**

Afin d'évaluer l'activité dénitrifiante potentielle, le milieu filtrant a été placé et légèrement compacté sur la grille de la cellule pour un volume final de 0,55 L. Cette quantité correspondait au volume de la chambre dédié à l'échantillon. En connaissant la masse humide placée dans la cellule, la masse volumique du milieu filtrant a pu être évaluée. Une solution nutritive (section 3.2.2.2) a été mise en contact avec l'échantillon par aspersion jusqu'à saturation, c'est-à-dire jusqu'à l'égouttement de la solution nutritive au bas de la cellule.

L'essai a été réalisé tel que développé et décrit à la section 3.2.2. La cellule a ensuite été fermée de façon hermétique à l'aide des bouchons vissables. Des flux successifs de  $N_2$  et d'acétylène à 10 kPa ont ensuite été appliqués à un débit de 0,2 LPM sur l'échantillon de milieu filtrant. Ce débit correspondait au taux d'aération des biofiltres et permettait donc de créer des conditions les plus représentatives possibles de l'environnement originel de la biomasse. Pour chaque condition testée, la concentration en  $N_2O$  a été évaluée sur une période variant entre 30 minutes et 2 heures, dépendamment du temps nécessaire pour l'obtention d'une stabilité de la production de ce gaz. À certaines occasions, il a été nécessaire d'injecter de la solution nutritive en cours de lecture en raison d'une activité dénitrifiante trop importante ou pour remettre la biomasse en contact avec le substrat. Cette situation a été fréquemment rencontrée lors de l'analyse des échantillons de pouzzolane. Ces ajouts permettaient finalement d'atteindre un plateau pour la production de  $N_2O$  lorsque l'activité était maximale. Le surplus de solution ayant passé à travers l'échantillon était purgé entre chaque lecture par une valve située sous la cellule.

À la suite de chaque essai, l'échantillon de milieu filtrant était conservé à 4°C pour une évaluation ultérieure de la matière sèche (MS). Le  $N-N_2O$  cumulatif produit par la biomasse (éq. 18, section 3.2.2.3) a ensuite été normalisé par rapport à la masse sèche de milieu filtrant. Les valeurs obtenues ont été utilisées pour calculer le taux de dénitrification potentiel de l'échantillon, puis de la couche visée (voir calculs à l'annexe 4, A4.4).

## 4.3 Résultats et discussion

### 4.3.1 Performances épuratoires générales des biofiltres pilotes

En général, les trois biofiltres ont démontré une efficacité épuratoire se comparant aux études antérieures et aux systèmes de terrain traitant du lisier de porc (Dubé *et al.* 1995). On peut voir dans le Tableau 4-4 que l'enlèvement de la matière organique et de l'azote est presque complet dans tous les cas.

Cependant, la performance du biofiltre 3 a décliné à partir du milieu de la période de suivi, ce qui a causé une légère diminution de l'efficacité moyenne. Ce phénomène a coïncidé avec une coloration de plus en plus marquée de l'effluent (Figure 4.3), une augmentation importante du pH et de l'alcalinité à l'effluent ainsi qu'un accroissement de la concentration en DCO et en  $\text{N-NH}_4^+$  (Figure 4.4) à la sortie du procédé. Cette couleur a pu être associée à l'élévation du pH, qui permet une dissolution d'une partie de la matière humique du milieu filtrant (Weber 2005). Une portion de la DCO évaluée comprend la matière humique présente dans l'effluent; la hausse importante de ce paramètre en parallèle avec la couleur pourrait donc partiellement confirmer qu'une partie des acides humiques a été relarguée à l'effluent (Figure 4.2 et 4.3).

Tableau 4-4. Efficacité moyenne d'épuration des biofiltres pilotes évaluée pendant 180 jours

Paramètres <sup>a</sup>		Biofiltre 1	Biofiltre 2	Biofiltre 3
DCO	Entrée ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ )	15 300	22 300	24 100
	Sortie ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ )	330	430	3 000
	Efficacité (%)	97,8	98,1	87,6
DBO <sub>5</sub>	Entrée ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ )	9 800	13 200	13 400
	Sortie ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ )	8,8	7,6	13,4
	Efficacité (%)	99,9	99,9	99,9
NTK	Entrée ( $\text{mgN L}^{-1}$ )	3 200	2 400	1 640
	Sortie ( $\text{mgN L}^{-1}$ )	21	30	90
	Efficacité (%)	99,4	98,8	94,5
$\text{NH}_4^+$	Entrée ( $\text{mgN L}^{-1}$ )	3 100	2 400	1560
	Sortie ( $\text{mgN L}^{-1}$ )	25	34	38
	Efficacité (%)	99,2	98,6	97,6

<sup>a</sup> n = 12 (DCO), 5 (DBO<sub>5</sub>), 5 (NTK), 15 (N-NH<sub>4</sub>).

Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour tenter d'expliquer cette élévation importante du pH dans le biofiltre 3, les deux principales étant décrites dans le texte qui suit:

- La plus faible concentration initiale de NTK réduit l'apport d'ion  $H^+$  pouvant provenir de la nitrification, évidemment limitée par la quantité d'azote ammoniacal disponible. "L'acidification" due à la nitrification est donc moins prononcée que pour les autres biofiltres. D'ailleurs, les résultats présentés plus loin à la section 4.3.8.2 montrent que la biomasse nitrifiante a eu de la difficulté à coloniser le milieu filtrant du biofiltre 3, particulièrement les couches grossières;
- La principale hypothèse repose sur la consommation possible de protons lors de la biodégradation de l'acétate, tel que décrit par Gernaey *et al.* (2002). En effet, les microorganismes hétérotrophes assimilent ce substrat sous forme d'acide acétique et doivent donc utiliser les ions  $H^+$  présents en solution. Si ces derniers n'ont pas été ajoutés en même temps que l'acétate, il s'ensuit donc une élévation du pH.

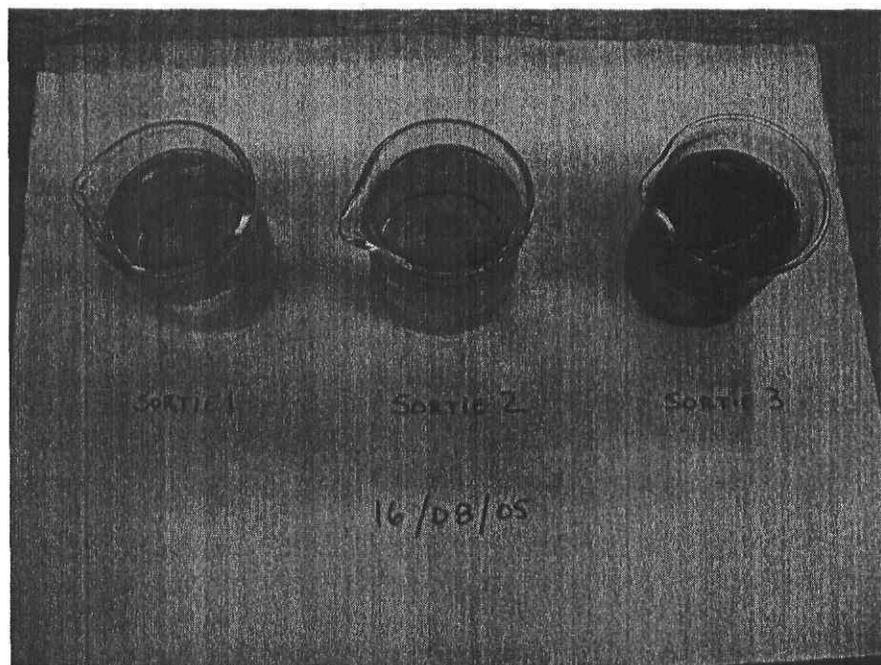


Figure 4.3. Comparaison de la couleur de l'effluent des biofiltres pilotes au jour 121

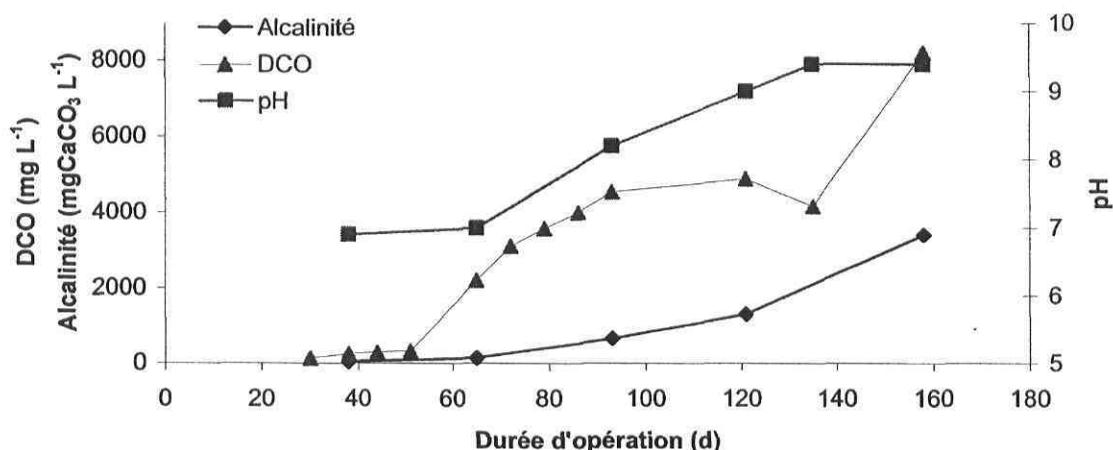


Figure 4.4. Évolution du pH, de la DCO et de l'alcalinité à l'effluent du biofiltre 3

L'efficacité des biofiltres pilotes pour l'enlèvement des composés non azotés est présentée au Tableau 4-5. Ces résultats montrent qu'un traitement physico-chimique suivi d'un traitement de biofiltration, tel que conçu lors de ce projet, permet un enlèvement presque complet du phosphore.

Tableau 4-5. Concentration moyenne à l'affluent et à l'effluent des biofiltres pilotes des composés non azotés évaluée durant toute la période de suivi

Paramètres <sup>a</sup>		Biofiltre 1	Biofiltre 2	Biofiltre 3
MES	Entrée (mg L <sup>-1</sup> )	360 ± 130	540 ± 160	360 ± 265
	Sortie (mg L <sup>-1</sup> )	16 ± 13	40 ± 38	13 ± 5
COT	Entrée (mg L <sup>-1</sup> )	5500 ± 200	7400 ± 1100	8100 ± 210
	Sortie (mg L <sup>-1</sup> )	110 ± 10	110 ± 20	2350 ± 3580
Ptot	Entrée (mg L <sup>-1</sup> )	24 ± 15	34 ± 23	21 ± 15
	Sortie (mg L <sup>-1</sup> )	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,05	2,1 ± 1,5
Alcalinité	Entrée (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	8700 ± 1300	6300 ± 1000	6200 ± 600
	Sortie (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	35 ± 8	35 ± 15	1115 ± 1380
pH	Entrée	7,7 ± 0,6	6,7 ± 0,5	7,0 ± 0,6
	Sortie	6,5 ± 0,5	6,5 ± 0,5	8,3 ± 1,1

<sup>a</sup> moyenne ± écart-type; n = 5 (MES), 5 (COT), 3 (Ptot), 5 (Alcalinité), 6 (pH).

La sortie du biofiltre 3 contenant une concentration croissante en DCO vers la fin des essais, il est raisonnable de croire que la concentration en COT soit également affectée. C'est ce qui expliquerait la forte valeur moyenne en COT retrouvée en sortie du biofiltre 3.

L'accroissement de l'alcalinité dans le biofiltre 3 pourrait s'expliquer par une nitrification moins importante dans ce dernier, étant donné la plus faible concentration en azote ammoniacal à l'entrée, diminuant du même coup la consommation de carbone inorganique, retrouvée sous forme d'alcalinité ( $\text{HCO}_3^-$ ), par la biomasse autotrophe nitrifiante.

Dans les trois cas, une production de nitrate a pu être observée à la sortie des biofiltres approximativement à partir du jour 40 (Figure 4.5 et Figure 4.23), confirmant l'établissement d'une biomasse nitrifiante. De plus, lors du commencement de la nitrification, une très faible production de nitrite a pu être constatée pendant une vingtaine de jours pour entièrement disparaître par la suite (Figure 4.23). Toutefois, ces résultats n'indiquent pas nécessairement que la biomasse nitrifiante soit apparue à ce moment précis dans le procédé. En effet, il est possible que l'oxydation de l'azote ammoniacal par les nitrifiants ait commencée plus tôt, durant la période de démarrage. Les microorganismes dénitrifiants présents dans les zones anoxies, utilisant le nitrate produit, auraient pu empêcher l'observation directe de l'établissement de la biomasse nitrifiante en évaluant seulement le  $\text{NO}_3^-$  en sortie du procédé. La Figure 4.27 montre indirectement, par la mesure de leur activité potentielle par respirométrie azotée, que les bactéries nitrifiantes se sont installées dans le procédé dès le départ et que leur présence s'est accrue peu après 20 jours d'opération dans les biofiltres 1 et 2 et autour du 40<sup>e</sup> jour dans le biofiltre 3. Évidemment, cette constatation est limitée par la fréquence de l'échantillonnage, particulièrement pour les premiers moments de la colonisation, et par l'erreur sur la mesure.

On peut voir à la Figure 4.5 que la quantité de  $\text{N}_2\text{O}$  à la sortie de l'aération augmente de façon significative pour les trois biofiltres lorsque les nitrates augmentent et que la concentration en  $\text{NH}_3$  dégazé diminue. Ce phénomène suggère qu'une partie de la production de  $\text{N}_2\text{O}$  proviendrait de la transformation biologique de l'azote. Cependant, avec les données présentement disponibles, il n'est pas possible de discerner si cette production provient principalement de la nitrification ou de la dénitrification. En effet, il est largement reconnu qu'en plus de la dénitrification incomplète et de la chimiodénitrification, les

microorganismes nitrifiants peuvent, lorsque l'oxygène ou le  $\text{NH}_4^+$  deviennent limitants, produire une certaine quantité de  $\text{N}_2\text{O}$  (Anderson *et al.* 1993; Kester *et al.* 1997; Colliver et Stephenson 2000; Wrage *et al.* 2001; Burgess *et al.* 2002). Également, Avrahami *et al.* (2002) ont démontré qu'une hausse de la concentration en  $\text{N-NH}_4^+$  dans l'alimentation augmente le taux de  $\text{N}_2\text{O}$  produit ainsi que la contribution des organismes nitrifiants à la production de ce gaz. Dans notre cas, il n'y a pas de changement au niveau de la concentration en azote ammoniacal durant les essais, mais les très fortes charges azotées pourraient favoriser une forte production de  $\text{N}_2\text{O}$ , particulièrement par les microorganismes nitrifiants. De plus, il est possible que l'aération importante dans le procédé ait pu entraîner vers la sortie une portion non négligeable du  $\text{N}_2\text{O}$  produit, avant que les microorganismes dénitrifiants puissent le réduire complètement en azote moléculaire ( $\text{N}_2$ ). Ces deux hypothèses constituent une piste intéressante pour certaines études futures visant à mieux comprendre les phénomènes de nitrification et de dénitrification dans le biofiltre à support organique.

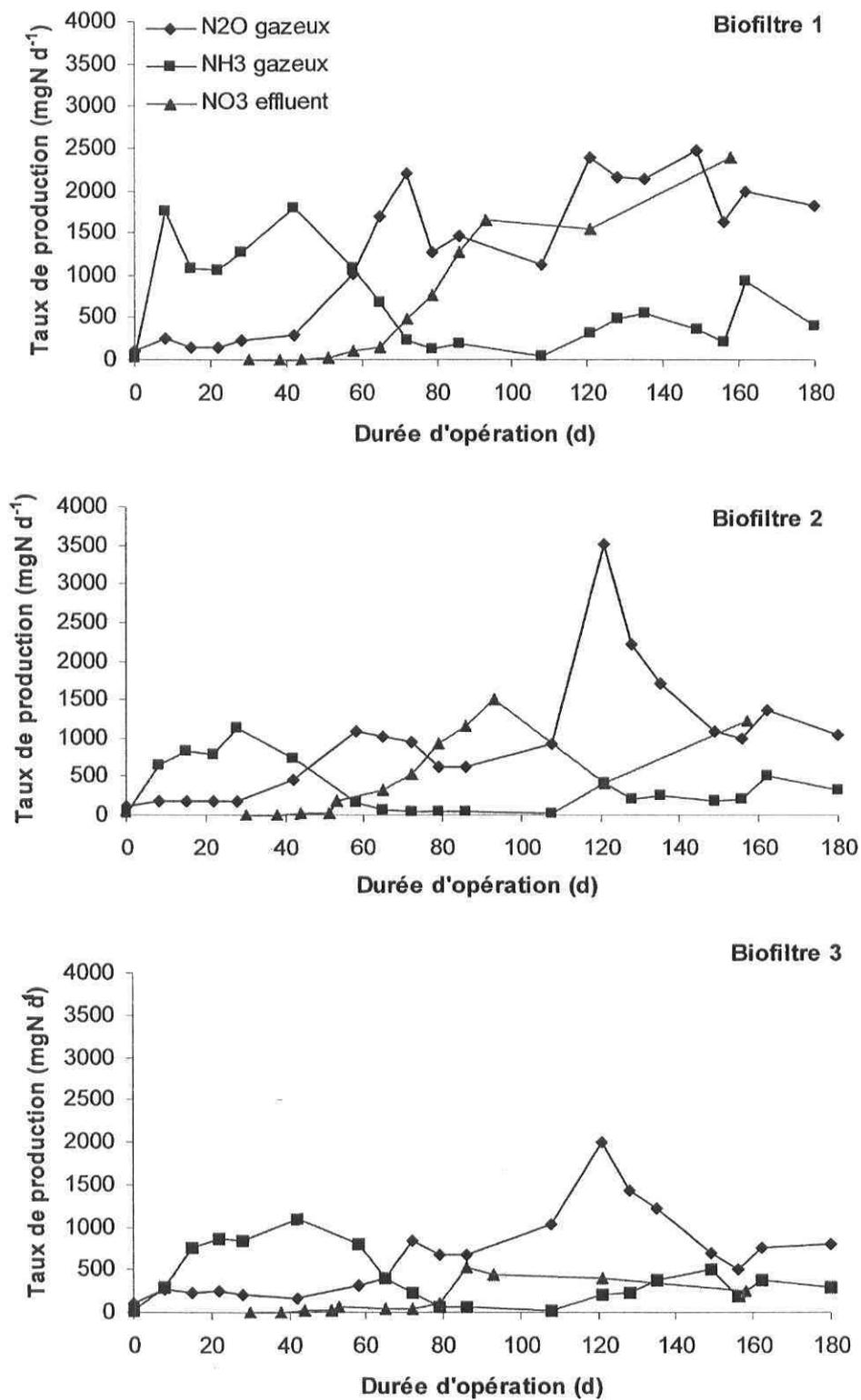


Figure 4.5. Taux de sortie de  $\text{NO}_3^-$  dans l'effluent liquide et taux de dégazage de  $\text{N}_2\text{O}$  et de  $\text{NH}_3$  par les biofiltres pilotes

### 4.3.2 Analyse de l'ensemble des résultats

Le suivi des biofiltres pilotes a été réalisé par l'analyse d'une multitude de paramètres, tant à l'intérieur même des colonnes que dans les affluents et effluents liquides et gazeux. De plus, l'évaluation des activités nitrifiantes et dénitrifiantes et la quantification par biologie moléculaire des microorganismes associés à ces activités ont été effectuées.

Toutes ces données ont été compilées et comparées entre elles afin d'y trouver des corrélations, des liens qui permettraient de décrire le comportement de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante dans ce procédé.

Pour chacune des couches, une comparaison a été effectuée entre les biofiltres pour la production des gaz et l'enlèvement des différents paramètres physico-chimiques. De plus, des profils de concentration ont été tracés à l'intérieur des biofiltres pour plusieurs éléments analysés et ce, à différentes périodes du suivi expérimental afin de suivre l'évolution de ceux-ci dans le système à un moment précis et d'observer la différence de profil entre les différents biofiltres.

Pour un même biofiltre pilote, la variation de production des différents gaz, aux différentes hauteurs, a également été utilisée afin de comprendre les changements observés dans le procédé concernant les performances des couches de milieu filtrant et la colonisation du milieu. Le même type d'analyses a été réalisé avec l'évolution des paramètres physico-chimiques (pH, DCO, COT, N-NTK, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, etc.).

Seuls les résultats considérés comme étant significatifs lors de ces analyses sont présentés dans les sections suivantes. Un résultat a été considéré significatif lorsqu'une corrélation entre deux paramètres précis pouvait être observée et lorsque la colonisation du procédé pouvait être décrite par la variation de l'un ou l'autre des paramètres. Ainsi, la plupart des données ou corrélation qui auraient pu sembler intéressantes ou possibles, mais qui ne sont pas décrites dans cette thèse, n'ont pas montré de relation, lien ou signification évidente ou particulière à la suite des analyses réalisées dans ce travail.

### **4.3.3 Dénombrement des microorganismes nitrifiants et dénitrifiants présents sur le milieu filtrant des biofiltres pilotes par PCR en temps réel**

La quantification des microorganismes impliqués dans la transformation biologique de l'azote a été réalisée par PCR en temps réel. Cette section du rapport présente un ensemble d'observations obtenues lors de ce projet, relatives à la quantification des microorganismes nitrifiants et dénitrifiants à l'aide de cette technique. Le suivi de la colonisation des biofiltres pilotes par ces bactéries est plutôt décrit dans les sections subséquentes du présent document.

#### **4.3.3.1 Relation entre le pourcentage de microorganismes visés par rapport à la biomasse totale et sa quantification absolue par PCR en temps réel**

Lors des essais de PCR en temps réel, en plus des bactéries reliées au cycle de l'azote, les microorganismes totaux ont également été quantifiés afin de réduire les biais reliés à l'extraction de l'ADN (Dionisi *et al.* 2003). Effectivement, la qualité de l'extraction des acides nucléiques d'un échantillon environnemental varie pour un même échantillon extrait en réplicats, et d'un essai à l'autre. Cela peut induire un biais important dans les données, particulièrement pour un milieu organique (LaMontagne *et al.* 2002). De plus, l'utilisation de trousse commerciales pour réaliser cette opération limite la quantité d'acides nucléiques pouvant être récoltée, car les colonnes d'extraction ne peuvent en retenir qu'une masse maximale. Dionisi *et al.* (2003) ont toutefois démontré que les trousse ne semblent pas être une cause du biais observé lors des extractions des acides nucléiques d'échantillons environnementaux.

En supposant que tous les génomes soient retenus dans la même proportion par la colonne et que le biais de chaque extraction s'applique à l'ensemble de la biomasse, il est possible de poser comme hypothèse que chaque microorganisme est représenté dans le génome total retenu selon le même pourcentage qu'il l'était dans la masse totale des acides nucléiques.

Si il existe une relation directe entre le pourcentage de présence d'un microorganisme par rapport à la biomasse totale et la valeur absolue de sa concentration, obtenue lors de la quantification par PCR en temps réel, on peut supposer que l'extraction a permis la récolte des acides nucléiques de cet organisme de façon proportionnelle à la biomasse totale. Cette

situation permettrait donc d'utiliser les valeurs absolues de dénombrement obtenues, tout en spécifiant que cette donnée sous-estime la valeur « vraie » à cause des possibles pertes en acides nucléiques tout au long des étapes d'extraction.

En observant la Figure 4.6, on peut noter qu'il existe une relation de puissance entre le nombre absolu et le pourcentage de chaque groupe de microorganismes suivi. En regardant d'un peu plus près, on remarque que la puissance avoisine 1, ce qui correspond à une relation quasi-linéaire entre ces deux paramètres. Le  $R^2$  élevé nous indique que la corrélation est très bonne, particulièrement pour le nombre de données utilisées pour vérifier cette statistique (se référer à l'annexe 3, A3.4 pour plus de détails).

Ces graphiques montrent que le logarithme du nombre de copies des gènes visés augmente proportionnellement avec leur pourcentage respectif dans l'ensemble des génomes bactériens extraits. Cela signifie que la perte d'acides nucléiques de chacun des microorganismes étudiés, lors des différentes étapes d'extraction, était proportionnelle à la perte reliée à l'ensemble de la biomasse. Ce résultat nous permet donc de supposer que, peu importe si le pourcentage par rapport à la biomasse totale ou la valeur absolue du nombre de copies du gène était utilisée afin de vérifier une relation avec un autre paramètre, les résultats obtenus montreraient sensiblement la même tendance. Ainsi, afin de faciliter la visualisation lors de l'analyse de ces résultats, les valeurs absolues seront utilisées.

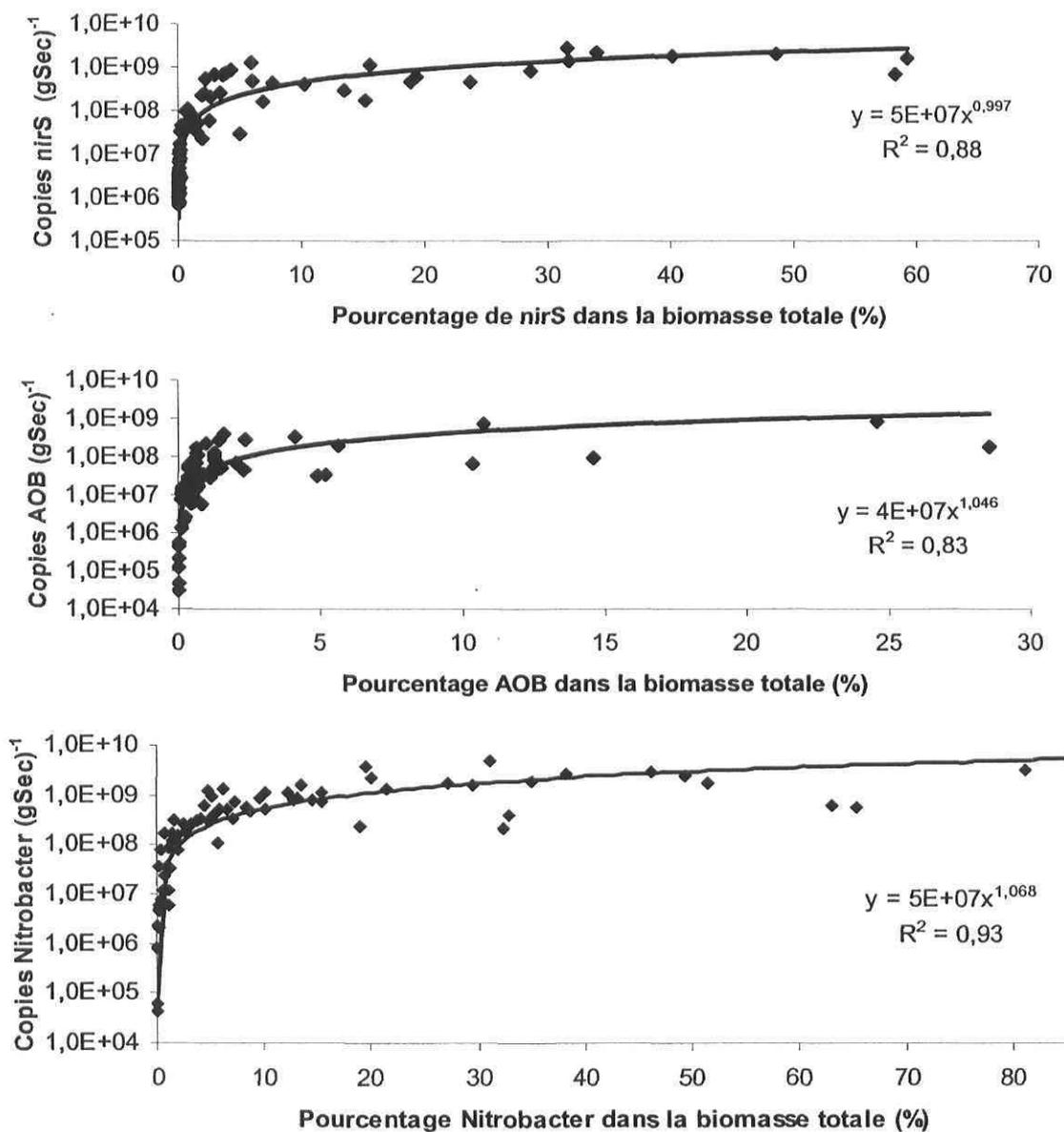


Figure 4.6. Relation entre le pourcentage de *nirS*, de AOB et de *Nitrobacter* et leur dénombrement absolu dans l'ADN génomique extrait du milieu filtrant de tous les biofiltres pilotes confondus

Finalement, on peut voir dans cette figure que la proportion du nombre de copies de *nirS* et de l'ADNr 16S de *Nitrobacter* atteint respectivement 60 et 80% de l'ensemble de la biomasse dans certains échantillons, tandis que les AOB ne dépassent pas 30% de la biomasse totale. Ce résultat suggère que les bactéries dénitrifiantes et les nitrifiantes sont généralement en nombre supérieur aux bactéries oxydant l'ammoniaque dans ce procédé. Il

est important de noter que le nombre de copies d'un gène donné varie d'une espèce à l'autre et d'un groupe à l'autre. Les valeurs obtenues suite à la quantification correspondent donc au nombre de copies du gène ciblé d'un échantillon environnemental. Les données montrent ainsi un indice de la variation de la population ciblée et non sa quantité réelle. À cet effet, tel qu'expliqué précédemment, le biais relié à l'extraction de l'ADN ne permet pas une quantification réelle du gène. Pour l'ADNr 16S, une banque de données sur l'Internet permet d'obtenir une moyenne du nombre de copies de ce gène pour certains groupes bactériens (Klappenbach *et al.* 2001). Le Tableau 4-6 montre le nombre moyen de copies par génome des gènes ciblés lors de cette étude.

Tableau 4-6. Nombre de copies des gènes dans le génome des microorganismes visés

Gène / Groupe	Nombre de copies dans le génome d'une bactérie	Références
ADNr 16S / Totaux	4,1	Klappenbach <i>et al.</i> 2001
	3,6	Harms <i>et al.</i> 2003
ADNr 16S / <i>Nitrobacter</i>	1	Degrange et Bardin 1995
ADNr 16S / <i>Nitrospira</i>	1	Harms <i>et al.</i> 2003
ADNr 16S / AOB	1	Klappenbach <i>et al.</i> 2001
<i>nirS</i> / Dénitrifiants	1	Grüntzig <i>et al.</i> 2001

#### 4.3.3.2 Limites de la quantification par PCR en temps réel

Il est reconnu que l'utilisation des nouvelles techniques de biologie moléculaire pour la quantification des microorganismes permet une approximation plus représentative du nombre que les méthodes culturales (Wagner *et al.* 1993; Degrange et Bardin 1995; Heid *et al.* 1996; Michotey *et al.* 2000; Konuma *et al.* 2001). Cependant, les valeurs obtenues constituent encore une sous-estimation de la quantité réelle. En effet, la conception des amorces utilisées pour l'amplification spécifique des gènes ciblés repose sur la disponibilité des séquences d'acides nucléiques reliées aux microorganismes ou aux groupes visés. Au moment où ces oligonucléotides sont créés, il est plus que probable que les séquences retrouvées dans les banques de données ne représentent qu'une portion de l'ensemble des

espèces et sous-espèces pouvant exister dans l'environnement. Beaucoup de travail reste encore à accomplir afin de caractériser le génome de l'ensemble du monde bactérien. À partir du moment où ce fait est connu, il est plus facile de saisir pourquoi la quantification de certains groupes bactériens ne permet pas toujours d'interpréter ou de comprendre correctement certains comportements observés.

De plus, il est possible que certains microorganismes encore inconnus aujourd'hui contribuent de façon significative à une activité quelconque dans un échantillon environnemental. N'étant pas encore caractérisés, il n'est donc pas envisageable pour l'instant de les quantifier ou même d'identifier leur présence dans un échantillon.

#### 4.3.3.3 Quantification de *Nitrospira*

Tel que démontré à l'annexe 4 (A4.3), on peut voir que le seuil limite de détection des gènes par PCR en temps réel durant cette étude était de  $9,3E04$  copies (g Sec)<sup>-1</sup> pour la pouzzolane et de  $4,2E05$  copies (g Sec)<sup>-1</sup> pour le milieu filtrant organique. Aucun échantillon de milieu filtrant n'a montré de concentration supérieure à ces seuils pour *Nitrospira* dans les biofiltres pilotes et de ce fait, cet organisme n'a pu être identifié ou quantifié. Dans le but de vérifier si une quantité plus faible de gènes était présente et que la réaction d'amplification avait bien lieu, différentes avenues ont été empruntées:

- Le vecteur utilisé a été séquencé pour s'assurer que ce dernier contenait effectivement un insert provenant de *Nitrospira*. Cette séquence a ensuite été comparée à celles disponibles sur Genbank, tel que décrit à la section 2.2.1. Cette comparaison a permis de constater que les amorces permettaient effectivement d'amplifier une portion de l'ADNr 16S de *Nitrospira* et que l'insert provenait effectivement de ce microorganisme.
- Lors des essais préliminaires, tel que décrit à la section 2.2.2, des extraits d'ADN environnementaux provenant des colonnes d'enrichissement ont été soumis à la réaction de PCR en temps réel. Il a été possible d'observer pour ces échantillons que la quantité de *Nitrospira* était suffisante pour la détection et la quantification de ce microorganisme. La provenance des extraits ainsi que les amorces ne pouvaient donc pas être mises en cause étant donné l'efficacité de ces dernières à amplifier

l'insert présent dans le vecteur ainsi que de l'ADNr 16S d'échantillons environnementaux.

- Un PCR en temps réel a donc été réalisé sur certains extraits d'ADN non dilués provenant des biofiltres pilotes. La dilution avait pour objectif de réduire la quantité d'inhibiteurs, favorisant ainsi l'amplification. Les essais préliminaires (section 2.2.3) ont cependant démontré que dans certains cas, il était possible d'amplifier un extrait moins dilué d'acides nucléiques provenant d'échantillons de milieu filtrant. Ainsi, un PCR réalisé sur un extrait non dilué permettait de réduire le seuil de détection de deux unités logarithmiques. Tous les échantillons testés ont été amplifiés seuls en plus d'être ajoutés à  $10^6$  copies de l'étalon, afin de vérifier que la présence d'inhibiteurs ne diminuait pas l'efficacité de la réaction. En moyenne, environ un cycle supplémentaire était nécessaire pour l'amplification de l'étalon en présence de l'échantillon environnemental. À la suite de ces essais, nous avons constaté que les extraits non dilués contenaient un nombre maximal de copies tout près du seuil minimal de détection ( $9,3E02$  copies (g Sec)<sup>-1</sup> du gène pour la pouzzolane et de  $4,2E03$  copies (g Sec)<sup>-1</sup> pour le milieu filtrant organique), ce qui ne nous a finalement pas permis de quantifier *Nitrospira* dans nos échantillons.

De façon surprenante, *Nitrospira* a pu être détecté dans un environnement favorisant majoritairement la croissance des microorganismes dénitrifiants et n'a pu être observé dans les biofiltres pilotes aérés. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer ce phénomène. Premièrement, le substrat alimentant les biofiltres d'enrichissement durant les essais préliminaires contenait une charge carbonée beaucoup plus faible que les biofiltres pilotes et une petite quantité de  $NH_4^+$ , sous forme de  $(NH_4)Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  et de  $NH_4HCO_3$ . De plus, quoique aucune aération mécanique n'ait permis un apport d'air important dans les biofiltres d'enrichissement, une aération passive a pu acheminer l'oxygène nécessaire à la croissance de bactéries aérobies. Toutes ces conditions ont pu favoriser la croissance de *Nitrospira* dans ces biofiltres, tandis que celles rencontrées dans les biofiltres pilotes ont pu réduire significativement son développement, par exemple à cause de la compétition avec la biomasse hétérotrophe pour l'espace et l'oxygène. La durée d'opération beaucoup plus longue des colonnes d'enrichissement (1 an) par rapport aux biofiltres pilotes (180 jours) a

également pu favoriser l'implantation à long terme de *Nitrospira*. Finalement, des travaux récents ont démontré que *Nitrospira* est plus sensible que *Nitrobacter* à de fortes concentrations en ammoniacque libre (free ammonia) (Blackburne 2006). La très haute concentration en ammoniacque de l'affluent des biofiltres pilotes pourrait donc expliquer la très faible quantité de *Nitrospira* retrouvée dans ceux-ci.

On a longtemps cru que *Nitrobacter* était le microorganisme nitrifiant le plus commun dans les sols et les procédés de traitement des eaux (Belser 1979; Atlas et Bartha 1998). Cependant, certaines études récentes, appliquant de nouvelles techniques en biologie moléculaire, ont montré que *Nitrospira* était celui retrouvé en plus grand nombre dans les procédés conventionnels de traitement des eaux usées domestiques à biomasse fixée (Schramm *et al.* 1998; Daims *et al.*, 2000) et à boues activées (Juretschko *et al.* 1998).

On a retrouvé des concentrations d'ADNr 16S appartenant à *Nitrobacter* variant entre  $1,0E05$  et  $3,0E09$  copies (g Sec)<sup>-1</sup>. Étant donné que *Nitrospira* n'a pu être détecté dans les échantillons environnementaux lors de ce projet ( $< 4,2E03$  copies (g Sec)<sup>-1</sup>), les résultats obtenus semblent démontrer que la quantité de *Nitrospira* était inférieure à celle de *Nitrobacter* dans tous les échantillons des biofiltres pilotes testés. Ceci montre donc que les conditions d'opération et le type de procédé peuvent influencer la colonisation du système par les différents groupes bactériens, les biofiltres pilotes de ce projet permettant une croissance dominante de *Nitrobacter* par rapport à *Nitrospira*.

#### **4.3.4 Colonisation verticale des couches de milieu filtrant**

Une caractérisation microbiologique a été réalisée sur les biofiltres pilotes par l'évaluation des activités observée et potentielles, nitrifiante et dénitrifiante, de chacune des couches et par la quantification à l'aide de la biologie moléculaire de cette biomasse. Ces mesures ont permis d'observer la colonisation des différentes couches de milieu filtrant, tant organique qu'inorganique, par les microorganismes nitrifiants et dénitrifiants.

Afin d'alléger le texte et les explications, seules les données concernant le biofiltre 2 seront présentées dans cette section, puisque ce dernier représente les conditions présentement rencontrées sur le terrain pour un lisier traité de façon physico-chimique. Seules les

situations où des résultats particuliers ont été obtenus pour les autres biofiltres seront décrites. Dans tous les autres cas, le comportement des autres biofiltres a montré les mêmes tendances que le biofiltre 2 pour les couches étudiées.

On peut voir aux Figure 4.7 et Figure 4.8 la colonisation de quatre couches du biofiltre 2, respectivement par les nitrifiants et les dénitrifiants, évaluée par l'activité potentielle. Les résultats obtenus montrent que la biomasse s'installe principalement dans la couche de pouzzolane et de façon beaucoup plus importante que dans les couches plus profondes. Des résultats semblables ont déjà été observés ailleurs (Schramm *et al.* 1999; Persson *et al.* 2002; Chaudhary *et al.* 2003). Ceci s'explique essentiellement par la diminution graduelle mais très rapide de la concentration en substrat, sur la hauteur du biofiltre, à cause de la biodégradation de ceux-ci, permettant ainsi la formation de niches écologiques en fonction de la hauteur du procédé (Figure 4.9).

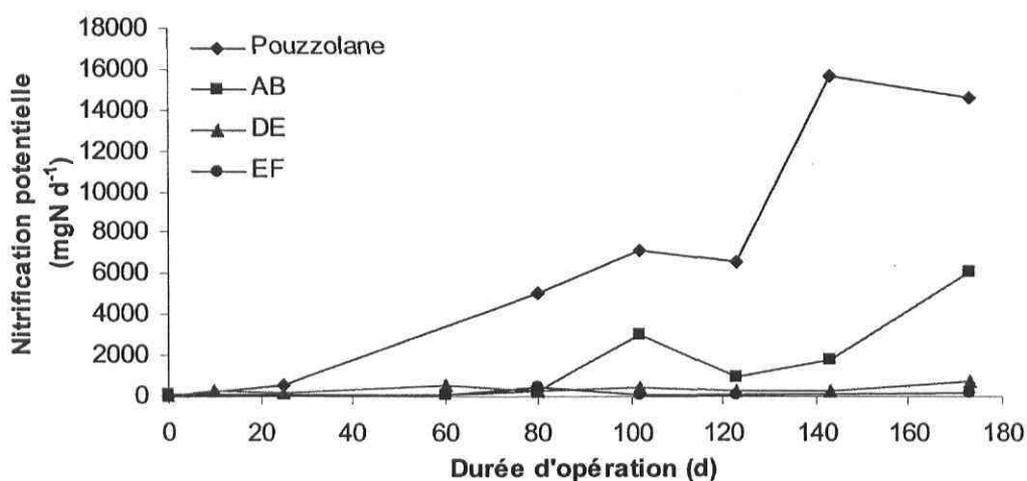


Figure 4.7. Activité nitrifiante potentielle dans les couches du biofiltre 2

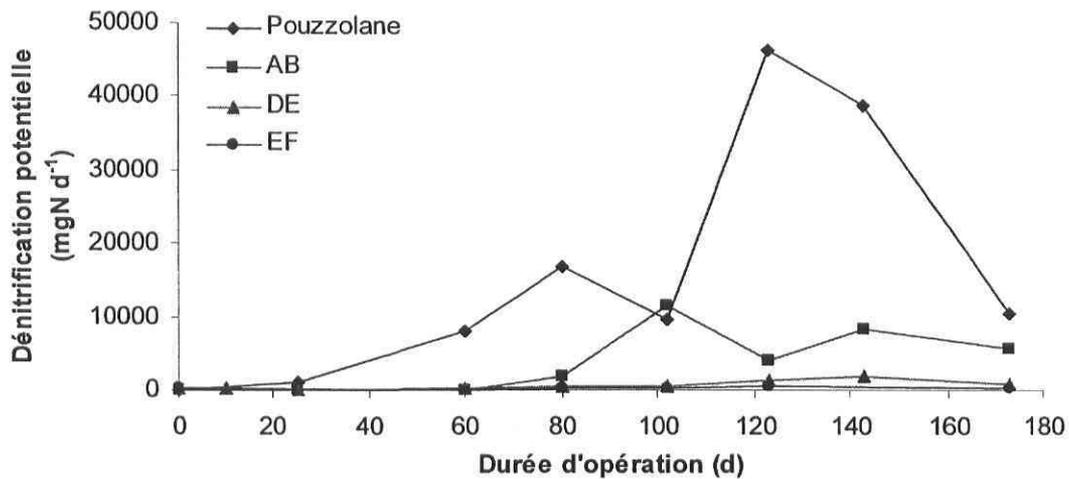


Figure 4.8. Activité dénitrifiante potentielle dans les couches du biofiltre 2

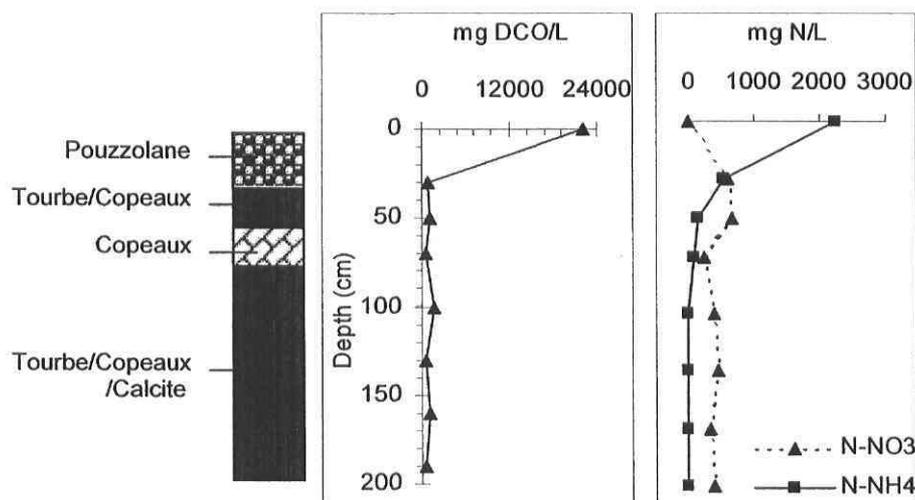


Figure 4.9. Profil de concentration de la DCO et de l'azote soluble dans les couches du biofiltre 2 au 140<sup>e</sup> jour d'opération

De façon générale, les microorganismes possédant le gène *nirS* montrent également cette tendance à diminuer avec la profondeur (Figure 4.10). Étant des microorganismes hétérotrophes et le substrat carboné diminuant graduellement, il est probable que la colonisation du milieu filtrant par ces bactéries suive ce gradient. Ce phénomène a également été noté pour les deux autres biofiltres. À notre connaissance, c'est la première fois qu'une stratification des microorganismes contenant le gène *nirS* a pu être observée

dans un procédé de traitement des eaux, à partir d'une quantification utilisant les techniques de biologie moléculaire.

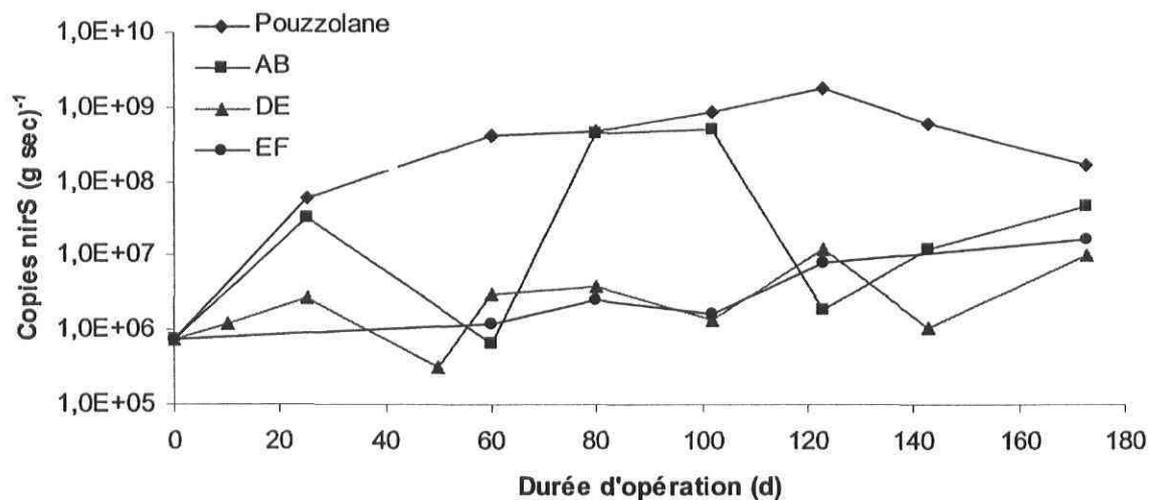


Figure 4.10. Quantité de gènes *nirS* dans les couches du biofiltre 2

Lorsqu'on regarde la distribution de *Nitrobacter* dans le biofiltre, on peut remarquer que la quantité par masse sèche est moins importante dans la pouzzolane que dans les autres couches (Figure 4.11). Cependant, il est tout de même possible d'observer un gradient dans les couches plus profondes, la concentration la plus élevée se retrouvant dans la couche AB. Lorsque l'on observe les données dans leur ensemble, on retrouve pour tous les biofiltres cette même constatation. Ceci signifie que les microorganismes nitrifiants n'ont pu s'établir de façon aussi importante dans la couche de pouzzolane que dans les couches plus profondes. Ce phénomène est probablement causé par une compétition pour la niche écologique, trop féroce dans la pouzzolane. Le même constat a pu être réalisé pour les microorganismes nitritants (AOB) et concorde avec les résultats obtenus par Persson *et al.* (2002). En effet, leur nombre s'est avéré être plus élevé dans la couche AB que dans la couche de pouzzolane, pour ensuite montrer un gradient de colonisation, qui est toutefois moins clair que pour *Nitrobacter*.

Les AOB et *Nitrobacter* ne sont que deux microorganismes nitrifiants parmi un ensemble de bactéries capables d'accomplir la nitrification. Ainsi, ce n'est pas parce que ceux-ci sont en moins grand nombre dans la couche de pouzzolane, que l'activité potentielle doit

nécessairement être moins élevée dans cette section du biofiltre. Il est possible que d'autres microorganismes nitrifiants, non caractérisés durant cette étude, puisse participer à la nitrification et permettre au potentiel nitrifiant d'atteindre des sommets dans la couche de pouzzolane.

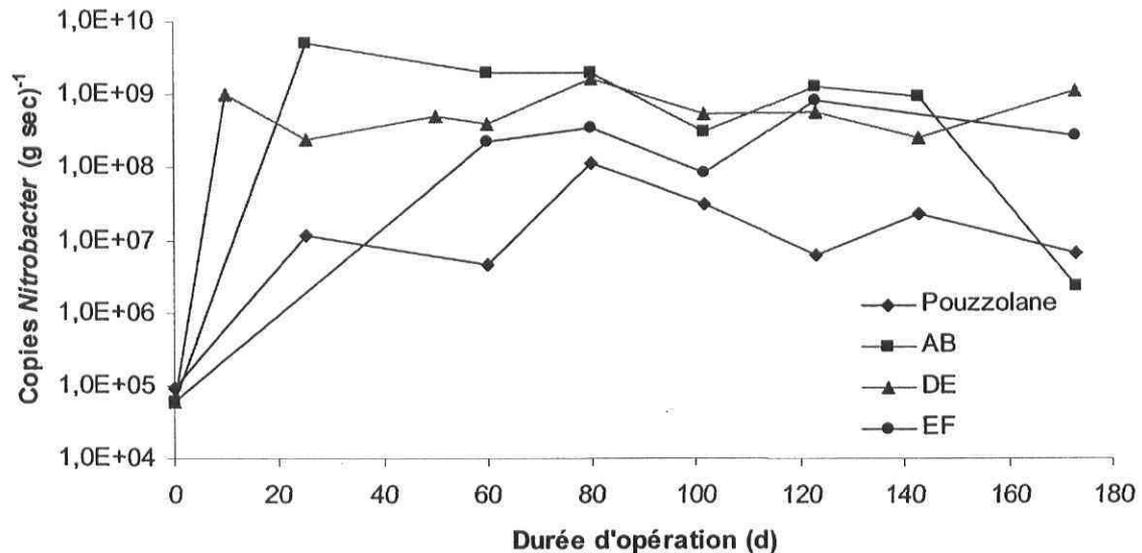


Figure 4.11. Quantité du gène ADNr 16S de *Nitrobacter* dans les couches du biofiltre 2

De plus, il faut se souvenir que ces données sont présentées sur une base de masse sèche. Étant donné que la pouzzolane a une masse volumique beaucoup plus importante que le milieu filtrant organique, la comparaison est plutôt difficile dans la situation où on retrouve justement moins de microorganismes dans cette couche. Effectivement, la masse volumique de la pouzzolane était environ de  $330 \text{ g sec L}^{-1}$  et celle du milieu filtrant approximativement de  $50 \text{ g sec L}^{-1}$ . Toutefois, lorsqu'on compare avec les organismes hétérotrophes possédant le gène *nirS*, qui subissent eux aussi l'effet de la masse volumique de ce support sur leur quantification, il est évident qu'on retrouve beaucoup moins de nitrifiantes dans la couche de pouzzolane que de bactéries hétérotrophes dénitrifiantes.

Finalement, la quantité de microorganismes dénitrifiants présents sur les particules de milieu filtrant, évaluée lors de ce projet, se démarque largement de caractérisations impliquant l'utilisation de méthodes culturales (Galvez et al. 2001). En effet, ces derniers n'ont pu observer plus de  $10^7$  dénitrifiantes par gramme de support inorganique dans un

biofiltre submergé, alimenté avec un effluent urbain, soit environ 2 ordres de grandeur de moins que ce qui a été obtenu ici. Évidemment, la comparaison est plutôt difficile, étant donné les différents effluents utilisés, mais l'ordre de grandeur entre les comptes totaux et la quantification par biologie moléculaire reste tout de même important.

#### 4.3.5 Relation entre les activités potentielle et observée

Dans le but de vérifier si la biomasse présente sur les particules de milieu filtrant avait la capacité de transformer plus d'azote que ce qui était observé, donc s'il y avait place à l'optimisation, une comparaison des activités potentielles et observées a été réalisée. En effet, dans l'optique où la biomasse peut utiliser plus d'azote, son potentiel sera plus élevé que l'activité observée. Les Figure 4.12 et Figure 4.13 montrent les taux de dénitrification et de nitrification potentiels, évalués respectivement par respirométrie azotée et par blocage à l'acétylène, et les taux de dénitrification et nitrification observés, évalués par bilan de masse sur l'azote, tel que décrit précédemment. Ces taux ont été calculés en additionnant l'activité de l'ensemble des couches grossières, de façon à obtenir l'activité globale de cette portion du procédé. On peut voir que dans les couches grossières du biofiltre 2, l'activité potentielle est beaucoup plus élevée que ce qui peut être observé dans le procédé.

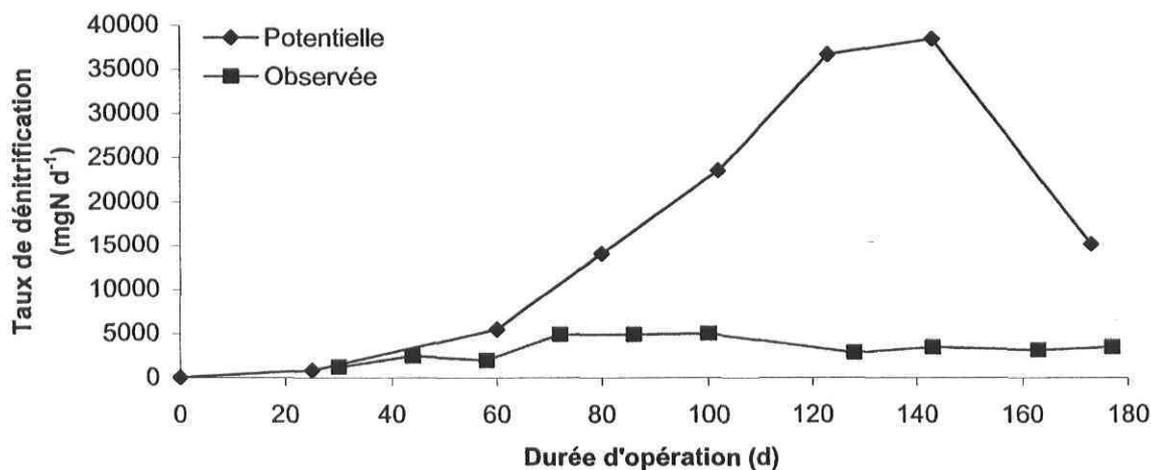


Figure 4.12. Comparaison de l'activité dénitrifiante potentielle et observée dans la couche grossière du biofiltre 2

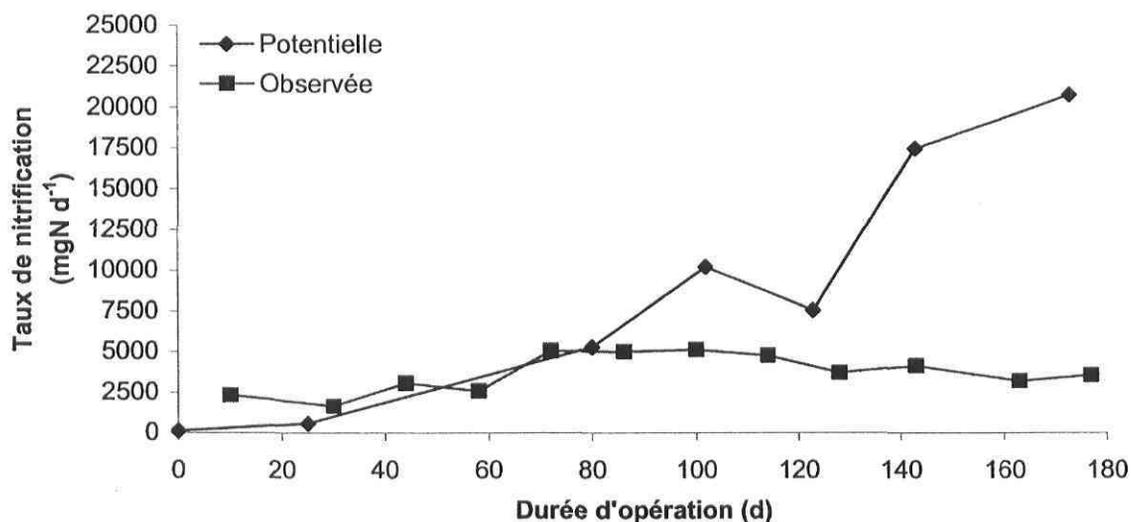


Figure 4.13. Comparaison de l'activité nitrifiante potentielle et observée dans la couche grossière du biofiltre 2

Lorsqu'on fait le même exercice avec les couches de milieu filtrant organique, on remarque exactement le même phénomène. Pour les deux autres biofiltres, alimentés à des ratios C:N différents, le potentiel est également beaucoup plus élevé que l'activité observée. Cela signifie que, peu importe les conditions d'opération et où l'on regarde dans le procédé, la biomasse a toujours un potentiel plus important à transformer l'azote que ce qui est réalisé par les biofiltres pilotes.

Indirectement, ce résultat laisse croire que la biomasse impliquée dans la transformation de ce nutriment n'est jamais dans des conditions entièrement favorables dans le biofiltre pour atteindre son activité maximale ou que celle-ci pourrait recevoir une quantité plus importante de substrat. Pour la nitrification, puisque le  $\text{NH}_4^+$  est pratiquement tout utilisé, la seconde explication pourrait s'y appliquer. Cependant, pour la même raison, le  $\text{NH}_4^+$  dans les biofiltres est limitant pour la croissance des microorganismes nitrifiants, ce qui signifie que le potentiel ne devrait théoriquement pas dépasser l'activité nitrifiante observée. L'accroissement de ce potentiel au-delà de l'activité observée peut s'expliquer par l'utilisation, par la biomasse nitrifiante, de  $\text{NH}_4^+$  adsorbé sur les particules de milieu filtrant ou sur le biofilm. De cette façon, le nombre de microorganismes nitrifiants peut dépasser la quantité « permise » par la charge azotée de l'affluent appliquée sur le procédé. De plus, une biomasse soumise à une charge en substrat limitante peut très bien se maintenir, et

donc utiliser une faible concentration en substrat pour supporter son métabolisme de base, pour ensuite offrir une productivité accrue lorsqu'exposée à une plus grande concentration de substrat.

Pour la dénitrification, on retrouve une présence résiduelle en nitrate à l'effluent liquide des biofiltres, ce qui indique que les microorganismes dénitrifiants n'ont pu réduire complètement ce composé en azote atmosphérique. Ce phénomène peut être expliqué par des conditions non favorables dans les biofiltres pour l'accomplissement de ce processus métabolique, probablement causé par un manque de carbone dans les couches profondes et/ou par des conditions insuffisamment anoxiques dans le procédé.

Il faut cependant noter que le potentiel obtenu lors des essais dépend essentiellement des conditions d'opération auxquelles ont été soumis les microorganismes. Il faudra donc être prudent lors de la modification d'un paramètre d'opération du procédé. En effet, en favorisant ainsi l'activité des bactéries dénitrifiantes dans l'une ou l'autre des couches, cela pourrait changer complètement la façon dont le procédé se colonise et un potentiel entièrement différent pourrait y correspondre.

#### **4.3.6 Relation entre la nitrification et la dénitrification dans les biofiltres pilotes**

L'existence d'une nitrification et dénitrification simultanée (NDS) dans un procédé peut être expliquée par la présence concomitante de sites aérobies et de zones anoxiques ou d'un biofilm suffisamment épais pour permettre la croissance rapprochée d'organismes nitrifiants et dénitrifiants (Pochana et Keller 1999). De plus, par définition, ce phénomène implique que le  $\text{NH}_4^+$  nitrifié soit immédiatement transformé en azote gazeux par la dénitrification. Ainsi, dans une situation où la NDS est présente, il devrait exister une relation étroite entre les activités nitrifiantes et dénitrifiantes dans le procédé.

Ce lien a été vérifié dans les biofiltres pilotes en mettant en relation les résultats obtenus concernant la nitrification et la dénitrification. Les bilans réalisés sur l'azote ont permis de calculer l'activité nitrifiante et dénitrifiante observée reliée à chacune des couches, tandis que les taux de nitrification et de dénitrification potentiels ont également été évalués à

différentes hauteurs. Les données ont ensuite été regroupées en 4 catégories, selon la façon dont elles avaient été obtenues et la provenance des échantillons testés:

- Observée – couches grossières;
- Potentielle – couches grossières;
- Observée – couches organiques;
- Potentielle – couches organiques.

Pour chacune des catégories, l'activité nitrifiante a été mise en relation avec l'activité dénitrifiante afin d'observer le lien qui pouvait exister entre les deux. La Figure 4.14 montre la corrélation entre les activités observées nitrifiante et dénitrifiante dans le milieu filtrant grossier, toutes couches confondues. On remarque qu'il existe une relation presque directe des activités, signifiant que tout l'azote nitrifié est aussitôt transformé en azote gazeux dans cette partie des biofiltres pilotes. La quantité importante de biofilm ainsi que son épaisseur, dans les couches supérieures, fournissent probablement les conditions anoxiques nécessaires à la dénitrification tout en permettant au métabolisme aérobie des organismes nitrifiants de s'effectuer en surface. De plus, la cheminée d'évacuation, tel que décrit à la section 4.2.1.1, a permis une déviation d'une fraction de l'aération, ce qui a favorisé le maintien de conditions plus favorables à la croissance et à l'activité des bactéries dénitrifiantes dans les couches de surface tout en apportant l'oxygène nécessaire à l'oxydation de l'ammoniaque.

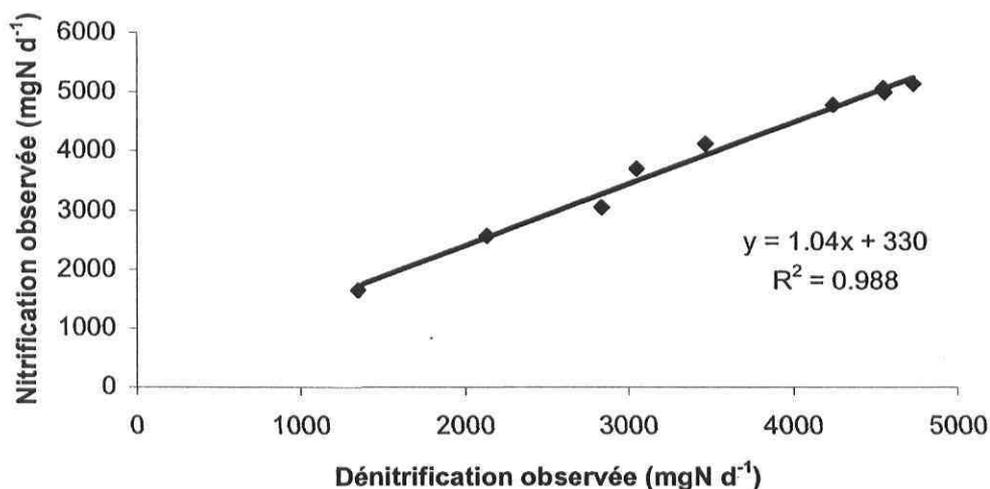


Figure 4.14. Relation entre la nitrification et la dénitrification observée dans les couches grossières du biofiltre 2

La Figure 4.15 montre la relation entre les activités potentielles nitrifiantes et dénitrifiantes dans le milieu filtrant grossier. On remarque que le lien entre les activités potentielles est toutefois beaucoup moins évident dans ces couches que pour les activités observées. En effet, il n'y a statistiquement pas de relation linéaire ( $p < 0,05$ ) entre les données. Contrairement à l'activité dénitrifiante observée, qui est régulée par le métabolisme anoxie ayant réellement cours dans le procédé, le potentiel dénitrifiant est plutôt modulé par le nombre de microorganismes dénitrifiants. Étant donné que ces bactéries sont hétérotrophes aérobies facultatifs, leur croissance, et donc leur nombre, est fonction tant de la biodégradation aérobie que de la respiration du nitrate. Ainsi, leur activité potentielle (indirectement leur quantité) ne peut être reliée directement à la production de nitrate par les microorganismes nitrifiants, ce qui explique l'absence de corrélation entre l'activité nitrifiante et dénitrifiante potentielle.

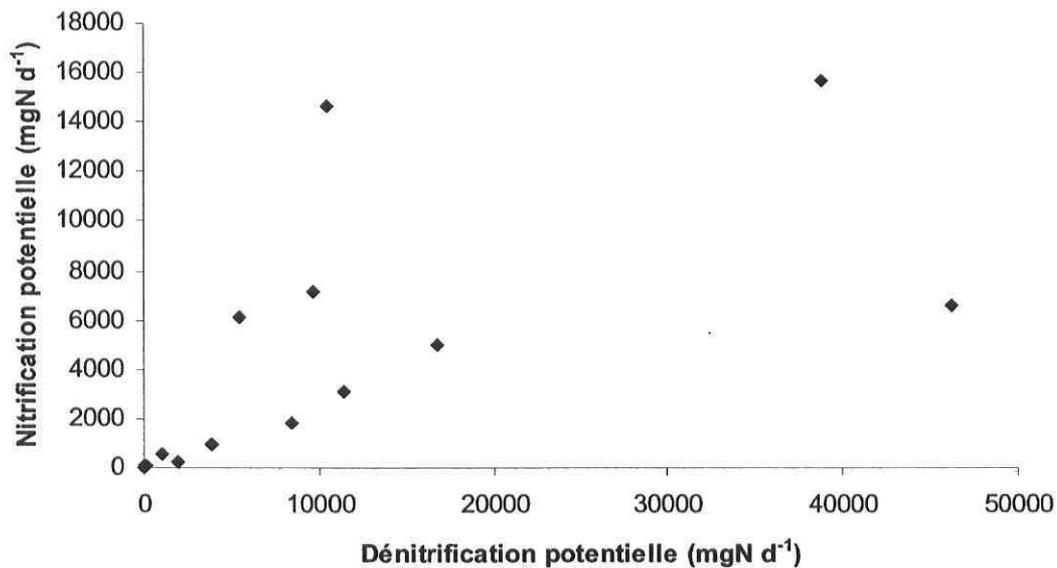


Figure 4.15. Relation entre l'activité nitrifiante et dénitrifiante potentielle dans les couches grossières du biofiltre 2

La Figure 4.16 montre la corrélation entre les activités observées nitrifiante et dénitrifiante dans le milieu filtrant organique, toutes couches confondues. La relation obtenue montre un accroissement de la dénitrification observée plus rapide que pour la nitrification observée. Cependant, l'azote doit généralement être d'abord nitrifié avant d'être transformé en gaz. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'estimation grossière de quelques paramètres (assimilation et adsorption) lors du calcul des bilans sur l'azote, qui a pu biaiser les résultats obtenus. En effet, contrairement à la couche de pouzzolane, le milieu filtrant organique a une capacité d'adsorption très importante de l'azote ammoniacal qui a pu influencer de façon significative les bilans de masse sur l'azote. Ainsi, puisque ces paramètres n'ont pu être évalués précisément au cours de ce projet, l'activité nitrifiante et dénitrifiante observée dans ce projet n'est qu'un ordre de grandeur de ce qui se passe réellement dans le procédé.

Toutefois, une relation positive entre les deux paramètres semble statistiquement exister, tant dans les couches grossières que dans les couches de milieu filtrant organique, supportant l'hypothèse que les deux types de microorganismes croissent à proximité l'un de l'autre dans ce type de procédé.

Garzón (2001) a tenté d'estimer la quantité de  $\text{NH}_4^+$  absorbé et adsorbé par le milieu filtrant organique. Malheureusement, les conditions sous lesquelles les essais ont été réalisés ne permettent pas d'utiliser les données obtenues pour les appliquer sur les biofiltres de ce projet et nous avons donc supposé que ce mécanisme d'enlèvement était nul après la période de démarrage (> 30 jours). De plus, le mélange de milieu filtrant testé par Garzón (2001) était légèrement différent de celui utilisé ici.

La Figure 4.17 montre la relation entre les activités potentielles nitrifiantes et dénitrifiantes dans le milieu filtrant organique, toutes couches confondues. Encore une fois, on peut voir que le lien entre les activités potentielles est beaucoup moins évident dans ces couches que pour les activités observées. En effet, il n'y a statistiquement pas de relation linéaire ( $p < 0,05$ ) entre ces données. Pour les mêmes raisons, la croissance des microorganismes hétérotrophes dénitrifiants tant en conditions aérobies qu'anoxie est responsable de cette absence de lien entre la nitrification et la dénitrification potentielle.

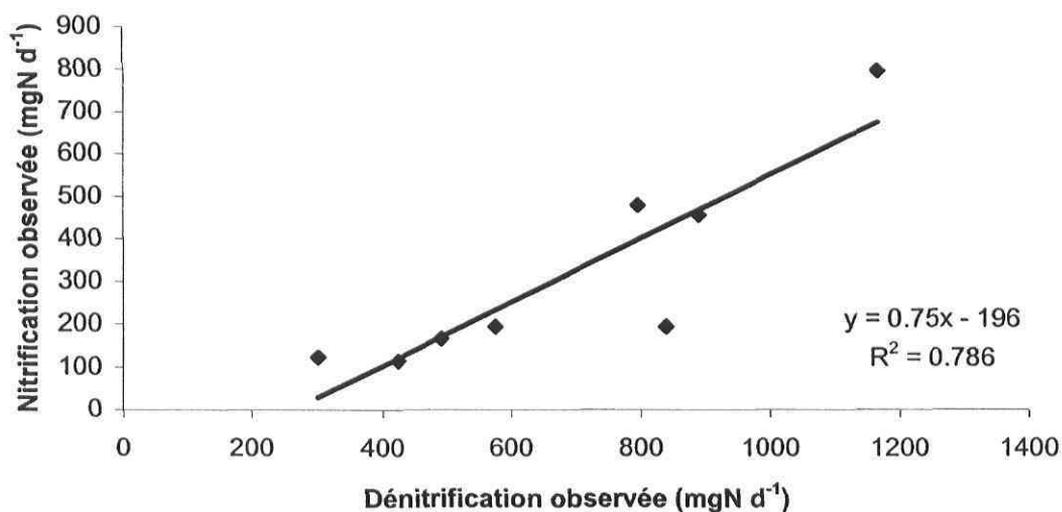


Figure 4.16. Relation entre la nitrification et la dénitrification observée dans les couches de milieu filtrant organique du biofiltre 2

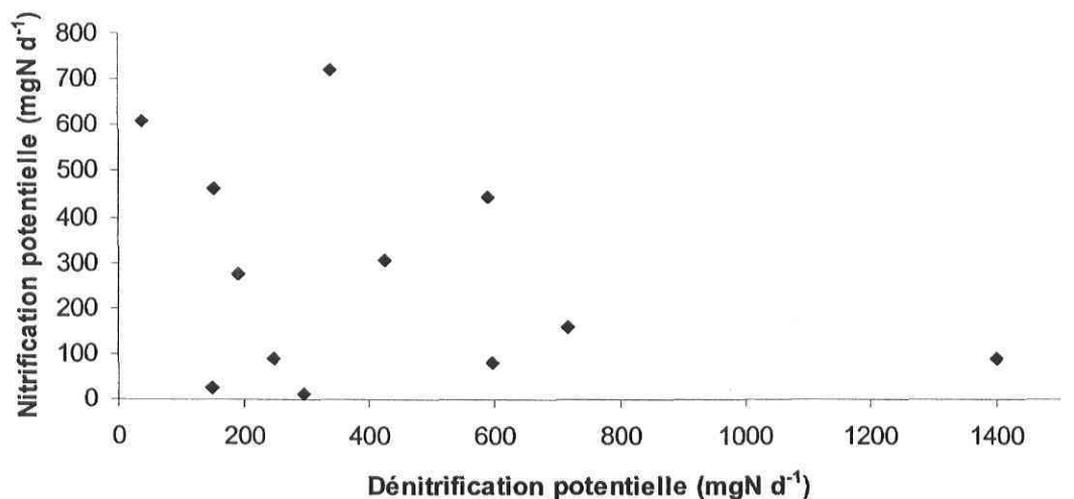


Figure 4.17. Relation entre l'activité nitrifiante et dénitrifiante potentielle dans les couches de milieu filtrant organique du biofiltre 2

#### 4.3.7 Relation entre la quantité de microorganismes évaluée par PCR en temps réel et leur activité potentielle

Le dénombrement des microorganismes par PCR en temps réel a permis d'observer la variation du nombre de *Nitrobacter*, des AOB et des bactéries dénitrifiantes possédant le gène *nirS* dans les systèmes de biofiltration. En parallèle, l'activité potentielle nitrifiante et dénitrifiante a indirectement permis l'évaluation de la quantité de ces bactéries, car ces essais créaient des conditions environnementales favorables à leur activité. En continuant sur cette réflexion, on peut s'imaginer que la variation du nombre d'individus d'un groupe bactérien donné devrait approximativement suivre les changements associés à son activité potentielle propre, puisque les deux décrivent à leur façon le même paramètre.

Pour vérifier cette hypothèse, l'évolution du nombre de copies d'un gène ciblé et la variation de l'activité potentielle associée au microorganisme étudié en fonction du temps sont présentées aux Figure 4.18, Figure 4.19 et Figure 4.20. Le nombre de microorganismes nitrifiants (*Nitrobacter* et AOB) a été mis en relation avec le taux de nitrification potentiel tandis que la quantité du gène *nirS* a évidemment été relié au taux de dénitrification potentiel. Tel que décrit précédemment à la section 4.3.2, la quantité de *Nitrospira* n'était pas suffisamment importante pour qu'on puisse en faire l'analyse.

Les cas présentés dans ces figures représentent les situations où la tendance était la plus évidente. Cependant, dans l'ensemble des couches de tous les biofiltres pilotes, la relation entre les paramètres ressemble à ce qui est montré ici. Une analyse statistique alliant le "test du coefficient de corrélation" (Annexe A3.4) et le "test de Pearson" (Annexe A3.6) a permis de statuer sur la dépendance linéaire des données entre elles pour l'ensemble des résultats.

On peut observer que le nombre de microorganismes dénitrifiants possédant le gène *nirS* suit l'évolution de l'activité dénitrifiante potentielle (Figure 4.18). Ceci suggère fortement que ce groupe de bactéries est largement responsable de la transformation des nitrates en azote gazeux. Lorsque ces deux paramètres sont mis en relation ( $\log_{10}(\textit{nirS})$  et  $\log_{10}(\text{activité potentielle})$ ), on observe une dépendance positive linéaire entre les deux (Coefficient de Pearson  $n = 87$ ;  $r_{xy} = 0,7$ ;  $\alpha = 0,05$ ). Cette corrélation démontre et confirme que la colonisation du biofiltre par ces microorganismes est bien décrite par l'activité potentielle, évaluée par le blocage à l'acétylène. À notre connaissance, c'est la première fois que le nombre de microorganismes dénitrifiants, évalué par PCR en temps réel, est mis en relation avec son activité potentielle et que celle-ci s'avère positive.

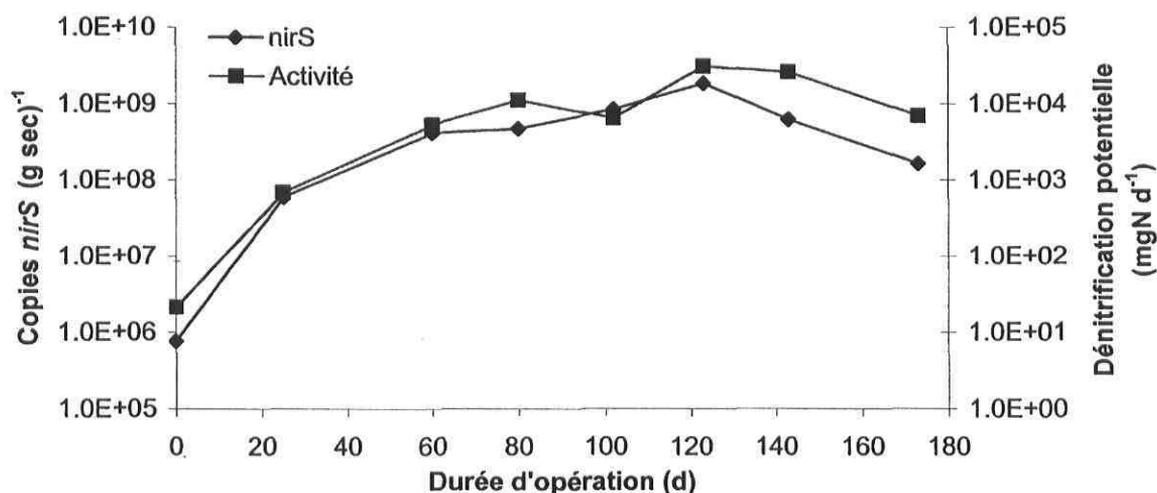


Figure 4.18. Évolution de l'activité dénitrifiante potentielle et le nombre de copies du gène *nirS* dans la couche de pouzzolane du biofiltre 2

Évidemment, la caractérisation du second groupe impliqué dans cette activité, les microorganismes possédant le gène *nirK*, aurait amené des informations complémentaires. Cependant, pour les raisons décrites à la section 2.2.1 de cette thèse, ce travail s'est limité à la caractérisation d'un seul groupe, ceux possédant le gène *nirS*, censé représenter entre deux tiers et trois quarts de l'ensemble des bactéries dénitrifiantes (Knowles 1982; Jetten *et al.* 1997; Braker *et al.* 1998; Hochstein et Tomlinson 1998; Richardson et Watmough 1999; Michotey *et al.* 2000).

La Figure 4.19 permet de voir que le nombre de *Nitrobacter* ne semble pas suivre l'évolution de l'activité nitrifiante potentielle. Ceci suggère que ce groupe de bactéries n'est pas entièrement responsable de la nitrification ou du moins, ne contribue pas suffisamment à cette activité dans le respiromètre pour influencer le potentiel. Lorsque ces deux paramètres sont mis en relation linéaire, ceux-ci semblent indépendants, à un seuil de signification  $\alpha = 0,05$  (Coefficient de Pearson  $n = 89$ ,  $r_{xy} = 0,1$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Cette absence de corrélation linéaire démontre que la colonisation du biofiltre par ces microorganismes ne peut être bien décrite par l'activité potentielle, évaluée par respirométrie azotée.

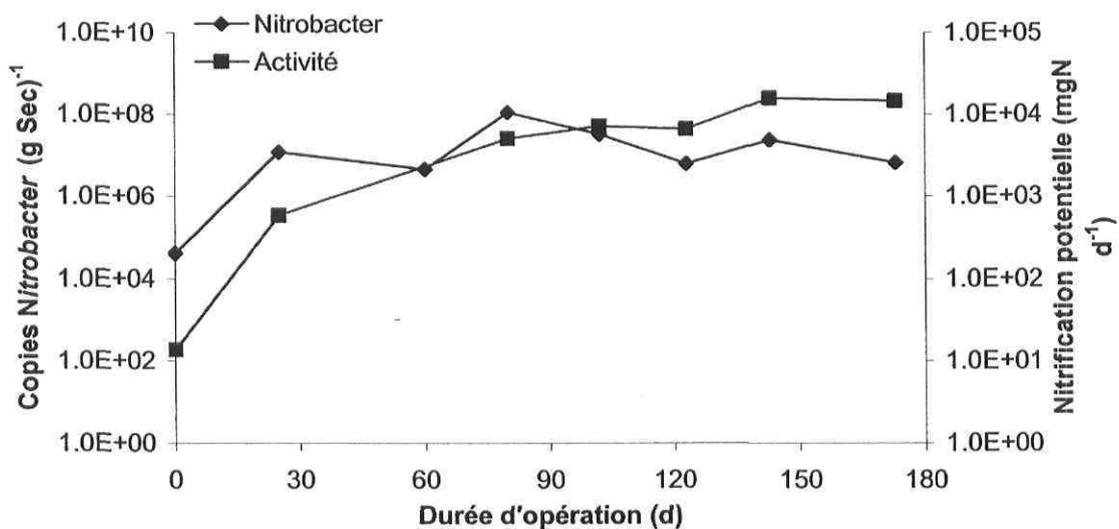


Figure 4.19. Évolution de l'activité nitrifiante potentielle et le nombre de copies de l'ADNr 16S de *Nitrobacter* dans la couche de pouzzolane du biofiltre 2

La Figure 4.20 permet d'observer que le nombre d'AOB ne semble pas suivre l'évolution de l'activité nitrifiante potentielle. Encore une fois, ceci suggère que ce groupe de bactéries

ne contribue suffisamment à la nitrification pour influencer l'activité potentielle. Les autres couches des biofiltres pilotes montrent tous cette tendance. Lorsque ces deux paramètres sont mis en relation afin de vérifier cette hypothèse (Figure 4.20), les résultats montrent que les données sont statistiquement indépendantes (Coefficient de Pearson  $n = 89$ ,  $r_{xy} = 0,1$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Cette absence de corrélation linéaire démontre que la colonisation du biofiltre par ces microorganismes n'est pas très bien décrite par l'activité potentielle, évaluée par respirométrie azotée.

On remarque que la relation linéaire entre ces paramètres, pour les bactéries nitrifiantes, n'est pas aussi étroite, et même absente, que pour les organismes dénitrifiants. Plusieurs raisons peuvent expliquer ceci:

- La biologie moléculaire est une science récente et est constamment en développement. Les amorces utilisées pour les organismes nitrifiants ont été conçues pour amplifier les gènes du plus large éventail connu de bactéries. Cependant, ces amorces ne vont peut-être pas chercher certains microorganismes encore inconnus ou non séquencés aujourd'hui, mais contribuant de façon non négligeable à l'activité nitrifiante. De plus, tel qu'expliqué à la section 4.3.2.1, l'extraction de l'ADN est une étape cruciale lors de la quantification par PCR en temps réel. Il est possible que la variabilité entre les extractions des acides nucléiques des échantillons expérimentaux explique en partie que l'activité potentielle nitrifiante et que le nombre de microorganismes ne soient pas corrélés.
- Lors de ce projet, il s'est avéré que le nombre de *Nitrospira* était en quantité insuffisante pour être caractérisée. Toutefois, même si ces microorganismes étaient en faible concentration dans le milieu filtrant, leur activité contribue peut-être de façon importante à la nitrification. De plus, tel que décrit à la section 4.3.2, le nombre de *Nitrobacter* était, de façon surprenante, plus important que *Nitrospira*. Plusieurs vérifications ont été réalisées afin de s'assurer que la méthode d'amplification était adéquate et que le gène visé était celui recherché; tout semblait en ordre. Cela laisse donc peu de place à cette hypothèse.

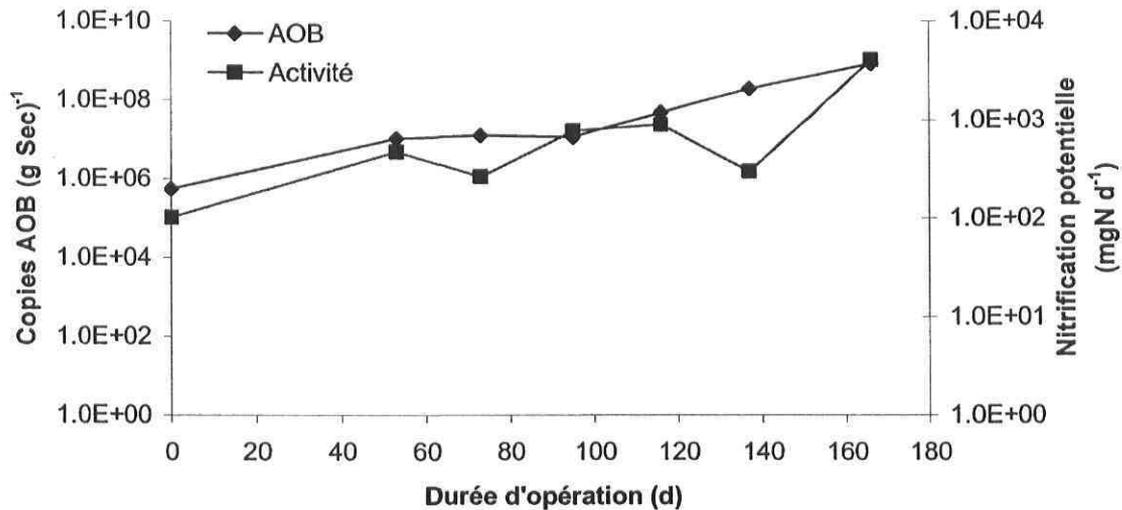


Figure 4.20. Évolution de l'activité nitrifiante potentielle et le nombre de copies de l'ADNr 16S des AOB dans la couche AB du biofiltre 1

Il faut toutefois noter que la nitrification est un processus qui dépend de l'activité de plusieurs groupes de microorganismes. Ainsi, la respirométrie n'est peut-être pas en mesure de décrire le comportement individuel de chacun d'entre eux, mais l'est plutôt pour évaluer l'activité de l'ensemble de ces groupes; ce qui expliquerait que l'activité potentielle nitrifiante ne décrit pas bien l'évolution individuelle des AOB et de *Nitrobacter*. Finalement, il est possible de remarquer aux Figure 4.19, Figure 4.20 et Figure 4.27 que l'activité potentielle augmente durant toute la durée du suivi, ce qui semble un comportement normal pour l'ensemble des groupes de bactéries nitrifiantes, en contact constant avec une forte charge en substrat azoté.

#### 4.3.8 Effet du rapport $DBO_5:NTK$ sur la transformation de l'azote

Lors de ce projet, trois biofiltres pilotes ont été alimentés avec des lisiers ayant un ratio C:N différent tout en conservant tous les autres paramètres similaires entre eux. Ceci avait pour objectif de comparer la colonisation du milieu filtrant par les microorganismes nitrifiants et dénitrifiants sous différentes conditions. Les sections suivantes comparent de façon générale les biofiltres au niveau des performances épuratoires et de la colonisation par la biomasse de l'azote.

#### 4.3.8.1 Performances générales des biofiltres pilotes alimentés sous trois conditions de DBO<sub>5</sub>:NTK

En général, les trois biofiltres ont démontré des performances similaires, tant du point de vue de l'enlèvement du carbone que de l'azote. De plus, peu importe le biofiltre, en additionnant le potentiel dénitrifiant de chacune des couches afin d'obtenir le potentiel global du procédé pour l'enlèvement de l'azote, on obtient des valeurs avoisinant  $100 \text{ gN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Cette valeur correspond à l'ordre de grandeur obtenu pour des lits ruisselants traitant des effluents municipaux, dédiés à la dénitrification (Dorias et Baumann 1994). Par contre, elles sont beaucoup plus faibles que pour d'autres procédés où des taux d'enlèvement de  $1 \text{ kgN-NO}_3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  sont aisément atteints lors de la dénitrification d'effluents urbains (Mateju *et al.* 1992).

Pour la production des gaz, on observe une légère hausse de la concentration autour du jour 110, période correspondant au ré-étalonnage de l'analyseur (Figure 4.21). Pour des raisons inexplicables, ce dernier a fourni des résultats légèrement au dessus de ceux attendus, particulièrement pour le  $\text{NH}_3$ . Effectivement, on peut noter un accroissement non négligeable de la concentration en ammoniacque à l'entrée des biofiltres qui ne devrait normalement pas s'y trouver. De plus, la quantité de  $\text{N}_2\text{O}$  a également augmenté pour lentement reprendre celle observée avant ces événements. Toutefois, cette période correspond également au moment où les cheminées d'évacuation des couches BC ont été ouvertes de façon permanente. Il n'y a évidemment aucun lien avec l'augmentation observée à l'entrée pour le  $\text{NH}_3$ , mais cela pourrait expliquer celle retrouvée à la sortie gazeuse des biofiltres.

En effet, la diminution de l'aération dans la couche grossière, causée par une déviation de l'air par la cheminée d'évacuation, a pu promouvoir la dénitrification par les autotrophes en manque d'oxygène. Pochana *et al.* (1999) ont observé que près de 90% du  $\text{N}_2\text{O}$  produit dans un réacteur à disques biologiques rotatifs provenait des autotrophes placés dans des conditions de croissance défavorables. De plus, il est possible que les conditions soient devenues un peu plus réductrices dans cette couche, favorisant ainsi la dénitrification et, du même coup, la production de  $\text{N}_2\text{O}$  par la dénitrification incomplète (Zumft 1997).

Dans l'ensemble, on voit à la Figure 4.21 que plus il y a d'azote ammoniacal dans l'alimentation liquide, plus la quantité de  $\text{NH}_3$  dégazé est importante durant la période de

démarrage. En effet, la concentration à l'effluent gazeux dépasse 500 ppm en  $\text{NH}_3$  chez le biofiltre 1 ( $3100 \text{ mgN L}^{-1}$ ) et atteint 330 ppm et 300 ppm respectivement chez le biofiltre 2 ( $2200 \text{ mgN L}^{-1}$ ) et le biofiltre 3 ( $1500 \text{ mgN L}^{-1}$ ). Pour un même taux d'aération appliqué sur tous les biofiltres, il était prévisible d'obtenir ce type de résultats, car la pression partielle de  $\text{NH}_3$  gazeux est fonction de la concentration en ammoniacque dans la solution d'alimentation. Ainsi, à conditions égales, plus l'ammoniacque est concentrée dans la phase aqueuse, plus elle aura tendance à se dégazer et à sortir dans l'aération.

Il ne semble pas y avoir de différence entre les biofiltres au niveau de la production de  $\text{CO}_2$ . En effet, quoique la concentration de gaz augmente significativement à la sortie gazeuse du biofiltre 3 entre les jours 90 et 140, il n'est pas possible de tirer de conclusion par rapport à l'ensemble des données recueillies. Durant cette période, l'enlèvement de la DCO est demeuré relativement stable comparativement à la période précédente où celle-ci diminuait significativement. La chute de  $\text{CO}_2$  autour du 150<sup>e</sup> jour d'opération correspond à une perte d'efficacité au niveau de l'enlèvement de la DCO par le procédé (Figure 4.26), démontrant qu'à ce moment précis, un événement a nuit considérablement à l'activité de biodégradation hétérotrophe.

La diminution de la concentration en ammoniacque dégazé à l'effluent gazeux des biofiltres autour du jour 40 témoigne de l'apparition de la nitrification dans le procédé (Figure 4.21). Une concentration résiduelle de nitrite peut également être brièvement observée durant cette période, pour disparaître par la suite lors de l'apparition des nitrates à la sortie des biofiltres vers le 60<sup>e</sup> jour d'opération (Figure 4.23). On parle ici de concentration résiduelle en nitrite, car le bilan sur l'azote montre que, déjà à cette période, une proportion importante de l'azote nitrifié était transformée en azote gazeux par la dénitrification. De plus, la production de nitrite ne disparaît pas après le 60<sup>e</sup> jour, mais est plutôt pris en charge par la biomasse nitrifiante.

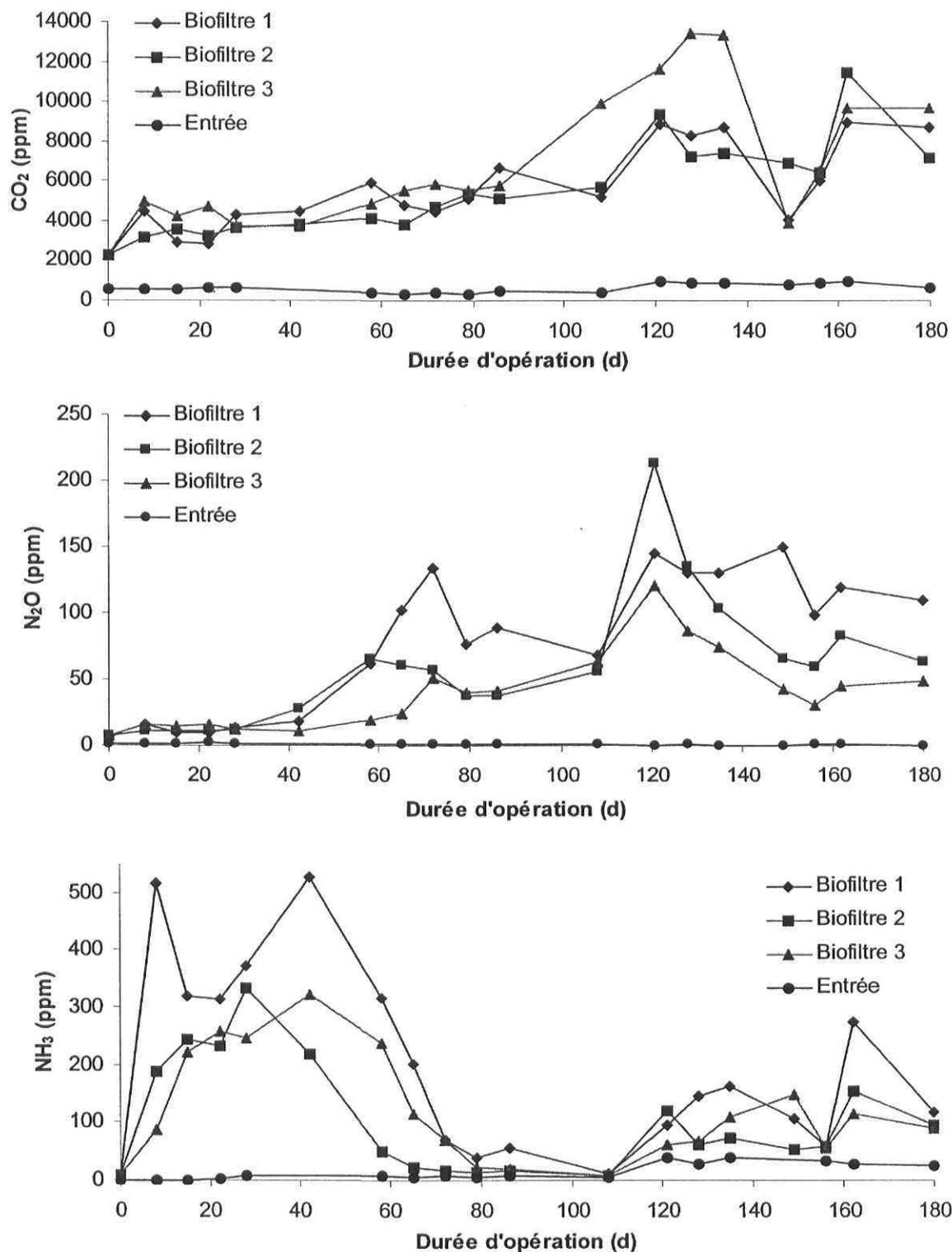


Figure 4.21. Variation de la concentration des gaz à la sortie principale de l'aération des biofiltres pilotes

À la Figure 4.22, on peut voir une légère augmentation de la concentration en azote ammoniacal à l'effluent des biofiltres vers le 40<sup>e</sup> jour d'opération pour les biofiltres 1 et 2. On pourrait expliquer ce pic chez les deux premiers biofiltres par la fin de la période de saturation par adsorption de ce composé sur les particules de milieu filtrant ainsi que par l'établissement de la biomasse nitrifiante. En effet, l'azote ammoniacal pouvant passer à travers le biofiltre, car n'étant plus retenu par le support organique, n'est pas encore entièrement nitrifié par les microorganismes en phase de colonisation du procédé. Il serait donc possible d'établir, selon ces résultats, que la biomasse nitrifiante n'est pas pleinement établie dans le biofiltre avant le 80<sup>e</sup> jour d'opération. En regardant attentivement l'évolution du N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> à la Figure 4.23, on peut observer une légère augmentation de la vitesse de production du nitrate autour des jours 70 à 80, venant appuyer cette hypothèse. La Figure 4.27 montre également une légère accélération de l'augmentation des activités nitrifiantes potentielles dans les couches grossières, vers le 80<sup>e</sup> jour d'opération.

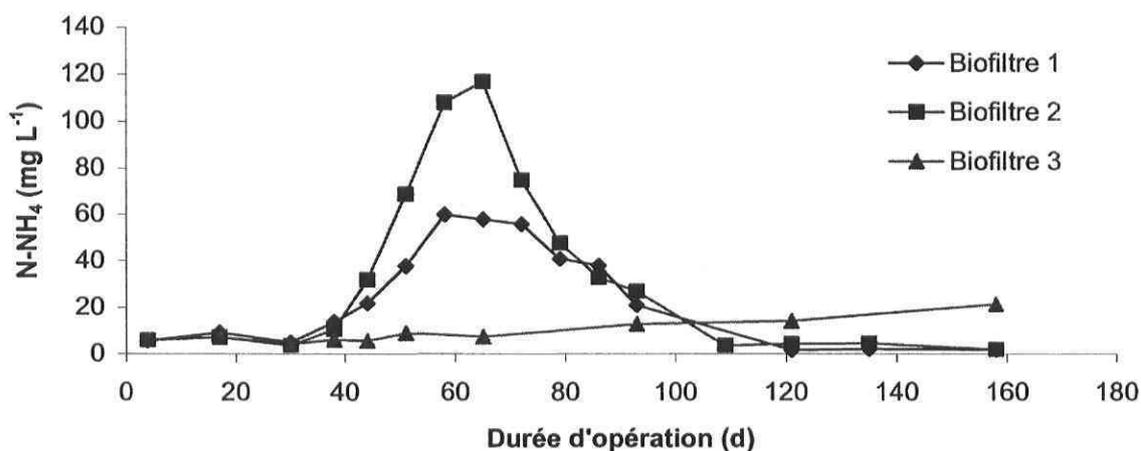


Figure 4.22. Évolution de l'azote ammoniacal à la sortie des biofiltres pilotes

Il est possible d'observer à la Figure 4.23 l'augmentation graduelle de la concentration en nitrate à l'effluent des biofiltres à partir du 40<sup>e</sup> jour d'opération et ce, jusqu'au 90<sup>e</sup> jour. À la suite de cette période, la quantité de nitrate à l'effluent reste quasi constante ou augmente beaucoup plus lentement. La Figure 4.28 montre que l'activité dénitrifiante potentielle des 3 biofiltres augmente justement plus rapidement durant cette période de transition.

La coupure drastique de la Figure 4.23 indique peut-être qu'il existe un seuil au-dessous duquel il n'y a pas suffisamment de microorganismes dénitrifiants pour prendre en charge l'augmentation des nitrates produits par les bactéries nitrifiantes ou que le biofilm est insuffisamment épais pour permettre une activité dénitrifiante optimale. Lorsque ce seuil critique est dépassé, la biomasse dénitrifiante pourrait ainsi croître de façon plus importante dans des conditions favorables à l'accomplissement de ce métabolisme anoxie, expliquant l'accroissement important de l'activité potentielle dénitrifiante autour des jours 90 à 100 (Figure 4.28). La diminution de leur activité potentielle autour du 150<sup>e</sup> jour d'opération pourrait s'expliquer par un accroissement de l'épaisseur du biofilm, empêchant le substrat d'atteindre la biomasse dénitrifiante. Celle-ci étant dans l'impossibilité de se nourrir, il est possible qu'elle meure et se décroche des particules de milieu filtrant. En supposant que ce processus s'accomplisse alternativement entre une croissance et une décroissance de moins en moins importante jusqu'à l'atteinte d'une concentration bactérienne « idéale », cela pourrait en partie expliquer l'apparence de cycle que certains auteurs ont obtenu lors du traitement de l'azote par ce type de procédé (Garzón 2001). Cette hypothèse pourrait également expliquer la diminution de la concentration en CO<sub>2</sub> à la sortie gazeuse des biofiltres au 150<sup>e</sup> jour d'opération (Figure 4.21). En effet, la biomasse dénitrifiante, qu'elle croisse en conditions aérobies ou anoxies, libère une quantité non négligeable de CO<sub>2</sub> (Grady *et al.* 1999). Leur mortalité amènerait donc nécessairement une diminution significative de la production de CO<sub>2</sub>.

On peut également voir à la Figure 4.23 que la quantité de nitrate produite diminue avec la quantité d'azote présent dans l'alimentation. En effet, le biofiltre 3 montre une production de nitrate beaucoup plus faible que les deux autres biofiltres. Il est probable qu'un rapport DBO<sub>5</sub> : NTK plus élevé favorise la dénitrification à cause de la quantité de carbone disponible plus importante. Il faut cependant noter que le potentiel à dénitrifier dans le biofiltre 3 semble un peu plus faible que pour les autres colonnes, après 80 jours d'opération (Figure 4.28), contredisant ainsi cette hypothèse. Il faut être prudent lors de l'analyse de ce type de résultats, car plusieurs facteurs influencent les différents processus de l'enlèvement de l'azote. Ainsi, il se peut que le biofiltre 3 favorise effectivement la dénitrification, mais la quantité d'azote de l'alimentation beaucoup plus faible ne permet pas de conclure de manière définitive. La normalisation de la production de nitrate avec la

concentration en  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de l'alimentation liquide permet de mieux évaluer l'influence du ratio  $\text{DBO}_5 : \text{NTK}$  (Figure 4.24).

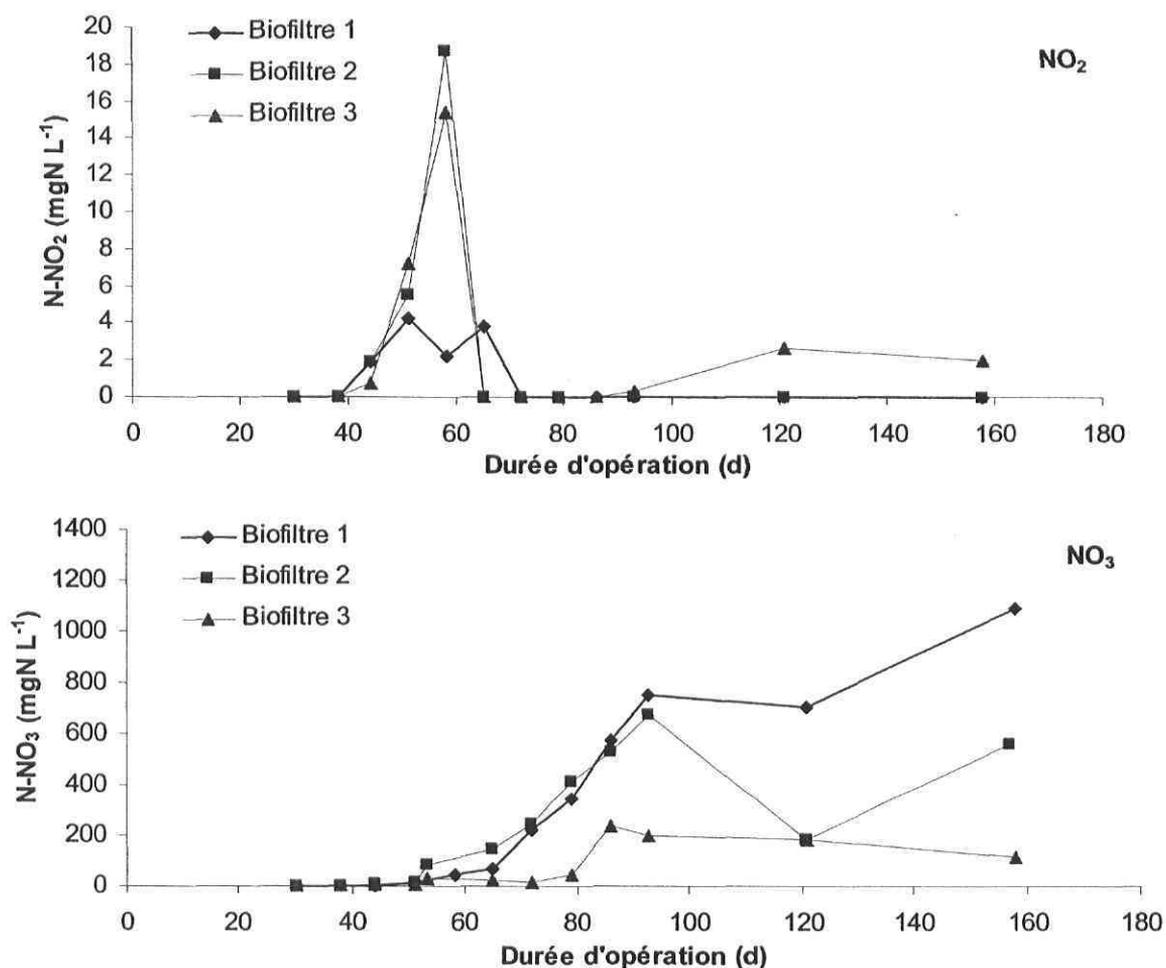


Figure 4.23. Évolution des formes oxydées de l'azote à la sortie des biofiltres pilotes

L'axe des ordonnées de la Figure 4.24 donne finalement la quantité de nitrate produite pour chaque milligramme de  $\text{N-NH}_4^+$  de la phase aqueuse qui entre dans le procédé. La portion d'azote entrant dans le procédé sous forme gazeuse a été négligée étant donné sa très faible concentration. Ces résultats permettent de constater que, quoique la concentration en azote à l'entrée soit plus faible, le biofiltre 3 est effectivement plus efficace à enlever ce dernier avec un maximum de 15% de l'azote ressortant sous forme de nitrate. Les courbes permettent de voir également que pour l'ensemble des biofiltres, peu importe le mécanisme, l'enlèvement est égal ou supérieur à 65% de l'azote qui entre. Cette supposition repose sur

le fait que la concentration en NTK est très faible à l'effluent comparativement à l'alimentation et que l'azote ammoniacal est pratiquement tout utilisé. Finalement, ce graphique montre grossièrement qu'après 90 jours, en moyenne et en omettant les variations importantes du biofiltre 2, plus le ratio  $DBO_5$ :NTK est élevé, plus l'efficacité de l'enlèvement de l'azote est importante.

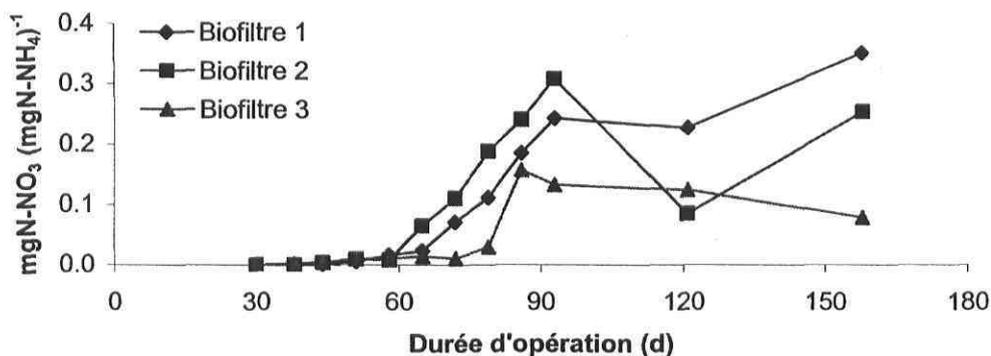


Figure 4.24. Production normalisée de  $N-NO_3$  mesurée à l'effluent liquide des biofiltres pilotes

Du côté du pH, aucune différence évidente n'a pu être notée à la sortie des biofiltres 1 et 2, tandis que, tel que décrit à la section 4.3.1, on peut observer une augmentation importante de ce paramètre à la sortie du biofiltre 3 (Figure 4.25). Le même phénomène a été obtenu pour l'enlèvement de la DCO par les biofiltres (Figure 4.26) et a également été discuté précédemment dans la même section.

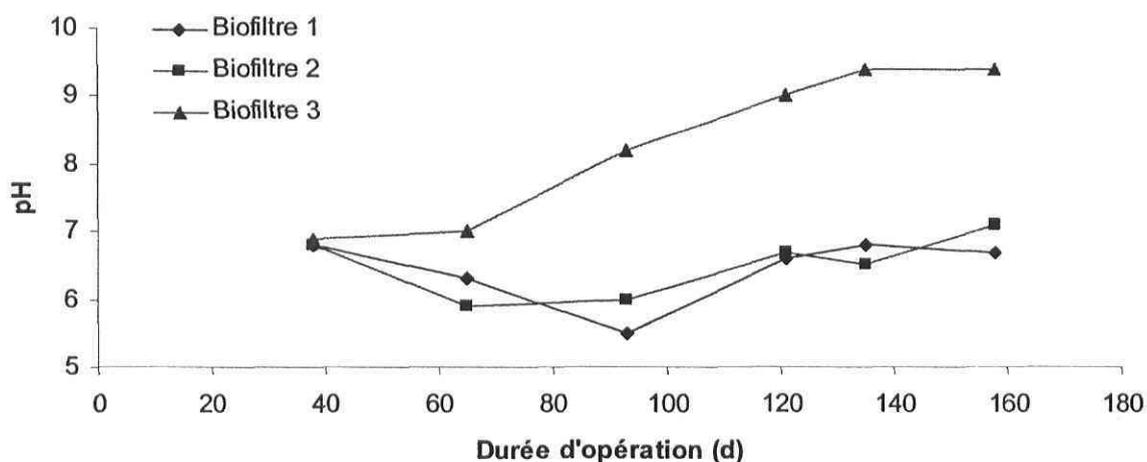


Figure 4.25. Évolution du pH à la sortie des biofiltres pilotes

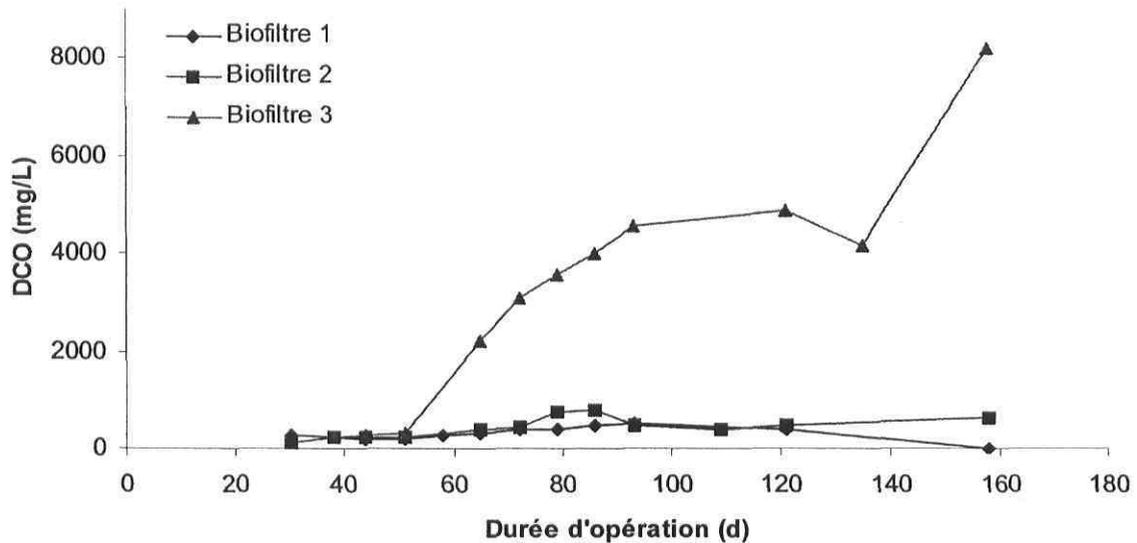


Figure 4.26. Évolution de la DCO à la sortie des biofiltres pilotes

#### 4.3.8.2 Effet du rapport $DBO_5:NTK$ sur l'activité nitrifiante et dénitrifiante

L'activité potentielle, tel qu'expliqué à plusieurs occasions dans ce rapport, représente indirectement la quantité de biomasse associée à cette activité. On peut ainsi, en comparant l'évolution de cette activité à l'intérieur de biofiltres opérés sous différentes conditions, comparer la colonisation de ces procédés. Un écart important entre deux activités potentielles constitue un indice que la colonisation est dissemblable et qu'un des biofiltres est moins colonisé ou moins actif que l'autre. Cela signifie également que le degré d'optimisation atteignable est différent et que les conditions d'opération constituent un facteur important influençant la colonisation.

On peut voir à la Figure 4.27 la variation de l'activité nitrifiante potentielle dans les couches grossières des trois biofiltres. Ce graphique représente bien ce qui a également été observé dans les autres couches de milieu filtrant pour cette activité. Les trois courbes montrent un accroissement dans le temps de la quantité de microorganismes nitrifiants dans ces couches, dès le début de la période de suivi, et s'accroissant autour des 30<sup>e</sup> à 40<sup>e</sup> jour d'opération. Les courbes montrent une très légère inflexion vers le haut autour du 80<sup>e</sup> jour. Les bactéries nitrifiantes semblent s'établir un peu plus tard dans le biofiltre 3 et montrer une variation dans le temps, la courbe oscillant de façon très importante.

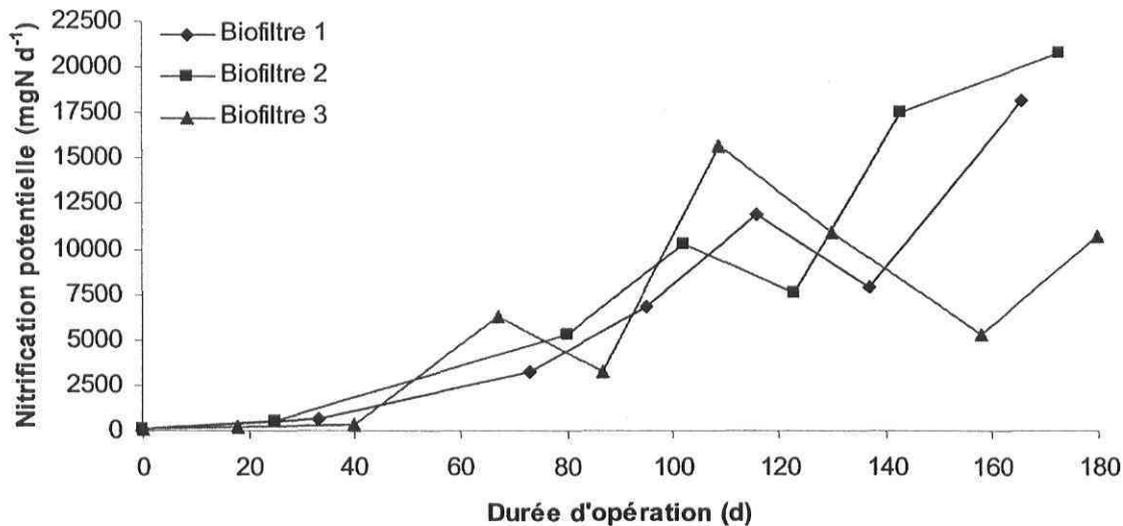


Figure 4.27. Activité nitrifiante potentielle dans les couches grossières des biofiltres pilotes évaluée par respirométrie

Évidemment, le fait de récolter la biomasse alternativement dans les mêmes points d'échantillonnage autour des biofiltres n'a probablement pas toujours permis aux microorganismes de recoloniser entièrement le milieu filtrant vierge de remplacement. Il se peut qu'à certains moments, des chemins préférentiels se soient formés dans les biofiltres, causant une croissance accrue ou diminuée en certains endroits, causée par les manipulations réalisées à l'intérieur des points d'échantillonnage. Ces événements pourraient expliquer en partie la variation observée au niveau des courbes de la Figure 4.27. Cependant, étant donné que les biofiltres 1 et 2 ne montrent pas une variation aussi importante que le biofiltre 3 et que la Figure 4.28 ne montre pas ce type d'instabilité pour la colonisation par les bactéries dénitrifiantes, il est probable que cette hypothèse n'explique pas entièrement ce qui est observé. Les conditions rencontrées dans le biofiltre 3 pourraient ne pas permettre une stabilité au niveau de la colonisation du procédé par les microorganismes nitrifiants. Le pH élevé retrouvé à l'effluent de ce biofiltre constitue probablement une partie de la réponse, ces bactéries étant très sensibles aux conditions environnementales. Cela pourrait également expliquer que, quoiqu'elles soient satisfaisantes, les performances au niveau de l'enlèvement de l'azote ammoniacal ne soit pas identiques dans le biofiltre 3 comparativement aux deux autres (Figure 4.22). Okabe *et al.* (1996) ont montré qu'un ratio C:N élevé retarde l'implantation des organismes nitrifiants dans le biofilm, spécialement les NOB, à cause de la compétition pour l'espace et

l'oxygène. De plus, Ballinger *et al.* (2002) ont observé une diminution de l'activité nitrifiante dans un réacteur nitrifiant et dénitrifiant alimenté à de forts ratios C:N. Ceci pourrait expliquer la difficulté à établir une biomasse stable dans le biofiltre 3 de ce projet de doctorat. Un échantillonnage plus fréquent du milieu filtrant du biofiltre 3 aurait permis de confirmer s'il s'agit effectivement d'une variation de la population ou seulement d'une imprécision sur la mesure.

La Figure 4.28 montre l'évolution de l'activité dénitrifiante potentielle des couches grossières pour les trois biofiltres. La croissance de ces microorganismes semble relativement stable durant les 80 premiers jours, puis augmente de façon significative jusqu'au 140<sup>e</sup> jour pour ensuite chuter drastiquement. Les biofiltres 1 et 2 montrent une colonisation similaire après 80 jours d'opération tandis que le biofiltre 3 affiche une activité potentielle significativement plus faible que les deux autres après 80 jours. Toutefois, malgré le fait que le potentiel de ce dernier soit plus faible, on retrouve quand même une efficacité plus élevée que pour les autres conditions d'opération pour l'enlèvement de l'azote (Figure 4.24). Probablement que la charge en azote ammoniacal de l'alimentation n'est pas suffisamment élevée pour que la différence d'activité potentielle se répercute sur les performances du procédé.

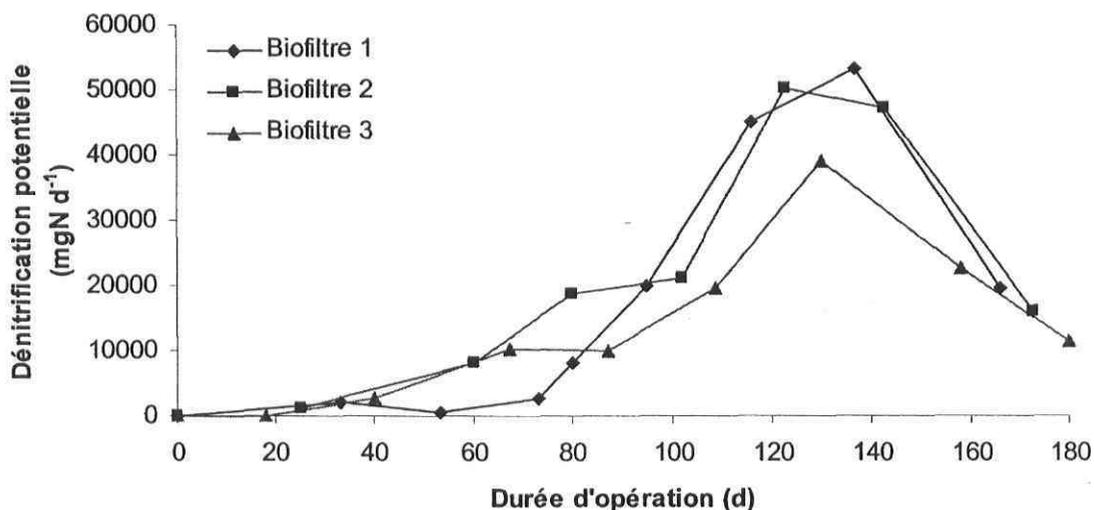


Figure 4.28. Activité dénitrifiante potentielle dans les couches grossières des biofiltres pilotes

La chute simultanée des activités au jour 140 est particulièrement difficile à expliquer, étant donné qu'aucun changement n'a été apporté au procédé à ce moment. La dernière modification concernait l'ouverture des cheminées d'évacuation autour du jour 110. Il est possible que la biomasse hétérotrophe dénitrifiante ne recevant plus d'oxygène, l'air étant évacué par les cheminées, puisse avoir également manqué de nitrate pour leur croissance, menant à une mortalité plus élevée. Cependant, l'enlèvement de la matière organique n'a pas été affecté par cette modification du système (Figure 4.26) et la nitrification a continué à se développer normalement (Figure 4.27), apportant ainsi le nitrate nécessaire à la croissance des bactéries dénitrifiantes. L'hypothèse d'un cycle de croissance-décroissance de la biomasse du cycle de l'azote, tel que décrit à la section 4.3.8.1, pourrait expliquer en partie cette diminution importante du potentiel dénitrifiant. Il est toutefois surprenant que les trois biofiltres aient réagi de la même façon, à peu près en même temps.

On a vu à la section 4.3.4 que l'activité potentielle augmente graduellement durant l'opération, pendant que l'activité observée semble atteindre une valeur maximale. La Figure 4.29 montre à partir de quelle quantité de biomasse dénitrifiante cette activité observée est obtenue. Il est premièrement possible d'y voir que plus le ratio  $DBO_5:NK$  est élevé, plus l'activité observée maximale est faible, atteignant environ  $5500 \text{ mgN d}^{-1}$  pour le biofiltre 1 et environ  $3000 \text{ mgN d}^{-1}$  pour le biofiltre 3. Il a été toutefois expliqué, à la section 4.3.8.1, que l'analyse de l'influence du ratio sur les performances réelles du procédé devait être réalisée sur des données normalisées avec l'azote de l'alimentation. Ainsi, les activités dénitrifiantes observées ont été normalisées avec la quantité d'azote ammoniacal à l'affluent du procédé.

La Figure 4.30 montre les résultats obtenus suite à cette opération. Contrairement aux données de la Figure 4.29, celles-ci semblent plutôt confondues et montrer une activité observée maximale similaire. Cette dernière constitue approximativement 80% de l'azote ammoniacal alimenté, biologiquement nitrifié puis dénitrifié. À la lumière des données obtenues à la Figure 4.30, il est possible de voir que l'activité dénitrifiante observée semble atteindre un maximum et légèrement redescendre par la suite.

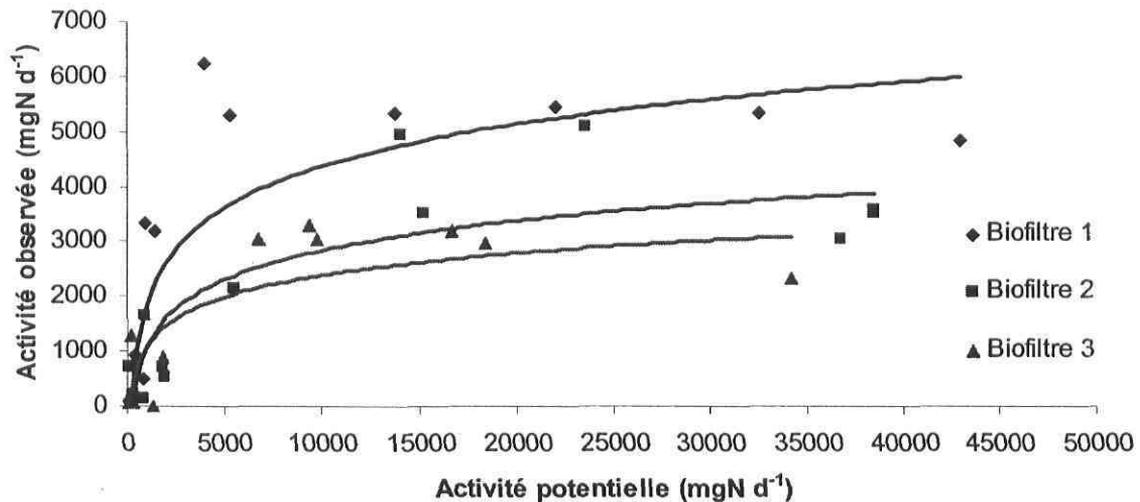


Figure 4.29. Relation entre l'activité dénitrifiante potentielle et observée dans les biofiltres pilotes

Une hypothèse a été avancée pour tenter d'expliquer ce phénomène. Lorsque la quantité de biomasse est faible dans le biofilm, les conditions environnementales rencontrées sont favorables à la croissance bactérienne. On peut donc voir l'activité observée augmenter avec l'activité potentielle jusqu'à une valeur maximale où les conditions (épaisseur du biofilm, zone aérobie et anoxie) sont optimales dans le biofilm pour nitrifier et dénitrifier l'azote. Dépassé cette quantité de biomasse, il est possible que la niche écologique ne soit plus idéale pour la biomasse, particulièrement pour les microorganismes nitrifiants, mais qu'elle demeure tout de même favorable à l'accomplissement des différents métabolismes. Par exemple, une très grande quantité de microorganismes hétérotrophes dans le biofilm pourrait générer beaucoup de  $\text{CO}_2$ , diminuant sensiblement le pH dans le biofilm, réduisant du même coup légèrement l'activité nitrifiante. Également, dépassé un certain seuil, la masse de biofilm peut devenir tellement importante dans les particules de milieu filtrant que la surface spécifique disponible pour la diffusion des nutriments dans celui-ci peut significativement diminuer et ainsi nuire au métabolisme de l'azote.

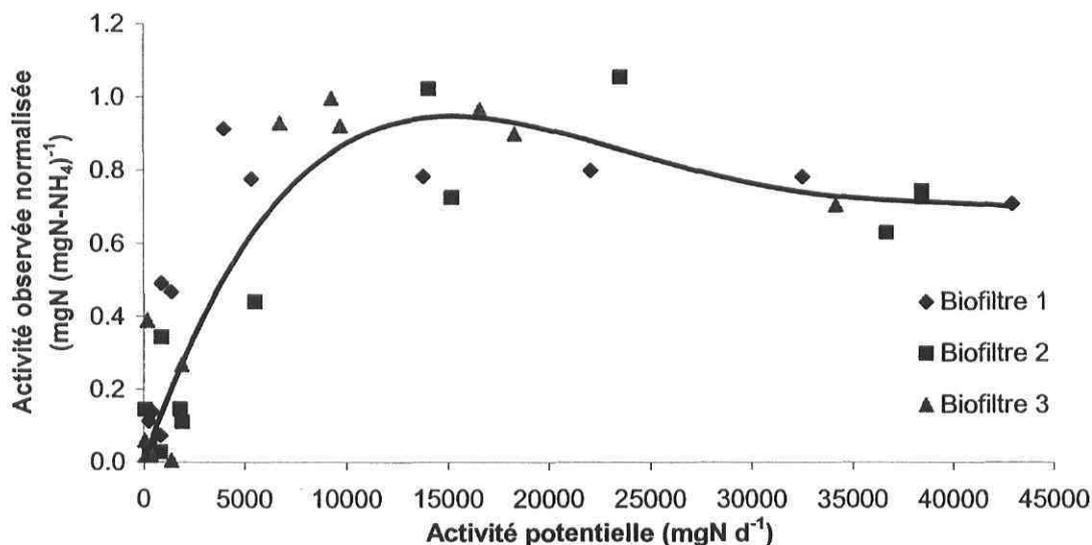


Figure 4.30. Relation entre l'activité dénitrifiante potentielle et observée normalisée

Évidemment, la quantité de carbone disponible est un autre facteur ayant pu limiter l'activité dénitrifiante observée dans le procédé, que ce soit dans les couches basses du procédé ou en profondeur du biofilm. En effet, l'épaisseur du biofilm peut rendre la diffusion de la matière organique difficile pour favoriser le métabolisme des bactéries dénitrifiantes. De plus, les résultats obtenus lors de l'évaluation de la concentration en matières organiques sur la hauteur des biofiltres, mesurée sous forme de DCO, montre qu'il reste moins de 3% de la DCO initiale au niveau de la mèche C. Cette quantité de carbone résiduel peut être insuffisante pour soutenir la dénitrification dans les couches plus profondes du procédé ou du moins, trop difficilement biodégradable pour être rapidement utilisée par ces microorganismes. L'analyse statistique (t-test) des données a permis de constater, à un seuil de signification  $\alpha$  de 5%, que l'activité observée normalisée est effectivement plus faible à de fortes valeurs d'activités dénitrifiantes potentielles, supportant les hypothèses décrites plus haut.

## 4.4 Conclusion

Le suivi de trois biofiltres pilotes, alimentés avec des lisiers caractérisés par des ratios DBO<sub>5</sub>:NTK différents, a été réalisé afin d'observer la colonisation de ces derniers par la biomasse nitrifiante et dénitrifiante. Dans l'ensemble, les biofiltres ont montré des performances satisfaisantes concernant l'enlèvement du carbone et de l'azote.

Afin de répondre aux objectifs spécifiques du projet, voici donc les conclusions générales associées au suivi des colonnes de biofiltration pilotes et les principaux points à retenir à la suite de ce travail:

- Peu importe la couche de milieu filtrant, l'activité potentielle nitrifiante et dénitrifiante est largement supérieure à ce qui peut être observé dans le biofiltre. Ceci indique qu'il existe un intervalle permettant de procéder à l'optimisation de l'enlèvement de l'azote dans le système. Le fait que la nitrification soit déjà complète aux charges testées dans ce projet suggère qu'il pourrait être possible d'alimenter le biofiltre à de plus fortes charges en azote ammoniacal. Il faut toutefois faire attention à l'inhibition de l'activité bactérienne pouvant être causée par de très hautes concentrations en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Le fort potentiel de l'activité dénitrifiante par rapport à l'activité observée ainsi que le fait que le nitrate ne soit pas entièrement dénitrifié indique plutôt que ces microorganismes ne se retrouvent pas dans des conditions optimales pour réaliser cette transformation dans le procédé.
- On retrouve une concentration de biomasse nitrifiante et dénitrifiante beaucoup plus importante dans les couches grossières que dans les couches de milieu filtrant organique. Ces couches avaient pour objectif de protéger le biofiltre organique, mais elles se sont avérées tellement efficaces qu'elles n'ont pas permis une colonisation importante du milieu filtrant organique. La subdivision des couches grossières a permis de constater que les microorganismes dénitrifiants (*nirS*) se trouvaient en plus grand nombre dans la couche de pouzzolane en surface, tandis que les nitrifiants (AOB et *Nitrobacter*) ont plutôt colonisé la couche AB où la compétition pour la niche écologique était moins forte. Cependant, ces données ne se sont pas répercutées sur l'activité potentielle, cette dernière étant demeurée plus forte dans la couche de pouzzolane, tant pour la nitrification que pour la dénitrification.

- La relation très forte entre la nitrification et la dénitrification observée appuie significativement l'hypothèse qu'il y a une NDS à l'intérieur du procédé de biofiltration. Ce phénomène semble particulièrement important dans les couches supérieures du système, où les conditions favorisent simultanément les deux types de métabolisme.
- L'activité potentielle nitrifiante a montré que les microorganismes nitrifiants ont commencé à s'installer dès le début de la période de suivi, pour ensuite poursuivre une progression importante jusqu'à la fin des essais. La biomasse dénitrifiante s'est également installée graduellement dans le biofiltre où elle s'est considérablement accrue à partir du 80<sup>e</sup> jour d'opération jusqu'au jour 140, où elle s'est stabilisée pour redescendre brusquement à la fin des essais. Un cycle de croissance-décroissance pourrait expliquer ces comportements.
- Dans l'ensemble, aucune différence significative n'a pu être observée entre les biofiltres 1 ( $\text{DBO}_5\text{:NTK} = 3$ ) et 2 ( $\text{DBO}_5\text{:NTK} = 6$ ) avant le 80<sup>e</sup> jour d'opération, tant du point de vue de l'activité observée normalisée nitrifiante et dénitrifiante, de l'activité nitrifiante et dénitrifiante potentielle qu'au niveau du dénombrement des microorganismes. Une divergence au niveau de la production de nitrate a toutefois pu être notée à la suite de cette période. Le biofiltre 3 ( $\text{DBO}_5\text{:NTK} = 9$ ) a, quant à lui, montré un comportement légèrement différent de celui des deux autres colonnes.
- Le biofiltre 3 a montré des divergences au niveau de l'activité potentielle dénitrifiante et de la production de nitrate. Son efficacité à enlever l'azote était plus élevée que pour les deux autres biofiltres (~90% par rapport à ~70%) tout en possédant un potentiel moins grand à dénitrifier. Cependant, la perte de performance au niveau de l'enlèvement de la DCO et l'augmentation considérable de la couleur, associées à la lixiviation des matières humiques par le pH élevé du percolat, amène à croire que ces conditions d'opération ne constituent pas un idéal d'application pour le traitement du lisier de porc.

- Il semble que plus le ratio  $\text{DBO}_5:\text{NTK}$  est élevé, plus l'efficacité à enlever l'azote ammoniacal (transformation sous forme gazeuse et assimilation) est grande, du moins à partir du 80<sup>e</sup> jour d'opération.
- Finalement, peu importe les conditions d'opération des biofiltres, il semble que l'activité nitrifiante et dénitrifiante observée ne puisse dépasser un certain seuil selon la configuration actuelle du procédé. En effet, la normalisation des données a permis de constater qu'un maximum moyen d'environ 80% d'enlèvement de l'azote ammoniacal est présentement possible.

# Chapitre 5

## Conclusions générales

### 5.1 Généralités

Le but de ce chapitre est de rappeler les objectifs et les points saillants du présent projet de recherche tout en démontrant sa pertinence et les contributions à l'avancement de la science. Les limites de cette étude seront exposées et différentes avenues de recherche futures seront également proposées.

Ce projet se proposait d'effectuer le suivi de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante présente dans un biofiltre à support organique traitant du lisier de porc. De façon plus spécifique, les objectifs étaient de :

- Trouver des techniques de suivi de la biomasse nitrifiante et dénitrifiante et les adapter aux différents supports du biofiltre;
- Évaluer les méthodes choisies afin d'évaluer leur applicabilité sur le milieu filtrant,
- Caractériser la biomasse nitrifiante et dénitrifiante de biofiltres pilotes, par le suivi dynamique de leur activité respective et de leur nombre;
- Décrire le comportement microbiologique de la biomasse du cycle de l'azote dans un biofiltre à support organique;

- Évaluer l'influence de différentes conditions d'opération sur la colonisation du milieu filtrant.

## 5.2 Conclusions générales

Les principales conclusions pouvant être tirées de l'ensemble de ce projet de doctorat sont:

- La respirométrie azotée constitue un complément intéressant à la respirométrie carbonée afin d'évaluer l'activité potentielle des microorganismes nitrifiants d'un biofiltre. Quoique cette technique ne reproduise pas les conditions dans lesquelles les microorganismes se trouvent dans le procédé, elle permet tout de même de suivre l'évolution de la colonisation par l'ensemble des bactéries nitrifiantes.
- Le blocage à l'acétylène, tel qu'adapté lors de ce projet, est une technique permettant d'évaluer l'activité dénitrifiante potentielle de façon simple et représentative et de suivre l'évolution de la croissance des microorganismes dénitrifiants dans un procédé à support organique. Il est également possible, suite aux modifications réalisées sur cette méthode, d'évaluer le potentiel d'un échantillon à produire du  $N_2O$ , gaz à effet de serre important, dans les conditions normales d'opération du procédé.
- Le PCR en temps réel constitue une méthode à la fine pointe permettant de dénombrer, de façon beaucoup plus précise que les méthodes culturales, la quantité d'un microorganisme donné. Cette technique a été appliquée avec succès lors de ce projet de doctorat pour cinq groupes bactériens (Totaux, AOB, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, dénitrifiants (*nirS*)).
- Dans les conditions actuelles d'opération, le procédé possède un potentiel énorme pour l'enlèvement de l'azote qui n'est présentement pas entièrement exploité. La nitrification de l'azote ammoniacal est pratiquement complète et le potentiel du procédé semble démontrer que ce dernier est en mesure d'accepter une charge plus élevée. La dénitrification demeure incomplète et un travail important reste à accomplir afin de fixer des conditions d'opération qui permettront de favoriser ce métabolisme tout en ne nuisant pas aux autres processus biologiques.

- La colonisation se fait principalement dans les couches supérieures du procédé. En effet, la présence d'une couche grossière protectrice sur le biofiltre organique n'a pas permis une croissance importante au niveau de ce dernier durant les 180 jours testés, que ce soit pour les microorganismes nitrifiants ou dénitrifiants. L'activité potentielle, l'activité observée ainsi que la quantification réalisée appuient toutes cette observation.
- La nitrification, mise en évidence grâce à l'activité potentielle, est présente dès le démarrage, mais apparaît significativement autour du 40<sup>e</sup> jour d'opération pour augmenter jusqu'à la fin des essais. La dénitrification augmente graduellement pour montrer ensuite un cycle de croissance-décroissance à partir du 80<sup>e</sup> jour d'opération, venant appuyer les observations d'études précédentes.
- Le lien très fort existant entre la nitrification et la dénitrification observée et la présence de nitrifiants et de dénitrifiants en nombre important dans les extraits d'acides nucléiques corroborent l'hypothèse avancée par Garzón (2001), stipulant qu'une NDS a lieu dans le procédé.
- On ne peut voir de différence significative pour la colonisation des biofiltres alimentés à des ratios DBO<sub>5</sub>:NTK de 3 et 6. Par contre, celui alimenté avec un lisier possédant un ratio de 9 a montré un comportement divergent. En effet, une hausse de pH très importante, l'augmentation marquée de la couleur, l'accroissement de la concentration de DCO à l'effluent ainsi qu'une difficulté à établir une biomasse nitrifiante stable ne sont que quelques exemples d'observations particulières réalisées sur ce biofiltre.

### 5.3 Limitations de l'étude

Certains résultats obtenus lors de ce projet ont pu être observés grâce à l'utilisation de techniques de mesures comportant des limites dont il faut tenir compte lors de l'analyse des conclusions. Principalement, ces limites sont:

- L'application de la respirométrie azotée, tel que décrit dans cette thèse, n'est pas représentative de l'environnement dans lequel les microorganismes se retrouvent dans le procédé. De plus, la mise en suspension de la biomasse et du support solide

perturbe de façon importante le biofilm et les microorganismes. Il est possible que ces faits puissent occasionner un certain biais dans la mesure de l'activité nitrifiante potentielle. Par contre, tel qu'expliqué à quelques reprises précédemment, les résultats permettent quand même d'observer la tendance que suit la croissance de ces microorganismes. Enfin, il n'a pas été possible d'utiliser successivement des inhibiteurs spécifiques à chacun des groupes de nitrifiants afin de discerner leurs activités. Ainsi, les activités mesurées correspondent plutôt à celle de l'ensemble des bactéries participant à l'oxydation de l'ammoniaque jusqu'au nitrate.

- Lors de l'évaluation de l'activité dénitrifiante potentielle, l'utilisation d'un flux continu d'acétylène demande une grande quantité de ce gaz, ce qui vient augmenter les coûts reliés à son application. La recirculation d'une atmosphère d'acétylène à l'aide d'une pompe à gaz réduirait significativement le volume de gaz nécessaire. Il faudra toutefois prendre certaines précautions à cause de l'inflammabilité de l'acétylène et afin de s'assurer que la concentration en  $C_2H_2$  reste constante durant les essais et qu'elle ne soit pas dégradée par la biomasse.
- Les amorces utilisées lors du PCR en temps réel ne ciblent que les microorganismes pour lesquels celles-ci ont été conçues. Une bactérie non caractérisée pourrait participer au métabolisme suivi sans pour autant avoir été quantifiée, ce qui signifie que cette technique sous-estime un peu la quantité de microorganismes, quoique beaucoup moins que la culture sur gélose ou le NPP. De plus, la mort cellulaire rejette dans l'environnement des acides nucléiques qui auraient pu être quantifiés et causer une surestimation des microorganismes visés. Finalement, l'extraction des acides nucléiques d'échantillons environnementaux amène également une variation qu'il ne faut pas négliger.
- Les bilans réalisés sur les différentes formes azotées, ayant permis de calculer l'activité potentielle, ont été basés sur une adsorption, une désorption et une absorption à l'équilibre avec la phase aqueuse ainsi que sur un taux d'assimilation approximatif, estimé dans l'étude de Garzón (2001). Ainsi, quoique ceux-ci nous aient permis d'obtenir une tendance et un ordre de grandeur, il ne fait aucun doute

que les résultats obtenus ne représentent pas exactement l'activité réelle ayant lieu dans le procédé.

- Les résultats obtenus, c'est-à-dire le suivi de la colonisation, ne sont représentatifs que des conditions d'opérations testées lors de ce projet. En effet, une modification de la charge hydraulique, de la charge massique en azote ou en carbone, du taux d'aération, du type de lisier utilisé, de la configuration des biofiltres ou du ratio C:N pourrait amener une colonisation légèrement ou entièrement différente de ce qui a pu être observé ici. Ainsi, le fait de changer la configuration du biofiltre ou ses conditions d'opération pour favoriser l'une ou l'autre des biomasses impliquées dans les transformations azotées, pourrait induire un changement relativement important au niveau de ces mêmes biomasses, modifiant ainsi le potentiel du procédé ou d'une couche de milieu filtrant.

## 5.4 Études futures

Ce travail s'inscrit dans un projet d'une envergure beaucoup plus importante où l'étude de la biomasse impliquée dans les transformations de l'azote est à l'honneur. Ces connaissances permettront de mieux comprendre le comportement et la dynamique de ces microorganismes dans le procédé, de développer des modèles mathématiques qui aideront à la conception du système et à la prévision de certaines performances.

À partir des données recueillies lors de ce projet de doctorat, on a montré que le procédé avait un énorme potentiel pour l'optimisation de la dénitrification, que la nitrification et la dénitrification avaient lieu à proximité (NDS) et près de la biodégradation organique et que l'ensemble des transformations avait lieu majoritairement dans les couches supérieures. Ces connaissances vont aider à la prise de décision quant au type de modification qui devra être réalisée pour enlever complètement l'azote. Les résultats obtenus lors de ce travail ne pourront être directement appliqués sur des biofiltres à grande échelle afin d'augmenter leur efficacité pour l'enlèvement de l'azote. La prochaine étape devra plutôt être réalisée en laboratoire et consistera à modifier les conditions d'opération afin de favoriser la NDS à l'intérieur du procédé.

Plusieurs types de changements pourraient être apportés au procédé pour favoriser la dénitrification:

- La diminution de l'aération pourrait permettre une augmentation de la quantité de sites anoxies disponibles, moins d'oxygène étant disponible pour diffuser profondément à travers le biofilm ou se rendre dans les microzones du milieu filtrant, accroissant ainsi la possibilité de dénitrifier. Il faudra toutefois limiter cette réduction de l'aération afin d'éviter de nuire à la biodégradation aérobie de la matière organique ainsi qu'à la nitrification. En vérifiant l'influence de plusieurs taux d'aération, il serait possible de déterminer lequel permet d'atteindre la dénitrification maximale sans nuire aux autres processus biologiques.
- La recirculation d'une partie de l'effluent du biofiltre mettrait en contact la biomasse dénitrifiante des couches supérieures avec une quantité importante de nitrate (Chiou et Ouyang 2001; Vanhooren *et al.* 2003). Effectivement, une partie non négligeable de la nitrification s'effectue graduellement dans les couches profondes du biofiltre et il a été vu que la matière organique est pratiquement toute enlevée dans les couches supérieures, ce qui ne permet pas une croissance significative de la biomasse hétérotrophe en profondeur. Ceci ne favorise donc pas la dénitrification complète de l'azote. Sachant que la biomasse en surface possède un potentiel très important à dénitrifier, il est possible que celle-ci puisse utiliser le nitrate de l'alimentation-recirculation dans les zones anoxies des couches de surface. Différents ratios de recirculation pourraient être testés afin d'évaluer la quantité de nitrate enlevée par la biomasse des couches supérieures.
- L'injection d'une source de carbone facilement biodégradable à une hauteur donnée dans le biofiltre pourrait favoriser la croissance de la biomasse hétérotrophe, stimulant ainsi la dénitrification (Beauchamp *et al.* 1989). Plusieurs profondeurs d'injection, ainsi que plusieurs types de substrats (méthanol, éthanol, acétate, etc.) pourraient être testés afin de vérifier l'influence de cette modification. Évidemment, cela amènerait des coûts supplémentaires au traitement, mais dans l'optique d'optimiser l'enlèvement de l'azote, c'est une orientation qui ne peut être rejetée. De

plus, il faudra tenir compte des risques de colmatage au niveau du site d'injection, dus à la croissance accrue de biomasse.

Quoique tout porte à croire qu'il y a une NDS à l'intérieur du procédé, cette hypothèse n'a encore une fois pu être confirmée hors de tout doute lors de ce projet. Une étude approfondie du biofilm amènerait l'information décisive permettant de conclure sur ce point. En effet, l'utilisation de micro-sondes, pénétrant le biofilm pour le suivi du gradient d'oxygène, de nitrate et du potentiel rédox, apporterait des connaissances fines quant aux différents processus ayant cours dans ce procédé.

Dans son étude, Garzon (2001) suggère plusieurs questions dont les réponses n'ont pu être fournies par ce projet de doctorat :

- En effet, le  $N_2O$ , gaz à effet de serre, est produit en quantité importante par le procédé. Une diminution de l'aération pourrait être envisagée pour augmenter la quantité de zones anoxies, tel que décrit un peu plus haut, tout en réduisant le dégazage du  $N_2O$  dans l'aération. Ainsi, le suivi du  $NH_3$ , du  $NO$  et du  $N_2O$  dans une étude où différents taux d'aération seraient testés permettrait de déterminer lequel diminue suffisamment la quantité d'azote dégazée. De plus, Béline et Martinez (1998) suggèrent qu'une aération séquentielle encourage la production de  $N_2$  au détriment des émissions de  $N_2O$ . Il serait intéressant de vérifier cette application pour la biofiltration sur support organique.
- Les données de ce projet ainsi que celles de Garzón (2001) montrent un enlèvement de l'azote qui semble cyclique, particulièrement pour la dénitrification. Des essais avec une période de suivi dépassant 180 jours, pour lesquels les différentes formes azotées seraient suivies, permettraient d'obtenir des informations pertinentes afin d'appuyer ou d'infirmer cette hypothèse, pour évaluer l'importance de ce phénomène et de trouver des explications concrètes à ce phénomène.

Finalement, de nouveaux processus d'enlèvement de l'azote ont été récemment décrits et pourraient expliquer une portion de l'azote ammoniacal qui est enlevé dans le biofiltre. En effet, l'oxydation anaérobie de l'ammoniaque (ANAMMOX) permet l'utilisation du  $NH_4^+$  combinée à la respiration du  $NO_2^-$  pour former de l'azote gazeux de manière autotrophe (Schmid *et al.* 2000; Jetten *al.* 1997, 1999, 2002; Schmid *et al.* 2003). Une identification

des microorganismes impliqués dans ce type de mécanisme suivie d'une modification des conditions d'opération permettant de favoriser leur croissance et leur métabolisme amènerait une avenue supplémentaire pour l'optimisation de l'enlèvement de l'azote par ce procédé.

## Bibliographie

- Alexander, M. 1982. Chapter 39 - Most Probable Number Method for Microbial Populations. *In*: A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (Editors.), *Methods of Soil Analysis*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, Vol. 2, pp. 815-819
- Anderson, I.C., Poth, M., Homstead, J. and Burdige, D. 1993. A comparison of NO and N<sub>2</sub>O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11): 3525-3533.
- APHA and AWWA. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20<sup>th</sup> edition. Washington, DC.
- APHA and AWWA. 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 18<sup>th</sup> edition. Washington, DC.
- Atlas, R.M. 1993. Section 15 – Environmental Monitoring. *In*: G.H. Keller and M.M. Manak (Editors), *DNA Probes*, 2<sup>nd</sup> edition. Stokton Press, New York, pp. 589-616.
- Atlas, R.M. and Bartha, R. 1998. *Microbial Ecology – Fundamentals and applications*. 4<sup>th</sup> edition. Menlo Park, Ca: Benjamin/Cummings Publishing Company. 694 pages.
- Avrahami, S., Conrad, R. and Braker, G. 2002. Effect of soil ammonium concentration on N<sub>2</sub>O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11): 5685-5692.
- Ballinger, S.J., Head, I.M., Curtis, T.P. and Godley, A.R. 2002. The effect of C/N ratio on ammonia oxidizing bacteria community structure in a laboratory nitrification-denitrification reactor. *Water Science Technology*, 46(1-2): 543-550.
- Beauchamp, E.G., Trevors, J.T. and Paul, J.W. 1989. Carbon sources for bacterial denitrification. *Advances in Soil Science*, 10: 113-142.
- Béline, F and Martinez, J. 1998. The effect of continuous and intermittent aerobic treatment of pig slurry on nitrous oxide emissions. *In*: J. Martinez and M.-N. Maudet (Editors), *Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Conference on Management strategies for organic waste use in agriculture*, Cemagref. Rennes, France. 365-374.
- Béline, F., Martinez, J., Marol, C. and Guiraud, G. 2001. Application of the <sup>15</sup>N technique to determine the contribution of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from aerated pig slurry. *Water Research*, 35(11): 2774-2778.
- Belser, L.W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 33: 309-333.

- Belser, L.W. and Mays, E.L. 1980. Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(3): 505-510.
- Belser, L.W. and Mays, E.L. 1982. Use of nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4): 945-948.
- Belser, L.W. and Schmidt, E.L. 1980. Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia oxidizing nitrifiers. *FEMS Microbiology Letters*, 7: 213-216.
- Bernot, M.J., Dodds, W.K., Gardner, W.S., McCarthy, M.J., Sobolev, D. and Tank, J.L. 2003. Comparing denitrification estimates for a Texas estuary by using acetylene inhibition and membrane inlet mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10): 5950-5956.
- Bjerrum, L., Kjaer, T. and Ramsing, N.B. 2002. Enumerating ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples using competitive PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 51: 227-239.
- Blackburne R. 2006. Nitrifying bacteria characterization to identify and implement factors leading to nitrogen removal via nitrite in activated sludge processes. Ph.D Thesis. The University of Queensland, Australia.
- Boiran, B., Couton, Y. and Germon, J.C. 1996. Nitrification and denitrification of liquid lagoon piggery waste in a biofilm infiltration-percolation aerated system (BIPAS) reactor. *Bioresource Technology*, 55: 63-77.
- Bollmann, A. and Conrad, R. 1997. Acetylene blockage technique leads to underestimation of denitrification rates in oxic soils due to scavenging of intermediate nitric oxide. *Soil Biology & Biochemistry*, 29(7): 1067-1077.
- Bonnet, C., Volat, B., Bardin, R., Degrange, V. and Montuelle, B. 1997. Use of immunofluorescence technique for studying a *Nitrobacter* population from wastewater treatment plant following discharge in river sediments: first experimental data. *Water Research*, 31(1): 661-664.
- Bortone, G., Malaspina, F., Stante, L. and Tilche A. 1994. Biological nitrogen and phosphorus removal in an anaerobic/anoxic sequencing batch reactor with separated biofilm nitrification. *Water Science and Technology*, 30(6): 303-313.
- Both, G.J., Gerards, S. and Laanbroek, H.J. 1990. Enumeration of nitrite-oxidizing bacteria in grassland soils using a most probable number technique: effect of nitrite concentration and sampling procedure. *FEMS Microbiology Ecology*, 74: 277-286.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B. and Witzel, K.-P. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 673-690.

- Braker, G., Fesefeldt, A. and Witzel, K.-P. 1998. Development of PCR primer Systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10): 3769-3775.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H. and Tiedje, J.M. 2000. Nitrite reductase gene (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5): 2096-2104.
- Buelna, G. 1998. Biofilter for purification of waste waters and method therefor. US Patent 6,100,081.
- Buelna, G., Dubé, R., Michel, M.-C., Turgeon, N., Bernard, Y. and Lessard, P. 1998. Comprehensive pig manure treatment using the BIOSOR™ biofiltration process. Proceedings 8<sup>th</sup> International conference – RAMRAN 98, Rennes, France. 389-404.
- Burgess, J.E., Colliver, B.B., Sutetz, R.M. and Stephenson, T. 2002. Dinitrogen oxide production by a mixed culture of nitrifying bacteria during ammonia shock loading and aeration failure. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29: 309-313.
- Burrell, P.C., Keller, J. and Blackall, L.L. 1998. Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5): 1878-1883.
- Carter, J.P., Hsin Hsiao, Y., Spiro, S. and Richardson, D.J. 1995. Soil and sediments bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8): 2852-2858.
- Carvalho, L., Carrera, J. and Chamy, R. 2002. Nitrifying activity monitoring and kinetic parameters determination in a biofilm airlift reactor by respirometry. *Biotechnology Letters*, 24: 2063-2066.
- Casciotti, K.L. and Ward, B.B. 2001. Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5): 2213-2221.
- Casciotti, K.L. and Ward, B.B. 2005. Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 52: 197-205.
- Castignetti, D. and Hollocher, T.C. 1984. Heterotrophic nitrification among denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(4): 620-623.
- Chandran, K. and Smets, B.F. 2001. Estimating biomass yield coefficients for autotrophic ammonia and nitrite oxidation from batch respirometry. *Water Research*, 35(13): 3153-3156.

- Chaudhary, D.S., Vigneswaran, S. Ngo, H.-H., Shim, W.G. and Moon, H. 2003. Biofilter in water and wastewater treatment. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 20(6): 1054-1065.
- Cheng, N., Lo, K.V. and Yip, K.H. 1999. pH as a real-time control parameters in swine wastewater treatment process. *Advances in Environmental Research*, 3(2): 166-178.
- Chiou, R.-J. and Ouyang, C.-F. 2001. The effect of recycle ratio on nitrogen removal in the combined pre-denitrification/nitrification biofilter system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76: 559-564.
- Choudhary, M., Bailey, L.D. and Grant, C.A. 1996. Review of the use of swine manure in crop production: effects on yield and composition and on soil and water quality. *Waste Management & Research*, 14: 581-595.
- Cochran, W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". *Biometrics*, 6(2): 105-116.
- Colliver, B.B. and Stephenson, T. 2000. Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers. *Biotechnology Advances*, 18: 219-232.
- Conrad, R. 1990. Flux of NO<sub>x</sub> between soil and atmosphere: Importance and soil microbial metabolism. *In*: N.P. Revsbech and J. Sorensen (Editors), *Denitrification in Soil and Sediment*. FEMS Symposium, New York, pp. 105-128.
- Côté, R. 1996. Notes de cours STT-18869: Statistique pour chimistes. Département de mathématiques et de statistique, Faculté de Sciences et de Génie. Université Laval.
- Couillard D. 1994. The use of peat in wastewater treatment. *Water Research* 28: 1261-1274.
- CQVB. 1987. La tourbe – Une ressource d'avenir. Centre de recherche Premier, Rivière-du-Loup. 125 pages.
- CRIQ. 1997. Manuel de méthodes d'analyse du département d'environnement du Centre de Recherche Industrielle du Québec.
- Daims, H., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., Juretschko, S. and Wagner, M. 2000. Novel *Nitrospira*-Like bacteria as dominant nitrite oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: Diversity and *in situ* physiology. *Water Science and Technology*, 41(4): 85-90.
- Degrange, V. and Bardin, R. 1995. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6): 2093-2098.
- Dionisi, H.M., Layton, A.C., Harms, G., Gregory, I.R., Robinson, K.G. and Sayler, G.S. 2002a. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing

- bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1): 245-253.
- Dionisi, H.M., Layton, A.C., Robinson, K.G., Brown, J.R., Gregory, I.G., Parker, J.J. and Sayler, G.S. 2002b. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha* and *Nitrospira* spp. using competitive polymerase chain reaction in bench-scale wastewater treatment reactors operating at different solids retention times. *Water Environmental Research*, 74(5): 463-469.
- Dionisi, H.M., Harms, G., Layton, A.C., Gregory, I.R., Parker, J., Hawkins, S.A., Robinson, K.G. and Sayler, G.S. 2003. Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11): 6597-6604.
- Dorak, M.T. 2004. Real-Time PCR. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>
- Dorias, B. and Baumann, P. 1994. Denitrification in trickling filters. *Water Science and Technology*, 30(6) : 181-184.
- Dubé, R., Buelna, G. and Lessard, P. 1995. Technologie de biofiltration pour le traitement du lisier de porc. *Dans : Comptes Rendus du 18<sup>e</sup> Symposium sur le Traitement des Eaux Usées*, Montréal. pp. 298-309
- Etchebere, C., Errazquin, M.I., Dabert, P. and Muxi, L. 2002. Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 97-106.
- Evans, M.R., Hisset, R., Smith, M.P.W., Ellam, D.F. and Baines, S. 1979. Effect of microorganisms on aerobic treatment of piggery waste. *Agricultural Wastes*, 1: 67-85.
- Fenlon, D.R. and Robinson, K. 1977. Denitrification of aerobically stabilized pig waste. *Water Research*, 11: 269-273.
- Fédération des Producteurs de Porcs du Québec (FPPQ). 2001. Rapport d'évaluation des technologies de gestion et de traitement du lisier de porc. Par le groupe de travail « transfert technologique » du Plan agroenvironnemental de la production porcine. [www.leporcduquebec.qc.ca](http://www.leporcduquebec.qc.ca) 48 pages.
- Féray, C., Volat, B., Degrange, V., Clays-Josserand, A. and Montuelle, B. 1999. Assessment of three methods for detection and quantification of nitrite-oxidizing bacteria and *Nitrobacter* in freshwater sediments (MPN-PCR, MPN-Griess, Immunofluorescence). *Microbial Ecology*, 37: 208-217.
- Fernández-Boy, M.E., Cabrera, F. and Moreno, F. 1998. Analysis of inorganic anions in drainage water and soil solution by single-column ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 823: 285-290.

- Galvez, J.M., Gomez-Villalba, B., Gomez, M.A., Hontoria, E., Gonzalez-Lopez, J. and Calvo, C. 2001. Biofilm activity in the removal of nitrogen, organic matter and pathogens from wastewater with a submerged filter. *In* : Tandoi, V, Passino, R. and Blundo, C.M. (Editors), Proceedings of the 3<sup>rd</sup> IWA International Specialised conference on Microorganisms in activated sludge and biofilm processes, Rome, Italy.
- Garraway, J.L. 1982. Investigations on the aerobic treatment of pig slurry. *Agricultural Wastes*, 4: 131-142.
- Garzón, M. 2001. Mécanismes d'enlèvement de l'azote du lisier de porc par biofiltration aérée sur tourbe. Thèse de Doctorat, Université Laval, Sainte-Foy, Canada.
- Garzón-Zúñiga M, Lessard P, Aubry G and Buelna G. (2005) Nitrogen elimination mechanisms in an aerated peat biofilter treating pig manure. *Environmental Technology*, 26(4): 361-371.
- Gernaey, K., Petersen, B., Nopens, L., Comeau, Y. and P.A. Vanrolleghem. 2002. Modeling aerobic carbon source degradation processes using titrimetric data and combined respirometric-titrimetric data: experimental data and model structure. *Biotechnology and Bioengineering*, 79:741-753.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R. and Schramm, A. 2001. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3): 1351-1362.
- Gilbert, Y., Le Bihan, Y., Buelna, G. and Lessard, P. 2005. Application of respirometry to monitor the biomass activity of a biofilter on an organic bed used to treat pig manure. *Water Quality Research Journal of Canada*, 40(2): 155-163.
- Ginestet, P., Audic, J.-M., Urbain, V. and Block, J.-C. 1998. Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6): 2266-2268.
- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Haematology*, 30: 503-512.
- Grady, C.P.L., Daigger, G.T. and Lim, H.C. 1999. *Biological wastewater treatment*, 2<sup>nd</sup> edition. Marcel Dekker, New York. 1076 pages.
- Gregory, L.G., Bond, P.L., Richardson, D.J. and Spiro, S. 2003. Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker. *Microbiology*, 149: 229-237.
- Grüntzig, V., Nold, S.C., Zhou, J. and Tiedje, J.M. 2001. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 760-768.

- Hall, S.J., Hugenholtz, P., Siyambalapitiya, N., Keller, J. and Blackall, L.L. 2002. The development and use of real-time PCR for the quantification of nitrifiers in activated sludge. *Water Science and Technology*, 46(1): 267-272.
- Hallin, S. and Pell, M. 1994. Acetylene inhibition for measuring denitrification rates in activated sludge. *Water Science and Technology*, 30(6): 161-167.
- Hallin, S. and Lindgren, P.-E. 1999. PCR Detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4): 1652-1657.
- Hallmark, S.L. and Terry, R.E. 1985. Field measurement of denitrification in irrigated soils. *Soil Science*, 140(1): 35-44.
- Hanaki, K., Hong, Z. and Matsuo, T. 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. *Water Science and Technology*, 26(5-6): 1027-1036.
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G. and Sayler, G.S. 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science and Technology*, 37(2): 343-351.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Methods*, 6: 986-994.
- Helmer, C. and Kunst S. 1998. Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. *Water Science and Technology*, 37(4-5): 183-187.
- Helmer, C., Kunst, S., Juretschko, S., Schmid, M.C., Schleifer, K.H. and Wagner M. 1999. Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. *Water Science and Technology*, 39(7): 13-21.
- Henry, S., Baudoin, E., Lopez-Gutiérrez, J.C., Martin-Laurent, F., Brauman, A. and Philippot, L. 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3): 327-335.
- Henze, M. 1995. Chapter 3 – Basic biological process. *In: M. Henze, P. Harremoes, J.C. Jansen and E. Arvin (Editors), Wastewater Treatment (biological and chemical processes)*. Springer – Verlag, Berlin. pp. 55-111.
- Hermansson, A. and Lindgren, P.-E. 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 972-976.
- Hochstein, L.I. and Tomlinson, G.A., 1998. The enzymes associated with denitrification. *Annual Review of Microbiology*, 42: 231-261.

- Hodkinson, B., Williams, J.B., & Butler, J.E. 1999. Development of biological aerated filters: A review. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management*, 13(4): 250-254.
- Horn, H. and Hempel, D.C. 1997. Growth and decay in an auto-/heterotrophic biofilm. *Water Research*, 31(9): 2243-2252.
- Howeler, M., Ghiorse, W.C. and Walker, L.P. 2003. A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost. *Journal of Microbiological Methods*, 54 : 37-45.
- Hu, T.-L. and Kung, K.T. 2000. Study of heterotrophic nitrifying bacteria from wastewater treatment systems treating acrylonitrile, butadiene and styrene resin wastewater. *Water Science and Technology*, 42(3-4): 315-321.
- Hynes, R.K. and Knowles, R. 1983. Inhibition of chemoautotrophic nitrification by sodium chlorate and sodium chlorite: A reexamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(4): 1178-1182.
- IRDA (Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement). 2002. Pour une intégration des productions animales dans les systèmes agricoles québécois. *Dans : La Terre de chez nous*, 73(42): 43-50.
- Jetten, M.S.M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L.A., de Vries, S., van Loosdrecht, M.C.M. and Kuenen, J.G. 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 75-93.
- Jetten, M.S.M., Schmid, M.C., Schmidt, I., Wubben, M., van Dongen, U., Abma, W., Sliemers, O., Revsbech, N.P., Beaumont, H.J.E., Ottosen, L., Volcke, E., Laanbroek, H.J., Campos-Gomez, J.L., Cole, J., van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, J.W., Fuerst, J.A., Richardson, D.J., van de Pas, K., Mendez-Pampin, R., Third, K., Cirpus, I., van Spanning, R., Bollmann, A., Nielsen, L.P., den Camp, H.O., Schultz, C., Gundersen, J., Vanrolleghem, P., Strous, M., Wagner, M. and Kuenen, J.G. 2002. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology*, 1(1), 51-63.
- Jetten, M.S.M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., van Dongen, U.G.J.M., van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M. and Kuenen, J.G. 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, 22: 421-437.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M.C., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P. and Wagner, M. 1998. Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8): 3402-3051.

- Kalyuzhnyi, S., Sklyar, V., Epov, A., Arkhipchenko, I. A., Barboulina, I. and Orlova, O. 2002. Combined biological and physico-chemical treatment of filtered pig manure wastewater: pilot investigations. *Water Science and Technology*, 45(12): 79-87.
- Kappelmeyer, U., Kusch, P. and Stottmeister, U. 2003. Model experiments on the influence of artificial humic compounds on chemodenitrification. *Water, Air, and Soil Pollution*, 147: 317-330.
- Keeney, D.R. 1986. Critique of the acetylene blockage technique for field measurement of denitrification. *In: J.J. Mortvedt, D.M. Kral and S.H. Mickelson (Editors), Field measurement of dinitrogen fixation and denitrification. Soil Science Society of America, Inc., Madison, pp. 103-115.*
- Kester, R.A., De Boer, W. and Laanbroek, H.J. 1997. Production of NO and N<sub>2</sub>O by pure cultures of nitrifying and denitrifying bacteria during changes in aeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10): 3872-3877.
- Khammar, N., Malhautier, L., Degrange, V., Lensi, R., Godon, J.-J. and Fanlo, J.-L. 2005. Link between spatial structure of microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 476-490.
- Killham, K. 1986. Chapter 7 – Heterotrophic Nitrification. *In: J.I. Prosser (Editor), Nitrification. The Society for General Microbiology, Oxford, Washington DC, pp. 117-126.*
- Kim, I.S., Kim, S., and Jang, A. 2001. Activity monitoring for nitrifying bacteria by fluorescence in situ hybridization and respirometry. *Environmental Monitoring and Assessment*, 70(1-2): 223-231.
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R. and Schmidt, T.M. 2001. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research*, 29(1): 181-184.
- Klemedtsson, L., Hansson, G. and Mosier, A. 1990. The use of acetylene for the quantification of N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O production from biological processes in soil. *In: N.P. Revsbech and J. Sorensen (Editors), Denitrification in Soil and Sediment. FEMS Symposium, New York, pp. 167-180.*
- Klotz, M.G. and Norton, J.M. 1998. Multiple copies of ammonia monooxygenase (*amo*) operons have evolved under biased AT/GC mutational pressure in ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 168: 303-311.
- Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46(1): 43-70.
- Knowles, R. 1990. Acetylene inhibition technique: development, advantages, and potential problems. *In: N.P. Revsbech and J. Sorensen (Editors), Denitrification in Soil and Sediment. FEMS Symposium, New York, pp. 151-166.*

- Kobayashi, M. and Shoun, H. 1995. The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(8): 4146-4151.
- Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55: 485-529.
- Kowalchuk, G.A., Naoumenki, Z.S., Derikx, P.J.L., Felske, A., Stephen, J.R. and Arkhipchenko, I.A. 1999. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2): 396-403.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M. and Woldendorp, J.W. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4): 1489-1497.
- Konuma, S., Satoh, H., Mino, T. and Matsuo, T. 2001. Comparison of enumeration methods for ammonia-oxidizing bacteria. *Water Science and Technology*, 43(1): 107-114.
- Kristensen, G.H., Jorgensen, P.E. and Henze, M. 1992. Characterization of functional microorganism groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR. *Water Science and Technology*, 25(6): 43-57.
- Kuenen, J.G. and Roberston, L.A. 1994. Combined Nitrification-Denitrification Processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 109-117.
- LaMontagne, M.G., Michel, F.C., Holden, P.A. and Reddy, C.A. 2002. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 49: 255-264.
- Lee, H.-W., Lee, S.-Y., Lee, J.-W., Park, J.-B., Choi, E.-S. and Park, Y.K. 2002. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology*, 41: 85-94.
- Littleton, H.X., Daigger, G.T., Strom, P.F. and Cowan, R.M. 2002. Evaluation of autotrophic denitrification, heterotrophic nitrification, and PAOs in full scale simultaneous biological nutrient removal systems. *Water Science and Technology*, 46(1-2): 305-312.
- Liu, Y. and Capdeville, B. 1996. Specific activity of nitrifying biofilm in water nitrification process. *Water Research*, 30(7): 1645-1650.
- Loynachan, T.E., Bartholomew, W.V. and Wollum, A.G. 1976. Nitrogen transformation in aerated swine manure slurries. *Journal of Environmental Quality*, 5: 293-297.

- Mackay, I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 190-212.
- Malhautier, L. 1996. Étude des bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* impliquées dans la biofiltration. Thèse de doctorat, Université de Pau et des Pays de l'Adour. France. 138 pages.
- Malhautier, L., Degrange, V., Guay, R., Degorce-Dumas, J.-R., Bardin, R. and Le Cloirec, P. 1998. Estimating size and diversity of nitrifying communities in deodorizing filters using PCR and immunofluorescence. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 255-262.
- Malik, M., Kain, J., Pettigrew, C. and Ogram, A. 1994. Purification and molecular analysis of microbial DNA from compost. *Journal of Microbiological Methods*, 20: 183-196.
- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttila, T. and Palva, A. 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 149:269-277.
- Marsili-Libelli, S. and Tabani, F. 2002. Accuracy analysis of a respirometer for activated sludge dynamic modelling. *Water Research*, 36: 1181-1192.
- Mateju, V., Cizinska, S., Krejci, J. and Janoch, T. 1992. Biological water denitrification - A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 14 : 170-183.
- McCarty, G.W. 1999. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, 29: 1-9.
- McGilloway, R.L., Weaver, R.W., Ming, D.W. and Pillai, S.D. 2002. A PCR-MPN based quantitative approach to enumerate nitrifying bacteria in zeoponic substrates. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 10: 49-58.
- Mergel, A., Kloos, K. and Bothe, H. 2001. Seasonal fluctuations in the population of denitrifying and N<sub>2</sub>-fixing bacteria in an acid soil of a Norway spruce forest. *Plant and Soil*, 230: 145-160.
- Metcalf and Eddy. 2003. *Wastewater engineering, treatment and reuse*, 4<sup>th</sup> edition. McGraw Hill, New York. 1819 pages.
- Mével, G. and Prieur, D. 2000. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(5): 465-473.
- Michotey, V., Méjean, V. and Bonin, P. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4): 1564-1571.

- Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittman, B.E. and Stahl, D.A. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 62(6): 2156-2162.
- Münch, E.V., Lant, P. and Keller, J. 1996. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Research*, 30(2): 277-284.
- Murray, R.E. and Knowles, R. 2003. Production of NO and N<sub>2</sub>O in the presence and absence of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> by soil slurries and batch culture of denitrifying bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 1115-1122.
- Muyzer, G. and Ramsing, N.B. 1995. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science and Technology*, 32(8): 1-9.
- Myrold, D. D. 1990. Measuring denitrification in soils using <sup>15</sup>N techniques. *In*: N.P. Revsbech and J. Sorensen (Editors.), *Denitrification in Soil and Sediment*, New York: FEMS Symposium. pp. 181-198.
- NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry). 2006. Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>
- Okabe, S., Oozawa, Y., Hirata, K. and Watanabe, Y. 1996. Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C:N ratios. *Water Research*, 30(7): 1563-1572.
- Ouellette, Y. 1994. Optimisation de la récupération des microorganismes fixés sur un biofiltre organique. Département de biochimie et microbiologie. Université Laval, Sainte-Foy, Canada
- Parkin, T.B., Kaspar, H.F., Sexstone, A.J. and Tiedje, J.M. 1984. A gas-flow soil core method to measure field denitrification rates. *Soil Biology & Biochemistry*, 16(4): 323-330.
- Pearl, H.W. 1998. Microbially mediated nitrogen cycling. *In*: R.S. Burlage, R.M. Atlas, D.A. Stahl, G. Geesey and G.S. Saylor (Editors), *Techniques in Microbial Ecology*. Oxford University Press, New York.
- Persson, F., Wik, T., Sorensson, F. and Hermansson, M. 2002. Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter. *Water Research*, 36(6): 1439-1448.
- Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F. and Tebbe, C.C. 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation-polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3): 930-936.

- Phillips, C.J., Paul, E.A., and Prosser, J.I. 2000. Quantitative analysis of ammonia oxidizing bacteria using competitive PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 167-175.
- Phillips, J. and Deutsch, U. 2003. Chapter 7 - DNA cleanup from gels, PCR, sequencing, and other enzymatic reactions. *In* : B. Bowien and P. Dürre (Editors.), *Nucleic Acids: isolation methods*. American Scientific Publisher. Stevenson Ranch, California.
- Pickup, R.W. 1991. Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *Journal of General Microbiology*, 137: 1009-1019.
- Pochana, K. and Keller, J. 1999. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Science and Technology*, 39(6): 61-68.
- Pochana, K., Keller, J. and Lant, P. 1999. Model development for simultaneous nitrification and denitrification. *Water Science and Technology*, 39(1): 235-243.
- Prescott, Harley and Klein. 1995. *Microbiologie*, Bruxelles, 1014 pages.
- Puznava, N. Payraudeau, M. and Thornberg, D. 2001. Simultaneous nitrification and denitrification in biofilters with real time control. *Water Science and Technology*, 43(1): 269-276.
- Ra, C.S., Lo, K.V. and Mavinic, D.S. 1999. Control of a swine manure treatment process using a specific feature of oxidation reduction potential. *Bioresource Technology*, 70: 117-127.
- Ra, C.S., Lo, K.V., Shin, J.S., Oh, J.S. and Hong, B.J. 2000. Biological nutrient removal with an internal organic carbon source in piggery wastewater treatment. *Water Research*, 24(3): 965-973.
- Rebillard, J.P. and Torre, M. 1993. Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT: application a un cas concret. *Revue des Sciences de l'Eau*, 6: 153-174.
- Richardson, D.J. and Watmough, N.J., 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3: 207-219.
- Rittman, B.E. 2002. The role of molecular methods in evaluating biological treatment processes. *Water Environmental Research*, 74(5): 421-427.
- Roberge, G.P., Blais, J.-F. and Mercier, G. 1999. Enlèvement du phosphore des eaux usées par traitement à base de tourbe dopée aux boues rouges. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 77: 1185-1194.

- Roberston, L.A., Cornelisse, R., De Vos, P., Hadjoetomo, R. and Kuenen, J.G. 1989. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 56: 289-299.
- Rock C.A., Brooks J.L., Bradeen S.A. and Struchtemeyer R.A. 1984. Use of peat for on-site wastewater treatment: I. Laboratory evaluation. *Journal of Environmental Quality*, 13(4): 518-523.
- Rother, E., Cornel, P., Ante, A., Brambach, R. and Kleinert, P. 2001. Determination of biomass composition in combined and separated biological aerated filter systems using respirometric methods. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> IWA International Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, Rome, Italy.
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P. and Liesack, W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(13): 4704-4712.
- Rutledge, R.G. 2004. Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications. *Nucleic Acids Research*, 32(22): e178.
- Ryden, J.C., Skinner, J.H. and Nixon, D.J. 1987. Soil core incubation system for the field measurement of denitrification using acetylene-inhibition. *Soil Biology & Biochemistry*, 19(6): 753-757.
- Sandén, B., Grunditz, C., Hansson, Y. and Dalhammar, G. 1994. Quantification and characterization of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* using monoclonal antibodies. *Water Science and Technology*, 29(7): 1-6.
- Sakano, Y. and Kerkhof, L. 1998. Assessment of changes in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12): 4877-4882.
- Scala, D.J. and Kerkhof, L.J. 1998. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiology Letters*, 162: 61-68.
- Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W.I.C., van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Damsté, J.S.S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M. and Strous, M. 2003. *Candidatus « Scalindua brodae »*, sp. nov., *Candidatus « Scalindua wagneri »*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 26: 529-538.
- Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J.W., Schleifer, K.-H. and Wagner, M. 2000. Molecular evidence for genus level

diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology* 23: 93-106.

- Schmidt, E.L. and Belser, L.W. 1982. Chapter 48 – Nitrifying bacteria. *In*: A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (Editors), *Methods of Soil Analysis*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp. 1027-1041.
- Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R. and Schleiffer, K.-H. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12): 4641-4647.
- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M. and Amann, R. 1998. Identification and activity *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3480-3485.
- Schramm, A., De Beer, D., van den Heuvel, J.C., Ottengraf, S. and Amann, R. 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8): 3690-3696.
- Seitzinger, S.P., Nielsen, L.P., Caffrey, J. and Christensen, P.B. 1993. Denitrification measurements in aquatic sediments: A comparison of three methods. *Biogeochemistry*, 23: 147-167.
- Sigunda, D. O. 2003. Potential denitrification: concept and conditions of its measurement. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34(17-18): 2405-2418.
- Spanjers, H. and Vanrolleghem, P.A. 1995. Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Science and Technology*, 31(2): 105-114.
- Steffan, R.J. and Atlas, R.M. 1991. Polymerase chain reaction: Applications in environmental microbiology. *Annual Review of Microbiology*, 45: 137-161.
- Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I. and Embley, M. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to  $\beta$ -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4147-4154.
- Surmacz-Gorska, J., Gernaey, K., Demuynck, C., Vanrolleghem, P. and Verstraete, W. 1996. Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Research*, 30(5): 1228-1236.
- Suzuki, M. T., Taylor, L. T. and DeLong, E. F. 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11): 4605-4614.

- Szwerinski, H., Gaiser, S. and Bardtke, D. 1985. Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria: interference of the test in biofilm reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21: 125-128.
- Tal, Y., Watts, J.E.M., Schreier, S.B., Sowers, K.R. and Schreier, H.J. 2003. Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. *Aquaculture*, 215: 187-202.
- Tebbe, C.C. and Vahjen, W. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8): 2657-2665.
- Teissier, S. and Torre, M. 2002. Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on freshwater epilithic biofilms by acetylene block method. *Water Research*, 36: 3803-3811.
- Therrien, R. 2003. Notes de cours GGL-21348: Analyse et modélisation des systèmes naturels. Département de géologie et génie géologique, Université Laval.
- Thorn, K.A. and Mikita, M.A. 2000. Nitrite fixation by humic substances: Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance evidence for potential intermediates in chemodenitrification. *Soil Science Society of American Journal*, 64: 568-582.
- Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, A. and Hallin, S. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3): 401-417.
- Tiedje, J.M. 1982. Chapter 47 – Denitrification. *In*: A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (Editors), *Methods of Soil Analysis*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp. 1011-1026.
- Tremblay, N. 2000. Optimisation de la période de démarrage d'un biofiltre à tourbe. Mémoire de maîtrise, Université Laval, Sainte-Foy, Canada.
- van de Graaf, A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M.S.M., Roberston, L.A. and Kuenen, J.G. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4): 1246-1251.
- van de Graaf, A., de Bruijn, P., Roberston, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of  $^{15}\text{N}$  studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 143: 2415-2421.
- Vanhooren, H., De Pauw, D. and Vanrolleghem, P.A. 2003. Induction of denitrification in a pilot-scale trickling filter by adding nitrate at high loading rate. *Water Science and Technology*, 47(11): 61-68.

- van Loosdrecht, M.C.M. and Jetten, M.S.M. 1998. Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Science and Technology*, 38(1): 1-7.
- Viraraghavan, T. and Ayyaswami, A. 1987. Use of peat in water pollution control: a review. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 14: 230-233.
- Voytek, M.A. and Ward, B.B. 1995. Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class *Proteobacteria* in aquatic samples with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4): 1444-1450.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. and Schleifer, K.-H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5): 1520-1525.
- Wagner, M., Noguera, D. R., Juretschko, S., Rath, G., Koops, H.-P. and Schleifer, K.-H. 1998. Combining fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with cultivation and mathematical modeling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge. *Water Science and Technology*, 37(4-5): 441-449.
- Watmough, N.J., Butland, G., Cheesman, M.R., Moir, J.W.B., Richardson, D.J. and Spiro, S. 1999. Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. *Biochimica et biophysica acta*, 1411: 456-474.
- Weber, J. 2005. Soil Humic Substances. <http://www.ar.wroc.pl/~weber/humic.htm>
- Well, R., Augustin, J., Meyer, K. and Myrold, D.D. 2003. Comparison of field and laboratory measurement of denitrification and N<sub>2</sub>O production in the saturated zone of hydromorphic soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 783-799.
- Wrage, N., Velthof, G. L., van Beusichem, M. L. and Oenema, O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry*, 33(12-13): 1723-1732.
- Wyffels, S., Pynaert, K., Boeckx, P., Verstraete, W. and Van Cleemput, O. 2003. Identification and quantification of nitrogen removal in a rotating biological contactor by <sup>15</sup>N tracer techniques. *Water Research*, 37: 1252-1259.
- Yoshinari, T. and Knowles, R. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 69(3): 705-710.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4): 533-616.

## **Annexe 1.**

### **Classification des tourbes selon l'échelle de "Von Post"**

Tableau A1. 1. Classification des tourbes selon l'échelle de Von Post

Humification selon Von Post	Description
H1	Tourbe complètement non-décomposée qui, lorsque pressée, laissera ressortir de l'eau presque claire. Les plantes demeurent facilement identifiables. Ne contient aucun matériel amorphe.
H2	Tourbe presque complètement non-décomposée qui, lorsque pressée, laissera ressortir de l'eau presque claire ou jaunâtre. Les plantes demeurent encore facilement identifiables et aucun matériel amorphe n'est présent.
H3	Tourbe légèrement décomposée qui, lorsque pressée, laissera ressortir de l'eau brunâtre, mais où ne passera aucune débris de tourbe entre les doigts. Les plantes demeurent encore identifiables et aucun matériel amorphe n'est présent.
H4	Tourbe peu décomposée qui, lorsque pressée, laissera ressortir de l'eau d'un brun foncé. Aucun débris de tourbe ne passera entre les doigts mais les plantes ont perdu de leurs caractères identifiables.
H5	Tourbe modérément décomposée qui, lorsque pressée, laissera ressortir de l'eau contenant du matériel organique et quelques particules de tourbe amorphe glisseront entre les doigts. La structure des plantes est presque non-identifiable malgré que certaines caractéristiques puissent être reconnues. Le résidu est fortement boueux.
H6	Tourbe assez décomposée ne laissant reconnaître aucune structure de plantes. Lorsque pressée, approximativement le tiers de la tourbe coulera entre les doigts. Le résidu est fortement boueux et laisse apparaître la structure des plantes plus ouvertement qu'avant le pressage.
H7	Tourbe fortement décomposée. Son contenu est composé de matériel amorphe à structure non identifiable. Lorsque pressée, la moitié de la tourbe coulera entre les doigts. L'eau, s'il en ressort, sera très foncée et boueuse.
H8	Tourbe très fortement décomposée avec une forte quantité de matériel amorphe et une structure planturale sèche et indistincte. Lorsque pressés, les deux tiers de la tourbe couleront entre les doigts. Une faible quantité d'eau boueuse pourrait en ressortir. Le matériel demeurant dans les mains est constitué de résidus racinaires, de fibres résistant à la décomposition.
H9	Tourbe presque totalement décomposée où l'on retrouve une structure difficilement identifiable. Lorsque pressée, la presque totalité de la tourbe coulera entre les doigts sous forme de boue.

Source: CQVB 1987

## **Annexe 2.**

### **Méthodes utilisées**

## A2.1 - Évaluation de la teneur en eau (TEE) d'un échantillon

1. Récolter un échantillon de milieu filtrant;
2. Peser exactement un creuset de céramique (Cr);
3. Déterminer le poids humide ( $E_H$ ) de l'échantillon dans ce creuset;
4. Faire sécher à 105°C pendant 24 heures;
5. Déterminer le poids sec ( $E_S$ ) de l'échantillon dans le creuset;
6. La teneur en eau humide ( $TEE_H$ ) de l'échantillon est déterminée par l'équation:

$$TEE_H = \frac{E_H - E_S}{E_H - Cr} * 100 \%$$

7. La teneur en eau sec ( $TEE_S$ ) de l'échantillon est déterminée par l'équation:

$$TEE_S = \frac{E_H - E_S}{E_S - Cr} * 100 \%$$

Pour un échantillon dont la capacité de rétention en eau est très importante, comme pour un échantillon de milieu filtrant organique, on trouvera des  $TEE_S$  autour de 300% et des  $TEE_H$  d'environ 75%. Cette dernière valeur a été utilisée lors des travaux pour transformer une masse humide de support en masse de matière sèche lorsque l'information n'était pas disponible.

## A2.2 - Préparation d'une solution d'agarose pour l'électrophorèse

1. Peser pour 50 mL de solution:

0,35 g d'agarose (0,7%)

0,5 g d'agarose (1%)

1,0 g d'agarose (2%)

et déposer dans un bécher de 250 mL;

2. Ajouter 50 mL de tampon TBE 1X;
3. Chauffer dans un micro-ondes jusqu'à dissolution totale de l'agarose environ 2,5 minutes en surveillant constamment et en agitant à intervalle régulier;
4. Laisser refroidir dans un bain à 60°C ou sur le comptoir jusqu'à environ 60°C;
5. Ajouter 1µL de bromure d'éthidium (10 mg/mL) et agiter manuellement pour mélanger;
6. Verser doucement le gel dans le moule à électrophorèse et enlever les bulles ayant pu apparaître à l'aide d'un embout de pipette jetable. Insérer le peigne approprié pour l'usage désiré;
7. Laisser reposer environ 30 minutes jusqu'à solidification du gel;
8. Placer le moule correctement dans le réservoir de l'appareil (les puits du côté de la cathode: fil noir).

### A2.3 - Préparation du tampon de chargement

Le tampon de chargement permet de colorer et de densifier l'échantillon d'ADN. La coloration facilite le suivi de la migration dans le gel tandis que la densité aide le transport des acides nucléiques jusqu'au fond des puits. Le bleu de bromophénol migre à la même vitesse que des brins de 200-400 pb d'ADN. En général, il est nécessaire d'attendre que le colorant ait atteint le  $\frac{3}{4}$  du gel avant d'arrêter le courant électrique, afin d'obtenir une bonne séparation des différentes longueurs d'ADN.

1. Dissoudre :

25 mg de Bleu de Bromophénol;  
4 g de Sucrose;

compléter à 10 mL d'H<sub>2</sub>O;

2. Conserver à 4°C. Cette solution devrait se conserver au moins 6 mois.

### A2.4 - Préparation du tampon de migration TBE

Le tampon de migration permet le passage du courant à travers le gel et facilite ainsi la migration des molécules. TBE signifie Tris-Borate-EDTA.

1. Dissoudre dans 1,9L d'eau distillée

218 g de base TRIS;  
110 g d'acide borique;  
9,3 g d'EDTA (éthylènediaminetriacétate);

2. Ajuster le pH à 8,3 avec du NaOH et compléter à 2L avec de l'eau distillée. Cette solution constitue un tampon TBE 10X. Pour obtenir 1L de TBE 1X, diluer 100 mL de TBE 10X avec 900 mL d'eau déminéralisée.

## A2.5 - Préparation des échantillons et électrophorèse

1. Transférer une quantité appropriée (10-100 ng) de l'échantillon d'ADN dans un tube microfuge propre;
2. Ajouter 0,2 volume de tampon de chargement (0,2 $\mu$ L par 10 $\mu$ L d'échantillon) et laisser l'embout dans le tube. Ce dernier sera utilisé pour le chargement du gel;
3. Charger le premier puits du gel avec un marqueur de taille. Ce dernier permettra de comparer la longueur des brins d'ADN de l'échantillon avec des bandes correspondants à des longueurs définies. Si possible, éviter d'utiliser les puits aux extrémités du gel, car ils sont le plus susceptibles de causer une migration inégale;
4. Continuer le chargement avec les échantillons d'ADN contenant le tampon de chargement. Noter l'ordre dans lequel les puits ont été remplis, car il est facile d'intervertir les résultats par la suite;
5. Terminer le chargement avec un dernier puits contenant le marqueur de taille si le nombre de puits utilisés est important;
6. Fermer le réservoir de l'appareil et démarrer un essai en soumettant le gel à un potentiel de 5V/cm ( $\sim$ 80V pour ce projet);
7. Vérifier que le courant est présent, par la formation de petites bulles aux électrodes, et s'assurer que la migration s'effectue dans la bonne direction;
8. Suivre la progression de la migration à l'aide du bleu de bromophénol. Arrêter l'essai lorsque le colorant de référence aura atteint environ le  $\frac{3}{4}$  de la longueur du gel;
9. Débrancher le réservoir de l'amplificateur de courant et observer les bandes à l'aide d'un transilluminateur UV (312 nm). Conserver l'image à l'aide d'un système d'acquisition d'images adapté à ce type d'observations.

## A2.6 - Digestion à la DNase

La DNase utilisée lors de ces travaux provenait de chez Sigma-Aldrich, dont voici quelques informations:

Deoxyribonuclease I – Amplification Grade

Product Code AMP-D1

Tous les détails de son utilisation sont décrits dans le bulletin technique No. MB-655, disponible chez Sigma-Aldrich.

Selon fournisseur :

1. Mettre 8  $\mu\text{l}$  de la solution à digérer dans un tube à PCR propre;
2. Ajouter 1  $\mu\text{l}$  du 10X Reaction Buffer;
3. Ajouter 1  $\mu\text{l}$  DNase (1 unité  $\mu\text{l}^{-1}$ );
4. Incuber 30 minutes à température pièce ( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ );
5. Chauffer à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes dans un bloc thermique (style PCR) pour inactiver la DNase;
6. Refroidir sur la glace et ranger à  $-20^{\circ}\text{C}$  les échantillons.

## A2.7 - Protocole de Clonage d'amplicons

### Création et purification des amplicons

1. Réaliser un PCR avec les amorces spécifiques au gène visé, sur le témoin positif;
2. Vérifier par migration sur gel d'agarose que les bandes obtenues correspondent à la longueur désirée;
3. Pooler les produits obtenus dans un tube propre;
4. Purifier les produits du PCR avec le kit Qiaquick PCR purification Kit de Qiagen selon la méthode du fournisseur;

### Ligation de l'ADN au vecteur

1. Décongeler le Mastermix de ligation et le vecteur pDrive Cloning sur la glace. Décongeler le milieu SOC;
2. Préparer le mélange suivant :
  - Vecteur 1  $\mu$ l
  - Produits PCR\* 4  $\mu$ l
  - H<sub>2</sub>O\* 0  $\mu$ l
  - Ligation Mix 5  $\mu$ l

\* La quantité de produits PCR à mettre dans le mélange doit correspondre à un ratio molaire de 5-10 fois plus de produits PCR que de vecteur (voir tableau 2 du fournisseur). Compléter le volume à 10  $\mu$ l avec de l'eau.

3. Mélanger très doucement et incubé 30 minutes à 10°C dans un bloc thermique de style PCR;

### Transformation cellulaire

1. Sortir sur la glace le nombre de tubes de cellules compétentes nécessaires et les conserver sur la glace tout le long des manipulations;
2. Ajouter 2  $\mu$ l de la mixture de ligation à un tube de cellules compétentes décongelées et agiter très doucement. Incuber sur la glace 5 minutes.
3. Chauffer les tubes à 45°C, 30 secondes, sans agitation;
4. Incuber sur la glace 2 minutes. Ce choc thermique permet la pénétration des vecteurs à l'intérieur des cellules compétentes;
5. Ajouter très délicatement 250  $\mu$ l de milieu SOC à température pièce et étaler 20  $\mu$ l et 100  $\mu$ l sur des géloses de LB Agar-Kanamycine;

6. Incuber à 37°C avec agitation pendant 30 minutes avant l'étalement;
7. Incuber à température pièce jusqu'à absorption par l'agar et inverser. Incuber ensuite à 37°C pendant 15 à 18 heures;
8. Observer les colonies et choisir celles dont la coloration est blanche ou bleue pâle. Ces dernières correspondent à des cellules ayant été transformées par un vecteur contenant un insert.

## A2.8 - Préparation des milieux LB pour l'isolation des clones

1. Préparer le milieu Luria-Bertani (LB) agar ou en bouillon selon les indications du fournisseur;
2. Autoclaver au cycle liquide, à 121°C pendant 15 minutes, par volumes de 300 mL;
3. Conserver à 4°C, au plus quelques semaines;
4. Préparer une solution de sulfate de kanamycine stérile à 50 mg mL<sup>-1</sup>;
  - Peser 0,50 g et dissoudre dans 10 mL d'eau déminéralisée
  - Filtrer la solution avec une seringue de 10 mL et un filtre 0,45 µm stériles et aliquoter dans des tubes de 1,5 mL
  - Ranger au congélateur
5. Préparer une solution d'isopropyl β-D-galactopyranoside (IPTG) stérile à 24 mg mL<sup>-1</sup>;
  - Peser 0,24 g d'IPTG et dissoudre dans 10 mL d'eau déminéralisée
  - Filtrer la solution avec une seringue de 10 mL et un filtre 0,45 µm stériles et aliquoter dans des tubes de 1,5 mL
  - Ranger au congélateur
6. Préparer une solution de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl β-D-galactopyranoside (X-gal) stérile à 40 mg mL<sup>-1</sup> dans du diméthylformamide;
  - Peser 0,10 g de X-gal et dissoudre dans 2,5 mL de diméthylformamide
  - Aliquoter dans 2 tubes de 1,5 mL
  - Ranger au congélateur
7. Pour du LB agar, faire fondre 300 mL de LB agar et laisser refroidir à 55°C. Ajouter stérilement 0,3 mL de sulfate de kanamycine (50 mg mL<sup>-1</sup>), 0,6 mL de X-gal (40 mg mL<sup>-1</sup>) et 0,15 mL d'IPTG (24 mg mL<sup>-1</sup>);
8. Pour du LB bouillon, sortir du réfrigérateur le milieu liquide et ajouter 0,3 mL de sulfate de kanamycine (50 mg mL<sup>-1</sup>).

## A2.9 - Extraction des acides nucléiques des échantillons environnementaux

### Pouzzolane

1. Comme décrit à la section 4.2.3, mettre le biofilm en suspension. Peser 150 g humide de pouzzolane et suspendre dans 1 L d'une solution isotonique (0,89 g NaCl L<sup>-1</sup>). Agiter vigoureusement quelques minutes pour bien décoller le biofilm du support;
2. Centrifuger, dans le même tube de 2 mL, 3 fois 2 mL de la suspension. Jeter le surnageant après chaque centrifugation;
3. Analyser la TEEh de la pouzzolane pour pouvoir calculer un nombre de copies de gène extrait en fonction de la masse sèche du support (voir calculs Annexe 4);
4. Ranger le culot à -20°C pour une extraction ultérieure;
5. Décongeler le culot à température pièce au moment désiré;
6. Ajouter 975 µl de Sodium Phosphate Buffer et 122 µl de MT Buffer fournis dans le kit FastPrep DNA Soil Isolation kit de Qbiogene;
7. Agiter brièvement à l'aide d'un vortex et transférer dans un tube d'extraction également fourni dans le kit;
8. Poursuivre le reste de l'extraction selon les indications du fournisseur.

### Milieu filtrant organique

1. Lors de l'échantillonnage du milieu filtrant pour l'évaluation de son activité nitrifiante et dénitrifiante potentielle, remplir un tube de 2 mL avec de la tourbe provenant de ce même échantillon et bien identifier.
2. Congeler l'échantillon à -20°C pour une extraction ultérieure;
3. Décongeler l'échantillon à température pièce au moment désiré. Peser entre 0,3 et 0,5 g humide de milieu filtrant et ajouter dans un tube d'extraction fourni dans le kit;
4. Poursuivre le reste de l'extraction selon les indications du fournisseur.

Que ce soit pour la pouzzolane ou le milieu filtrant organique, le « bead beating » n'a pas été réalisé à l'aide du FastPrep Instrument tel que prescrit par Qbiogene, mais plutôt avec un vortex conventionnel. Un support de styromousse a été installé verticalement sur ce dernier de manière à pouvoir y introduire les tubes d'extraction de manière horizontale. Le « bead beating » a été réalisé à vitesse maximale pendant 90 secondes.

### **Annexe 3.**

## **Analyses statistiques des résultats**

## A3.1 - Tests de l'égalité des moyennes

### Fisher et Student

Le texte intégral de ces méthodes est disponible aux adresses web suivantes:

<http://www.math-info.univ-paris5.fr/smel/cours/ts/ts.html>

<http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/nte/mathsv/cours/stats/chap7/c7p4/c7p4.html>

Les tests de Fisher et Student servent à comparer les moyennes et les variances de deux échantillons gaussiens. La question est de savoir si la différence observée est suffisante pour rejeter l'hypothèse  $H_0$  que le traitement n'a pas d'effet.

Pour le modèle probabiliste, on considère deux échantillons indépendants.

$(X_1, \dots, X_{n_x})$  est un échantillon de la loi  $N(\mu_x, \sigma_x^2)$ ,

$(Y_1, \dots, Y_{n_y})$  est un échantillon de la loi  $N(\mu_y, \sigma_y^2)$ .

On note :

$$\bar{X} = \frac{1}{n_x} \sum_{i=1}^{n_x} X_i \quad \bar{Y} = \frac{1}{n_y} \sum_{j=1}^{n_y} Y_j$$

et les moyennes empiriques,

$$S_x^2 = \frac{1}{n_x} \sum_{i=1}^{n_x} (X_i - \bar{X})^2 \quad S_y^2 = \frac{1}{n_y} \sum_{j=1}^{n_y} (Y_j - \bar{Y})^2$$

et les variances empiriques.

Le résultat théorique permettant de comparer les moyennes empiriques suppose que l'on fasse l'hypothèse que les variances théoriques  $\sigma_x^2$  et  $\sigma_y^2$  sont égales. Le but du test de Fisher est de tester cette hypothèse :

$$H_0 : \sigma_x^2 = \sigma_y^2 .$$

D'après un théorème statistique, les rapports des variances empiriques aux variances exactes suivent des lois du chi-deux. Le rapport pondéré de deux variables aléatoires indépendantes suivant des lois du chi-deux suit une loi de Fisher.

Le rapport

$$\frac{\frac{n_x}{n_x - 1} \frac{S_x^2}{\sigma_x^2}}{\frac{n_y}{n_y - 1} \frac{S_y^2}{\sigma_y^2}},$$

suit la loi de Fisher  $F(n_x - 1, n_y - 1)$ .

La statistique du test de Fisher est :

$$T = \frac{\frac{n_x}{n_x - 1} S_x^2}{\frac{n_y}{n_y - 1} S_y^2}.$$

Si  $H_0$  est exacte,  $T$  suit la loi  $F(n_x - 1, n_y - 1)$ . On rejettera  $H_0$  si la valeur observée pour  $T$  est trop grande ou trop petite. C'est donc un test bilatéral dont la règle de rejet au seuil  $\alpha$  est:

Rejet de  $H_0 \iff T \notin [Q_{\mathcal{F}(n_x-1, n_y-1)}(\alpha/2), Q_{\mathcal{F}(n_x-1, n_y-1)}(1 - \alpha/2)]$ .

Donc, si la valeur absolue de  $T$  est supérieure à  $F_{\text{seuil}}$ , pour un seuil  $\alpha$  donné (Tableau 3.2), on rejette  $H_0$ : les variances sont différentes.

Sous l'hypothèse d'égalité des variances, le théorème suivant permet d'évaluer les différences entre moyennes empiriques.

Si  $\sigma_x = \sigma_y$ , la variable aléatoire :

$$\frac{\sqrt{n_x + n_y - 2} (\bar{X} - \bar{Y}) - (\mu_x - \mu_y)}{\sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}} \sqrt{n_x S_x^2 + n_y S_y^2}},$$

suit la loi de Student  $T(n_x + n_y - 2)$ .

Ce résultat permet de tester l'hypothèse :

$$\mathcal{H}_0 : \mu_x = \mu_y ,$$

en comparant la valeur prise par la statistique :

$$\frac{\sqrt{n_x + n_y - 2} (\bar{X} - \bar{Y})}{\sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}} \sqrt{n_x S_x^2 + n_y S_y^2}} ,$$

aux quantiles de la loi de Student  $T(n_x + n_y - 2)$ .  $T$  calculée ( $T_{\text{obs}}$ ) est comparée avec la valeur  $T_{\text{seuil}}$  lue dans la table de Student (Tableau A3.1). Pour un risque d'erreur  $\alpha$  fixé et  $(n_1 + n_2 - 2)$  degrés de liberté:

- si  $T_{\text{obs}} > T_{\text{seuil}}$ , l'hypothèse  $H_0$  est rejetée au risque d'erreur  $\alpha$  : les deux échantillons sont extraits de deux populations ayant des espérances respectivement  $\mu_1$  et  $\mu_2$ .
- si  $T_{\text{obs}} \leq T_{\text{seuil}}$ , l'hypothèse  $H_0$  est acceptée: les deux échantillons sont extraits de deux populations ayant la même espérance  $\mu$ .

Pour l'application de ce test, il est impératif que  $X \rightarrow N(\mu, \sigma)$  pour les échantillons de taille  $< 30$ , que les deux échantillons soient indépendants et que les deux variances estimées soient égales.

Si les variances des populations ne sont pas connues et si leurs estimations à partir des échantillons sont significativement différentes (test de comparaison des variances), il faut considérer deux cas de Figure selon la taille des échantillons comparés :

- les grands échantillons avec  $n_1$  et  $n_2$  supérieurs à 30.
- les petits échantillons avec  $n_1$  et/ou  $n_2$  inférieurs à 30.

**Cas où  $n_1$  et  $n_2 \geq 30$** 

La statistique utilisée est la même que pour le cas où les variances sont connues.

Sous  $H_0 : \mu_1 = \mu_2$

$$Z = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}} \quad \text{suit une loi normale centrée réduite } N(0,1)$$

Comme les variances sont inconnues et significativement différentes  $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$ , on remplace les variances des populations par leurs estimations ponctuelles calculées à partir des échantillons,

$$\hat{\sigma}_1^2 = \frac{n_1}{n_1 - 1} s_1^2 \quad \text{et} \quad \hat{\sigma}_2^2 = \frac{n_2}{n_2 - 1} s_2^2$$

L'hypothèse testée est la suivante :

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 \quad \text{contre} \quad H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

Une valeur  $z$  de la variable aléatoire  $Z$  est calculée :

$$z = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1 - 1} + \frac{s_2^2}{n_2 - 1}}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{\hat{\sigma}_1^2}{n_1} + \frac{\hat{\sigma}_2^2}{n_2}}}$$

$z$  calculée ( $z_{\text{obs}}$ ) est comparée avec la valeur  $z_{\text{seuil}}$  lue sur la table de la loi normale centrée réduite pour un risque d'erreur  $\alpha$  fixé.

- si  $z_{\text{obs}} > z_{\text{seuil}}$ , l'hypothèse  $H_0$  est rejetée au risque d'erreur  $\alpha$ : les deux échantillons sont extraits de deux populations ayant des espérances respectivement  $\mu_1$  et  $\mu_2$ .

- si  $Z_{\text{obs}} \leq Z_{\text{seuil}}$ , l'hypothèse  $H_0$  est acceptée: les deux échantillons sont extraits de deux populations ayant même espérance  $\mu$ .

Remarque : Pour l'application de ce test, il est impératif que les deux échantillons soient indépendants.

Lorsque les variances sont inégales, la loi de probabilité suivie par  $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$  n'est pas connue, mais peut être estimée à l'aide du test de Welch (Côté et Morin 1999).

### Welch

Soit

$(X_1, \dots, X_{n_x})$  est un échantillon de la loi  $N(\mu_x, \sigma_x^2)$ ,

$(Y_1, \dots, Y_{n_y})$  est un échantillon de la loi  $N(\mu_y, \sigma_y^2)$ .

On note :

$$\bar{X} = \frac{1}{n_x} \sum_{i=1}^{n_x} X_i \quad \bar{Y} = \frac{1}{n_y} \sum_{j=1}^{n_y} Y_j$$

et les moyennes empiriques,

$$S_x^2 = \frac{1}{n_x} \sum_{i=1}^{n_x} (X_i - \bar{X})^2 \quad S_y^2 = \frac{1}{n_y} \sum_{j=1}^{n_y} (Y_j - \bar{Y})^2$$

et les variances empiriques.

On veut vérifier que

$$\mathcal{H}_0 : \mu_x = \mu_y ,$$

La statistique utilisée est:

$$\bar{X} \rightarrow N\left(\mu_x, \frac{\sigma_x^2}{n_x}\right)$$

$$\bar{Y} \rightarrow N\left(\mu_y, \frac{\sigma_y^2}{n_y}\right)$$

$$\bar{X} - \bar{Y} \rightarrow N\left(\mu_x - \mu_y, \frac{\sigma_x^2}{n_x} + \frac{\sigma_y^2}{n_y}\right)$$

$$\frac{\bar{X} - \bar{Y} - (\mu_x - \mu_y)}{\sqrt{\frac{\sigma_x^2}{n_x} + \frac{\sigma_y^2}{n_y}}}$$

Il faut estimer à la fois  $\sigma_x^2$  et  $\sigma_y^2$ . On pose:

$$T^* = \frac{\bar{X} - \bar{Y} - (\mu_x - \mu_y)}{\sqrt{\frac{S_x^2}{n_x} + \frac{S_y^2}{n_y}}}$$

La loi  $T^*$  n'est pas une loi de Student, mais sa loi est très bien approximée par une loi de Student dont le degré de liberté est  $dl$  :

$$dl = \frac{\left(\frac{S_x^2}{n_x} + \frac{S_y^2}{n_y}\right)^2}{\left(\frac{S_x^2}{n_x}\right) / (n_x - 1) + \left(\frac{S_y^2}{n_y}\right) / (n_y - 1)}$$

Le nombre  $dl$  n'est pas toujours un entier ; l'approximation encourue en arrondissant à l'entier le plus près est acceptable.

T' calculée ( $T_{\text{obs}}$ ) est comparée avec la valeur  $T_{\text{seuil}}$  lue dans la table de Student (Tableau A3.1). Pour un risque d'erreur  $\alpha$  fixé et  $dl$  degrés de liberté:

- si  $T_{\text{obs}} > T_{\text{seuil}}$ , l'hypothèse  $H_0$  est rejetée au risque d'erreur  $\alpha$  : les deux échantillons sont extraits de deux populations ayant des espérances respectivement  $\mu_1$  et  $\mu_2$ .
- si  $T_{\text{obs}} \leq T_{\text{seuil}}$ , l'hypothèse  $H_0$  est acceptée: les deux échantillons sont extraits de deux populations ayant la même espérance  $\mu$ .

TableauA3.1. Table des quantiles d'une variable de Student à n degrés de liberté

	ordre du quantile			
	0.95	0.975	0.99	0.995
n=1	6.314	12.71	31.82	63.66
2	2.920	4.303	6.965	9.925
3	2.353	3.182	4.541	5.841
4	2.132	2.776	3.747	4.604
5	2.015	2.571	3.365	4.032
6	1.943	2.447	3.143	3.707
7	1.895	2.365	2.998	3.499
8	1.860	2.306	2.896	3.355
9	1.833	2.262	2.821	3.250
10	1.812	2.228	2.764	3.169
11	1.796	2.201	2.718	3.106
12	1.782	2.179	2.681	3.055
13	1.771	2.160	2.650	3.012
14	1.761	2.145	2.624	2.977
15	1.753	2.131	2.602	2.947
16	1.746	2.120	2.583	2.921
17	1.740	2.110	2.567	2.898
18	1.734	2.101	2.552	2.878
19	1.729	2.093	2.539	2.861
20	1.725	2.086	2.528	2.845
21	1.721	2.080	2.518	2.831
22	1.717	2.074	2.508	2.819
23	1.714	2.069	2.500	2.807
24	1.711	2.064	2.492	2.797
25	1.708	2.060	2.485	2.787
26	1.706	2.056	2.479	2.779
27	1.703	2.052	2.473	2.771
28	1.701	2.048	2.467	2.763
29	1.699	2.045	2.462	2.756
30	1.697	2.042	2.457	2.750
31	1.696	2.040	2.453	2.744
32	1.694	2.037	2.449	2.738
33	1.692	2.035	2.445	2.733
34	1.691	2.032	2.441	2.728
35	1.690	2.030	2.438	2.724
36	1.688	2.028	2.434	2.719
37	1.687	2.026	2.431	2.715
38	1.686	2.024	2.429	2.712
39	1.685	2.023	2.426	2.708
40	1.684	2.021	2.423	2.704
50	1.676	2.009	2.403	2.678
60	1.671	2.000	2.390	2.660
70	1.667	1.994	2.381	2.648
80	1.664	1.990	2.374	2.639
90	1.662	1.987	2.368	2.632
100	1.660	1.984	2.364	2.626
120	1.658	1.980	2.358	2.617
$\infty$	1.645	1.960	2.327	2.576

Source: [http://www.unine.ch/statappl/statistique\\_psychol.pdf](http://www.unine.ch/statappl/statistique_psychol.pdf)

TableauA3. 2. Quantiles de la loi de Fisher au seuil 0,05

**(seuil de risque  $\alpha = 0,05$ )**

<b>DL 2</b>	<b>DL 1</b>									<b>inf.</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	
<b>1</b>	161	199	216	225	230	234	239	244	249	254
<b>2</b>	18,5	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,5	19,5
<b>3</b>	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,84	8,74	8,64	8,53
<b>4</b>	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,04	5,91	5,77	5,63
<b>5</b>	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,82	4,68	4,53	4,36
<b>6</b>	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,15	4,00	3,84	3,67
<b>7</b>	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,73	3,57	3,41	3,21
<b>8</b>	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,44	3,28	3,12	2,93
<b>9</b>	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,23	3,07	2,90	2,71
<b>10</b>	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,07	2,90	2,74	2,54
<b>11</b>	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,10	2,95	2,79	2,61	2,40
<b>12</b>	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,85	2,69	2,51	2,30
<b>13</b>	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,77	2,60	2,42	2,21
<b>14</b>	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,70	2,53	2,35	2,13
<b>15</b>	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,64	2,48	2,29	2,07
<b>16</b>	4,50	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,59	2,42	2,24	2,01
<b>17</b>	4,45	3,59	3,19	2,96	2,81	2,70	2,55	2,38	2,20	1,96
<b>18</b>	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,51	2,34	2,15	1,92
<b>19</b>	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,48	2,31	2,11	1,88
<b>20</b>	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,45	2,28	2,08	1,84
<b>21</b>	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,42	2,25	2,05	1,81
<b>22</b>	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,40	2,23	2,03	1,78
<b>23</b>	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,38	2,20	2,00	1,76
<b>24</b>	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,35	2,18	1,98	1,73
<b>25</b>	4,24	3,38	2,99	2,76	2,60	2,49	2,34	2,16	1,96	1,71
<b>26</b>	4,22	3,37	2,97	2,74	2,59	2,47	2,32	2,15	1,95	1,69
<b>27</b>	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,31	2,13	1,93	1,67
<b>28</b>	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,29	2,12	1,91	1,65
<b>29</b>	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,28	2,10	1,90	1,64
<b>30</b>	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,27	2,09	1,89	1,62
<b>60</b>	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,10	1,92	1,70	1,39
<b>inf.</b>	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	1,94	1,75	1,52	1,00

Source: <http://www.bioinfo.univ-rennes1.fr/nrc04/exos/Tables/table-f.xls>

TableauA3. 3. Quantiles de la loi de Fisher au seuil 0,01

**(seuil de risque alpha = 0,01)**

	<b>DL 1</b>									
<b>DL 2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>inf.</b>
<b>1</b>	4050	5000	5400	5620	5760	5860	5980	6110	6230	6370
<b>2</b>	98,5	99,0	99,2	99,2	99,3	99,3	99,3	99,4	99,4	99,5
<b>3</b>	34,1	30,8	29,4	28,7	28,2	27,9	27,4	27,2	26,6	26,1
<b>4</b>	21,2	18,0	16,7	16,0	15,5	15,2	14,8	14,4	13,9	13,5
<b>5</b>	16,3	13,3	12,1	11,4	11,0	10,7	10,3	9,89	9,47	9,02
<b>6</b>	13,7	10,9	9,78	9,15	8,74	8,47	8,10	7,72	7,31	6,88
<b>7</b>	12,3	9,55	8,45	7,85	7,45	7,19	6,84	6,47	6,07	5,65
<b>8</b>	11,2	8,64	7,59	7,01	6,63	6,37	6,03	5,67	5,28	4,86
<b>9</b>	10,5	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,47	5,11	4,73	4,31
<b>10</b>	10,0	7,56	6,55	5,99	5,63	5,39	5,06	4,71	4,33	3,91
<b>11</b>	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,74	4,40	4,02	3,60
<b>12</b>	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,50	4,16	3,78	3,36
<b>13</b>	9,07	6,70	5,74	5,20	4,86	4,62	4,30	3,96	3,59	3,17
<b>14</b>	8,86	6,51	5,56	5,03	4,69	4,45	4,14	3,80	3,43	3,00
<b>15</b>	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,00	3,67	3,29	2,87
<b>16</b>	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	3,89	3,55	3,18	2,65
<b>17</b>	8,40	6,11	5,19	4,67	4,34	4,10	3,79	3,45	3,08	2,65
<b>18</b>	8,28	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,71	3,37	3,00	2,57
<b>19</b>	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,63	3,29	2,92	2,49
<b>20</b>	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,56	3,23	2,86	2,42
<b>21</b>	8,02	5,78	4,87	4,37	4,04	3,81	3,51	3,17	2,80	2,36
<b>22</b>	7,95	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,45	3,12	2,75	2,31
<b>23</b>	7,88	5,66	4,76	4,26	3,94	3,71	3,41	3,07	2,70	2,26
<b>24</b>	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,36	3,03	2,66	2,21
<b>25</b>	7,77	5,57	4,68	4,18	3,86	3,63	3,32	2,99	2,62	2,17
<b>26</b>	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,29	2,96	2,58	2,13
<b>27</b>	7,68	5,49	4,60	4,11	3,78	3,56	3,26	2,93	2,55	2,10
<b>28</b>	7,64	5,45	4,57	4,07	3,75	3,53	3,23	2,89	2,52	2,06
<b>29</b>	7,60	5,42	4,54	4,04	3,73	3,50	3,20	2,87	2,49	2,03
<b>30</b>	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,17	2,84	2,47	2,01
<b>60</b>	7,08	4,98	4,12	3,65	3,34	3,12	2,82	2,50	2,12	1,60
<b>Inf.</b>	6,64	4,61	3,78	3,32	3,02	2,80	2,51	2,19	1,79	1,00

Source: <http://www.bioinfo.univ-rennes1.fr/nfe04/exos/Tables/table-f.xls>

### A3.2 - Méthode de Huber

La méthode de Huber permet de déterminer si une valeur, dans une population donnée, est aberrante. Elle va comme suit:

Soit un EAS donné  $(x_1, x_2, \dots, x_n)$

- Ordonner cet EAS et déterminer M, la médiane;
- Calculer les DA, les n Déviations Absolues  $|x_i - M|$ ,  $i = 1, 2, \dots, n$ ;
- Ordonner les DA et déterminer la DAM, la Déviation Absolue Médiane;

Alors, sont déclarées statistiquement aberrantes toutes les observations qui sont en dehors de l'intervalle suivant, et où  $k$  est choisi arbitrairement et constitue le seuil de sécurité de la méthode:

$$M \pm k.DAM \quad \text{où } 3 \leq k \leq 5$$

Remarques:

Une observation ne devrait pas être déclarée aberrante seulement sur la base d'une méthode statistique. La décision doit reposer, en grande partie, sur l'expérience scientifique.

Si une observation ne devrait pas être déclarée aberrante, on devrait faire l'analyse prévue 2 fois, une fois avec les  $n$  observations et une autre fois sans les données aberrantes. De plus, les données aberrantes doivent être notées différemment dans la liste des observations et sur les graphiques.

Lorsqu'une donnée est déclarée aberrante, on doit fournir les raisons aux lecteurs du rapport scientifique (Côté 1996).

### A3.3 - Précision de la méthode

La précision d'une méthode est évaluée par l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en utilisant la méthode à plusieurs reprises dans des conditions expérimentales semblables. Ainsi, la précision serait maximale si la méthode donnait toujours la même valeur. Une mesure de la précision d'une méthode est  $\sigma^2$ , la variance théorique d'une méthode.

Puisque la valeur de  $\sigma^2$  est généralement inconnue, on estime  $\sigma^2$  par la variance expérimentale  $s^2$ , définie comme

$$s^2 = \frac{1}{n-1} (\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})$$

où  $s^2$  = variance expérimentale

$n$  = nombre d'observations

$x$  = observation

Souvent, on a besoin d'obtenir une mesure de la variabilité des observations (mesurée par  $s$ ) relative au niveau des observations. Par exemple, une variabilité de 1 mL sur des mesures dont le niveau est de 5 mL est plus grande que celle de 1 mL sur des mesures dont le niveau est de 100 mL. Une telle mesure de la variabilité relative est donnée par le coefficient de variation (CV), généralement exprimé en %.

$$CV = \frac{s}{\text{moyenne}} * 100$$

On dit alors que la dispersion des observations représente X% de la moyenne expérimentale. Ainsi, plus le coefficient de variation est faible, plus une méthode est considérée comme étant précise. Toutefois, la précision d'une méthode ne signifie pas nécessairement que celle-ci est juste dans sa mesure (Côté 1996).

### A3.4 - Test du coefficient de corrélation (T-test)

Lorsque le nombre de mesures est très abondant, il est probable qu'une valeur même assez faible de  $R_{x,y}$  d'une droite de régression soit l'indication d'une relation assez lâche, mais réelle entre les deux variables. Si au contraire, le nombre de mesures est peu élevé, il peut arriver qu'une valeur de  $R_{x,y}$ , même voisine de  $\pm 1$  soit causée par le hasard de l'échantillonnage et ne révèle aucune liaison significative. Il est donc indispensable de savoir avec quelle précision le coefficient de corrélation a été estimé et particulièrement de pouvoir tester par rapport à zéro la valeur de R calculée. Le peu d'échantillon (<30) favorise l'utilisation du *T-test* qui pose comme hypothèse  $H_0$  que les variables sont totalement indépendante, soit  $R_{x,y} = 0$ .

Ainsi, en posant l'hypothèse que si

$$H_0 : R_{x,y} = 0$$

est vrai, alors

$$T = \frac{R \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-R^2)}}$$

où n = nombre de couples (x,y).

Par la suite, la comparaison de la valeur de T calculée avec la valeur T des tables de Student à (n-2) degré de liberté permet d'accepter ou de rejeter  $H_0$  à partir de la valeur R calculée pour les courbes de régression. Si le T calculé est plus faible que le T théorique, on accepte  $H_0$ , ce qui signifie que les valeurs sont indépendantes. Le tableau A3.3 présente, pour des nombres de couples variables, les limites des coefficients de corrélation acceptable.

TableauA3.4. Tableau des valeurs limites acceptables des coefficients de corrélation

Nombre de couples (x,y)	Degrés de liberté	R Seuil $\alpha = 0,05^a$	R Seuil $\alpha = 0,01$	R Seuil $\alpha = 0,001$
5	3	0,88	0,96	0,992
10	8	0,64	0,77	0,88
17	15	0,49	0,62	0,73
19	17	0,46	0,58	0,70
20	18	0,45	0,57	0,68
21	19	0,44	0,55	0,67
22	20	0,43	0,54	0,66
23	21	0,42	0,53	0,65
24	22	0,41	0,52	0,63
25	23	0,40	0,51	0,62

<sup>a</sup> De façon générale, pour savoir s'il existe une dépendance entre deux paramètres, le seuil  $\alpha = 0,05$  a été utilisé. Les autres seuils sont utilisés afin de qualifier la corrélation de "faible à élevée".

### A3.5 - Analyses statistiques des données du Chapitre 3

#### Effet du chlorate sur la respiration hétérotrophe

	rO <sub>2</sub> C (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> Chlorate (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	1,3312	1,2117
	1,6674	1,4696
	1,8097	
	2,004	
	2,087	
n	5,00	2,00
Moyenne	1,78	1,34
Variance	0,0899	0,0333
Écart-type	0,30	0,18
CV	0,17	0,14

#### Comparaison des deux échantillons: (F test)

	rO <sub>2</sub> C	rO <sub>2</sub> Chlorate	
Variance	0,09	0,03	
Degré de liberté	4,00	1,00	
Ratio variance			
Prob F	0,848		<u>Variance homogène</u>

#### Comparaison des moyennes (T-test)

	rO <sub>2</sub> C	rO <sub>2</sub> Chlorate
n	5,00	2,00
Sum	8,90	2,68
Moyenne	1,78	1,34
Variance*n-1	0,36	0,03
S <sup>2</sup>	0,08	
S	0,28	

t obs	1,87	
Degré de liberté	5,00	<u>Les moyennes sont similaires</u>
Table student 5 %	2,57	

### Effet de l'azide sur la respiration hétérotrophe

	rO <sub>2</sub> C (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> Azide (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	1,3312	1,7242
	1,6674	1,7933
	1,8097	1,8434
	2,004	
	2,087	
n	5,00	3,00
Moyenne	1,78	1,79
Variance	0,0899	0,0036
Écart-type	0,30	0,06
CV	0,17	0,03

#### Comparaison des deux échantillons: (F test)

	rO <sub>2</sub> Endo	rO <sub>2</sub> Azide
Variance	0,0899	0,0036
Degré de liberté	4,00	2,00

Ratio variance

Prob F 0,077

Variance homogène

#### Comparaison des moyennes (T-test)

	rO <sub>2</sub> C	rO <sub>2</sub> Azide
n	5,00	3,00
Sum	8,90	5,36
Moyenne	1,78	1,79
Variance*n-1	0,36	0,01
S <sup>2</sup>	0,06	
S	0,25	

t obs 0,04

Degré de liberté 6,00

Table student 5 % 2,45

Les moyennes sont similaires

**Effet de l'eau sur la respiration endogène**

	rO <sub>2</sub> endo (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> eau (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	0,5466	0,6061
	0,5963	0,661
	0,6562	0,6562
	0,6303	0,6178
	0,5321	0,6137
	0,6142	0,6988
n	6,00	6,00
Moyenne	0,60	0,64
Variance	0,0023	0,0013
Écart-type	0,05	0,04
CV	0,08	0,06

**Comparaison des deux échantillons:  
(F test)**

	rO <sub>2</sub> Endo	rO <sub>2</sub> eau
Variance	0,0023	0,0013
Degré de liberté	5,00	5,00

Ratio variance

Prob F 0,555

Variance homogène**Comparaison des moyennes  
(T-test)**

	rO <sub>2</sub> endo	rO <sub>2</sub> eau
n	6,00	6,00
Sum	3,58	3,85
Moyenne	0,60	0,64
Variance*n-1	0,01	0,01
S <sup>2</sup>	0,00	
S	0,04	

t obs 1,88  
 Degré de liberté 10,00  
 Table student 5 % 2,23

Les moyennes sont similaires

**Effet du chlorate sur la respiration endogène**

	rO <sub>2</sub> Endo (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> Chlorate (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	0,5466	0,5897
	0,5963	0,5985
	0,6562	0,5901
	0,6303	
	0,5321	
	0,6142	
n	6,00	3,00
Moyenne	0,60	0,59
Variance	0,0023	0,0000
Écart-type	0,05	0,00
CV	0,08	0,01

**Comparaison des deux échantillons:  
(F test)**

	rO <sub>2</sub> Endo	rO <sub>2</sub> Chlorate
Variance	0,00233	0,000247
Degré de liberté	5,00	2,00
Ratio variance		
Prob F	0,021	<u>Variance non-homogène</u>

On utilise donc le test de Welch.

**Test d'égalité des espérances : deux observations de variances différentes**

	rO <sub>2</sub> Endo	rO <sub>2</sub> Chlorate
Moyenne	0,59595	0,592766667
Variance	0,002331083	2,46933E-05
Observations	6	3
Différence hypothétique des moyennes	0	
Degré de liberté	5	
Statistique t	0,159818267	
P(T<=t) unilatéral	0,439639944	
Valeur critique de t (unilatéral)	2,015049176	
P(T<=t) bilatéral	0,879279888	
Valeur critique de t (bilatéral)	2,570577635	

Moyennes similaires

### Effet de l'azide sur la respiration endogène

	rO <sub>2</sub> Endo (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> Azide (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	0,5466	0,5153
	0,5963	0,4812
	0,6562	0,5377
	0,6303	
	0,5321	
	0,6142	
n	6,00	3,00
Moyenne	0,60	0,51
Variance	0,0023	0,0008
Écart-type	0,05	0,03
CV	0,08	0,06

### Comparaison des deux échantillons: (F test)

	rO <sub>2</sub> Endo	rO <sub>2</sub> Azide
Variance	0,0023	0,0008
Degré de liberté	5,00	2,00

Ratio variance

Prob F 0,555

Variance homogène

### Comparaison des moyennes (T-test)

	rO <sub>2</sub> Endo	rO <sub>2</sub> Azide
n	6,00	3,00
Sum	3,58	1,53
Moyenne	0,60	0,51
Variance*n-1	0,01	0,00
S <sup>2</sup>	0,00	
S	0,04	

t obs 2,75

Degré de liberté 7,00

Table student 5 % 2,36

Les moyennes sont différentes

### Effet du $\text{NO}_2^-$ sur la respiration endogène lors de la compartimentation

	rO <sub>2</sub> Endo (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> NO <sub>2</sub> (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	0,7765	0,672
	2,4802	1,7513
	0,6213	1,2271
	0,8195	0,8103
	1,1117	0,892
	1,2931	0,9519
n	6,00	6,00
Moyenne	1,18	1,05
Variance	0,4626	0,1516
Écart-type	0,68	0,39
CV	0,57	0,37

#### Comparaison des deux échantillons: (F test)

	rO <sub>2</sub> Endo	rO <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>
Variance	0,46	0,15
Degré de liberté	5,00	5,00

Ratio variance

Prob F 0,246

Variance homogène

#### Comparaison des moyennes (T-test)

	rO <sub>2</sub> Endo	rO <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>
n	6,00	6,00
Sum	7,10	6,30
Moyenne	1,18	1,05
Variance*n-1	2,31	0,76
S <sup>2</sup>	0,31	
S	0,55	

t obs 0,42

Degré de liberté 10,00

Table student 5 % 2,23

Les moyennes sont similaires

### Effet du $\text{NH}_4^+$ sur l'activité de la biomasse lors de la compartimentation

	$r\text{O}_2 \text{ NO}_2$ ( $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1}$ )	$r\text{O}_2 \text{ NH}_4$ ( $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1}$ )
	0,672	1,0899
	1,7513	1,8619
	1,2271	1,982
	0,8103	1,4225
	0,892	1,3827
	0,9519	1,4706
n	6,00	6,00
Moyenne	1,05	1,53
Variance	0,1516	0,1090
Écart-type	0,39	0,33
CV	0,37	0,22

#### Comparaison des deux échantillons: (F test)

	$r\text{O}_2 \text{ NO}_2$	$r\text{O}_2 \text{ NH}_4$
Variance	0,15	0,11
Degré de liberté	5,00	5,00

Ratio variance

Prob F 0,726

Variance homogène

#### Comparaison des moyennes (T-test)

	$r\text{O}_2 \text{ NO}_2$	$r\text{O}_2 \text{ NH}_4$
n	6,00	6,00
Sum	6,30	9,21
Moyenne	1,05	1,53
Variance*n-1	0,76	0,54
$S^2$	0,13	
S	0,36	

t obs 2,32

Degré de liberté 10,00

Table student 5 % 2,23

Les moyennes sont différentes

### Effet du carbone sur l'activité de la biomasse lors de la compartimentation

	rO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> C (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	1,0899	2,3522
	1,8619	2,4847
	1,982	3,4902
	1,4225	2,644
	1,3827	2,3019
	1,4706	2,4829
n	6,00	6,00
Moyenne	1,53	2,63
Variance	0,1090	0,1935
Écart-type	0,33	0,44
CV	0,22	0,17

#### Comparaison des deux échantillons: (F test)

	rO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	rO <sub>2</sub> C
Variance	0,11	0,19
Degré de liberté	5,00	5,00

Ratio variance

Prob F 0,544

Variance homogène

#### Comparaison des moyennes (T-test)

	rO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	rO <sub>2</sub> C
n	6,00	6,00
Sum	9,21	15,76
Moyenne	1,53	2,63
Variance*n-1	0,54	0,97
S <sup>2</sup>	0,15	
S	0,39	

t obs 4,86

Degré de liberté 10,00

Table student 5 % 2,23

Les moyennes sont différentes

### Effet de l'ATU sur l'activité de la biomasse lors de la compartimentation

	rO <sub>2</sub> C (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> ATU (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	2,3522	1,4287
	2,4847	1,564
	3,4902	2,0255
	2,644	1,8492
	2,3019	1,5671
	2,4829	1,6544
n	6,00	6,00
Moyenne	2,63	1,68
Variance	0,1935	0,0476
Écart-type	0,44	0,22
CV	0,17	0,13

#### Comparaison des deux échantillons: (F test)

	rO <sub>2</sub> C	rO <sub>2</sub> ATU
Variance	0,19	0,05
Degré de liberté	5,00	5,00

Ratio variance

Prob F 0,150

Variance homogène

#### Comparaison des moyennes (T-test)

	rO <sub>2</sub> C	rO <sub>2</sub> ATU
n	6,00	6,00
Sum	15,76	10,09
Moyenne	2,63	1,68
Variance*n-1	0,97	0,24
S <sup>2</sup>	0,12	
S	0,35	

t obs 4,71

Degré de liberté 10,00

Table student 5 % 2,23

Les moyennes sont différentes

### Effet du chlorate sur l'activité de la biomasse lors de la compartimentation

	rO <sub>2</sub> Chlorate (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> ATU (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	1,3187	1,4287
	1,2706	1,564
	1,6341	2,0255
		1,8492
		1,5671
		1,6544
n	3,00	6,00
Moyenne	1,41	1,68
Variance	0,0390	0,0476
Écart-type	0,20	0,22
CV	0,14	0,13

#### Comparaison des deux échantillons: (F test)

	rO <sub>2</sub> Chlorate	rO <sub>2</sub> ATU
Variance	0,0390	0,0476
Degré de liberté	2,00	5,00

Ratio variance

Prob F 0,985

Variance homogène

#### Comparaison des moyennes (T-test)

	rO <sub>2</sub> Chlorate	rO <sub>2</sub> ATU
n	3,00	6,00
Sum	4,22	10,09
Moyenne	1,41	1,68
Variance*n-1	0,08	0,24
S <sup>2</sup>	0,05	
S	0,21	

t obs 1,82

Degré de liberté 7,00

Table student 5 % 2,36

Les moyennes sont similaires

### Effet de l'azide sur l'activité de la biomasse lors de la compartimentation

	rO <sub>2</sub> Azide (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> ATU (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )
	1,6575	1,4287
	1,3476	1,564
	1,3422	2,0255
		1,8492
		1,5671
		1,6544
n	3,00	6,00
Moyenne	1,45	1,68
Variance	0,0326	0,0476
Écart-type	0,18	0,22
CV	0,12	0,13

#### Comparaison des deux échantillons: (F test)

	rO <sub>2</sub> Azide	rO <sub>2</sub> ATU
Variance	0,0326	0,0476
Degré de liberté	2,00	5,00

Ratio variance

Prob F 0,908

Variance homogène

#### Comparaison des moyennes (T-test)

	rO <sub>2</sub> Azide	rO <sub>2</sub> ATU
n	3,00	6,00
Sum	4,35	10,09
Moyenne	1,45	1,68
Variance*n-1	0,07	0,24
S <sup>2</sup>	0,04	
S	0,21	

t obs 1,58

Degré de liberté 7,00

Table student 5 % 2,36

Les moyennes sont similaires

### A3.6 – Test de Pearson

Le coefficient de corrélation de Pearson entre les caractères X et Y est une mesure de leur association linéaire. Il est noté  $r_{xy}$ , et il est calculé à partir de  $n$  paires d'observations  $((x_1, y_1), (x_2, y_2), (x_3, y_3), \dots, (x_n, y_n))$ :

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Les deux séries de données  $(x_1 \dots x_n)$  et  $(y_1 \dots y_n)$  doivent cependant être décrites par une loi normale. Cela peut être vérifié par un test de Kolmogorov-Smirnov; pour plus de détails se référer à Therrien (2003) .

Une formule plus pratique pour les calculs est:

$$r_{xy} = \frac{\sum x_i y_i - \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{n}}{\sqrt{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}} \sqrt{\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}}}$$

Le coefficient de corrélation de Pearson mesure la relation linéaire en X et Y et sa valeur est toujours dans l'intervalle  $[-1,1]$ .

- Si  $r_{xy} = 1$ , on parle de corrélation positive parfaite: alors les  $n$  points se situent sur une droite dont la pente est positive.
- Si  $r_{xy} = -1$ , on parle de corrélation négative parfaite: alors les  $n$  points se situent sur une droite dont la pente est négative.
- Plus  $r_{xy}$  est près de 1, plus on dit que la corrélation est forte positivement et l'inverse pour  $-1$ . Alors les points ne se situent pas très loin d'une droite dont la pente est positive.

- Si  $r_{xy} = 0$ , on parle de corrélation nulle, ce qui ne veut pas dire que X et Y sont indépendantes.

Si  $r_{xy}$  est grand en valeur absolue, on conclut que les deux caractères sont fortement associés linéairement.

Si  $r_{xy}$  est petit en valeur absolue, c'est-à-dire près de 0, on ne peut pas conclure que les caractères ne sont pas associés, mais on peut conclure qu'ils ne le sont pas linéairement.

Afin de vérifier que  $r_{xy} \neq 0$ , on calcule t

$$t = r_{xy} \sqrt{\frac{n-2}{1-r_{xy}^2}} \rightarrow t_{n-2}$$

et on compare au seuil observé  $\alpha$  dans une table de Student

- si  $T_{\text{obs}} > T_{\text{seuil}}$ , l'hypothèse  $H_0$  est rejetée au risque d'erreur  $\alpha$  : les couples de données sont unis linéairement.
- si  $T_{\text{obs}} \leq T_{\text{seuil}}$ , l'hypothèse  $H_0$  est acceptée: les couples de données ne sont pas unis linéairement, mais on ne peut conclure sur leur dépendance.

## **Annexe 4.**

### **Exemples de calculs**

## A4.1 - Transformation des ppm en concentration gazeuse (p/v)

1 ppm = 1 partie par millions → Fraction molaire

Puisque la loi des gaz parfaits est  $pV = nRT$

où  $p$  = pression (kPa)  
 $V$  = volume (L)  
 $n$  = nombre de moles  
 $R$  = Constante des gaz parfaits (8,31 kPa. L mole<sup>-1</sup> °K<sup>-1</sup>)  
 $T$  = Température en °K

ppm constitue également une fraction volumique. Donc, X ppm équivaut à X litres du gaz dans 10<sup>6</sup> L, ou de même X litres dans 1000 m<sup>3</sup> ou de mL par Litre de gaz.

À pression et température normales, (101,3 kPa et 298 °K), la concentration molaire d'un gaz ( $n/V$ ) est donc égale à

$$n/V \text{ (mole L}^{-1}\text{)} = 101,3 / (8,31 \cdot 298) = 0,04090$$

Puisque X litres de gaz équivaut à

$$n \text{ (mole)} = 0,04090 * X$$

(X litres par 1000 m<sup>3</sup>) égale la concentration molaire volumique (CM)

$$CM \text{ (mole m}^{-3}\text{)} = 0,04090 * (X/1000 \text{ m}^3)$$

et pour obtenir une concentration massique volumique (CV) gazeuse, on multiplie par la masse molaire (MM) pour terminer avec

$$CV \text{ (mg m}^{-3}\text{)} = \frac{0,04090 \text{ mole} * X \text{ L} * 1000 \text{ mg} * MM \text{ g}}{\text{L} \quad 1000 \text{ m}^3 \quad \text{g} \quad \text{mole}}$$

ou

$CV \text{ (mg m}^{-3}\text{)} = \frac{\text{ppm} * MM}{24,45}$
---

## A4.2 - Détermination du nombre de copies d'un vecteur

On suppose que :

- Le plasmide possède 3851 pb
- La masse molaire d'une paire de base azotée est  $660 \text{ g (mole pb)}^{-1}$ ;
- L'amplicon possède 397 pb (*Nitrobacter*);
- La quantification de l'ADN donne  $115 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ .

La longueur totale du vecteur est donc de

$$3851 \text{ pb} + 397 \text{ pb} = 4248 \text{ pb}$$

La masse molaire du vecteur est de :

$$660 \text{ g (mole pb)}^{-1} * 4248 \text{ pb/vecteur} = 2\,803\,680 \text{ g (mole vecteur)}^{-1}$$

Donc, 2 803 680 g pour  $6,02 * 10^{23}$  molécules de vecteur.

On trouve alors le nombre de molécules par  $\mu\text{l}$  dans le microtube par

$$\frac{115 * 10^{-9} \text{ g}/\mu\text{l} * 6,02 * 10^{23} \text{ molécules}}{2\,803\,680 \text{ g}} = 24,7 * 10^9 \text{ molécules(copies) } \mu\text{l}^{-1}$$

En partant de cette valeur, on peut ensuite calculer les dilutions pour fabriquer l'étalon qui servira à établir la courbe étalon lors du PCR quantitatif.

Supposons que l'on ajoute 2  $\mu\text{l}$  de la dilution d'ADN dans la solution réactionnel et que l'on veuille  $10^8$  copies par tube PCR, il faut concevoir une dilution de concentration  $5 * 10^7$  copies  $\mu\text{l}^{-1}$ . Supposons également qu'on ne veuille utiliser que 2  $\mu\text{l}$  de la solution stock de plasmide.

On sait que  $C_1 V_1 = C_2 V_2$ , donc

$$24,7 * 10^9 * 2 \mu\text{L} = 5 * 10^7 * X \mu\text{L} \rightarrow X = 988 \mu\text{L}$$

On dilue donc 2  $\mu\text{L}$  de la solution stock dans 986  $\mu\text{L}$  d'eau afin d'obtenir  $5 \cdot 10^7$  copies  $\mu\text{L}^{-1}$ . Avec cette solution, on pourra ensuite créer l'étalon en diluant successivement 100  $\mu\text{L}$  de chacune des dilutions dans 900  $\mu\text{L}$  d'eau pour produire  $5 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^4$ ... $5 \cdot 10^0$ .

### A4.3 - Seuil minimal de détection d'un gène

#### Tourbe

Imaginons que la courbe étalon du PCR en temps réel conçue pour un gène particulier ne permet que de quantifier un minimum de 10 copies par tube réactionnel. Supposons également que ces 10 copies étaient incluses dans les 2 µl d'extrait qui ont été ajoutés à la solution de réaction, et que cet extrait avait été dilué 1:100 pour éviter un effet marqué des inhibiteurs sur la réaction. À la fin des différentes étapes d'extraction, l'ADN fixé sur le filtre du kit est finalement élué dans 100 µl de tampon TE. On a donc un certain nombre de copies de gène dans cet extrait :

$$\frac{10 \text{ copies}}{\text{tube}} * \frac{\text{tube}}{2 \mu\text{l}} * 100X * \frac{100 \mu\text{l}}{\text{extraction}} = 50\,000 \frac{\text{copies}}{\text{extraction}}$$

Supposons maintenant que l'extraction d'acides nucléiques est réalisée à partir d'un échantillon de 0,4 g humide (Annexe 2) ayant une teneur en eau humide (TEEh) de 70 %.

$$50\,000 \frac{\text{copies}}{\text{extraction}} * \frac{\text{extraction}}{0,4 \text{ g hum}} * \frac{1}{(1 - 0,70)} = 4,2E05 \frac{\text{copies}}{\text{g Sec}}$$

Le nombre de copies minimal qui doit être extrait d'un échantillon environnemental de milieu filtrant organique, pour pouvoir apparaître dans la portion linéaire de la droite étalon, est donc environ de 4,2E05 copies (g Sec)<sup>-1</sup>.

#### Pouzzolane

Supposons maintenant que l'extraction d'acides nucléiques est réalisée à partir d'un échantillon de 6 mL d'une suspension de biofilm (Annexe 2) produite lors de l'évaluation de l'activité nitrifiante potentielle par respirométrie azotée (section 4.2.3). On sait que 150 g humide de pouzzolane ont été mis en suspension. Supposons maintenant que celle-ci avait, avant sa mise en suspension, une TEEh de 40 %.

$$50\,000 \frac{\text{copies}}{\text{extraction}} * \frac{\text{extraction}}{0,006 \text{ L}} * \frac{1 \text{ L}}{150 \text{ g humide}} * \frac{1}{(1 - 0,40)} = 9,3E04 \frac{\text{copies}}{\text{g Sec}}$$

Le nombre de copies minimal qui doit être extrait d'un échantillon environnemental de pouzzolane, pour pouvoir apparaître dans la portion linéaire de la droite étalon, est donc environ de  $9,3E04$  copies  $(g \text{ Sec})^{-1}$ .

## A4.4 - Détermination de l'activité potentielle d'une couche de support

### Dénitrification

Supposons une activité dénitrifiante potentielle ADP ( $\mu\text{g N-N}_2\text{O (g Sec)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), évaluée à l'aide du blocage à l'acétylène et calculée avec l'équation 18 de la section 3.2.2.3. En connaissant la surface A ( $\text{m}^2$ ) et la hauteur H (m) de la couche ainsi que sa masse volumique D ( $\text{g Sec L}^{-1}$ ), il est possible de déterminer le potentiel dénitrifiant  $P_D$  ( $\text{mg N-N}_2\text{O d}^{-1} \text{ couche}^{-1}$ ) d'une couche entière à l'aide de l'équation suivante:

$$P_D = \text{ADP} * \frac{24 \text{ h}}{\text{d}} * D * 1000 \frac{\text{L}}{\text{m}^3} * A * H * \frac{\text{mg}}{1000 \mu\text{g}}$$

Par exemple, si

$$\text{ADP} = 200 \mu\text{gN-N}_2\text{O (g Sec)}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$A = 0,112 \text{ m}^2$$

$$H = 0,3 \text{ m}$$

D = 300 g Sec  $\text{L}^{-1}$  (déterminée par la masse sèche pouvant entrer dans 0,55 L, correspondant au volume de la cellule permettant l'évaluation de l'activité dénitrifiante potentielle)

on trouve  $P_D = 48\,384 \text{ mg N-N}_2\text{O d}^{-1} \text{ couche}^{-1}$ .

Cette couche a donc la capacité de transformer 48 384 mg N par jour, évaluée sous forme de  $\text{N}_2\text{O}$ , par la dénitrification des nitrates.

### Nitrification

La nitrification potentielle est évaluée selon la respiration maximale des organismes nitrifiants. Il importe donc de relier la quantité d'oxygène consommée à celle d'azote oxydée. On sait que les microorganismes consomment 4,33  $\text{mgO}_2$  par mg N nitrifié (Grady *et al.* 1999). On évalue également cette activité par rapport à une concentration de matières

volatiles en suspension. Encore une fois, il est nécessaire de transformer cette matière de façon à obtenir une activité globale pour la couche. Il est possible d'y parvenir par l'équation suivante, en sachant que l'on a initialement mis en suspension 100 g humides dans un litre de solution respirométrique:

$$P_N = ANP * 24 \frac{h}{d} * MVES * D * A * H * \frac{mg\ N}{4,33\ mgO_2} * \frac{L}{(1 - TEEh).100\ g\ humide} * 1000 \frac{L}{m^3}$$

où

$P_N$  = Activité nitrifiante potentielle (mg N d<sup>-1</sup> couche<sup>-1</sup>)

ANP = Activité respirométrique spécifique de l'échantillon (mgO<sub>2</sub> gMVES<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

MVES = Concentration de matières en suspension volatiles de l'échantillon (gMVES L<sup>-1</sup>)

D = Masse volumique de la couche (g Sec L<sup>-1</sup>)

A = Aire de la couche (m<sup>2</sup>)

H = Hauteur de la couche (m)

TEEh = Teneur en eau humide de l'échantillon

Par exemple, si les paramètres précédents égalent

ANP = 20 mgO<sub>2</sub> gMVES<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

MVES = 3,0 g L<sup>-1</sup>

D = 70 g Sec L<sup>-1</sup>

A = 0,112 m<sup>2</sup>

h = 0,3 m

TEEh = 0,75

on obtient  $P_N = 31\ 288\ mg\ N\ d^{-1}\ couche^{-1}$ .

Cette couche a donc la capacité de nitrifier 31 288 mg N par jour, évaluée par respirométrie azotée.

## A4.5 – Calcul du bilan de masse sur l'azote d'une couche de milieu filtrant

Prenons la figure 4.2 de la présente thèse et supposons qu'à la suite de la période de démarrage, **l'adsorption et la désorption sont à l'équilibre.**

On considère, selon les paramètres définis par Garzón (2001), que **l'assimilation** contribue à l'enlèvement de **12% de l'azote ammoniacal** qui entre dans la couche de milieu filtrant.

Le bilan pour l'activité nitrifiante observée ( $r_{\text{nit(obs)}}$ ) est donc:

$$r_{\text{nit(obs)}} = (\text{N-NH}_{3(\text{g})\text{in}} + \text{N-NH}_{4(\text{aq})\text{in}}) - 0,12(\text{N-NH}_{3(\text{g})\text{in}} + \text{N-NH}_{4(\text{aq})\text{in}}) - (\text{N-NH}_{3(\text{g})\text{out}} + \text{N-NH}_{4(\text{aq})\text{out}})$$

Étant donné que la concentration en  $\text{N}_{2(\text{g})}$  est la seule forme azotée qui n'est pas mesurée, l'activité dénitrifiante est donc définie comme la masse d'azote manquante permettant de fermer le bilan, additionné du taux de production de  $\text{N}_2\text{O}$  également produit par la dénitrification. Le bilan pour l'activité dénitrifiante observée ( $r_{\text{dénit(obs)}}$ ) est donc:

$$r_{\text{dénit(obs)}} = r_{\text{nit(obs)}} + (\text{NO}_{3(\text{aq})\text{in}} - \text{NO}_{3(\text{aq})\text{out}})$$

## **Annexe 5.**

### **Information concernant le PCR**

## A5.1 - Conditions de réactions du PCR conventionnel

Tableau A5.1. Amorces et conditions de réaction du PCR conventionnel

Cible	Amorces	Mélange pour 25 µl de réaction	Programme d'amplification	Références	
AOB 16S rDNA	CTO189FA/B	Mastermix 2X	12,5 µl	3 min 94°C	Harms <i>et al.</i> 2003
		Eau	10,6 µl	40 cycles de:	
	Amplicon 116 pb	CTO189f A/B	0,3 µl	30 sec 94°C	
		CTO189f C	0,3 µl	30 sec 60°C	
		RT1R	0,3 µl	30 sec 72°C	
ADN	1,0 µl	et 10 min 72°C			
<i>Nitrobacter</i> 16S rDNA	FGPS872	Mastermix 2X	12,5 µl	3 min 94°C	Féray <i>et al.</i> 1995
		Eau	10,9 µl	35 cycles de:	
	Amplicon 397 pb	FGPS872	0,3 µl	1 min 94°C	
		FGPS1269	0,3 µl	1 min 50°C	
		ADN	1,0 µl	1 min 72° et 3 min 72°C	
<i>Nitrospira</i> 16S rDNA	NSR1113F	Mastermix 2X	12,5 µl	3 min 94°C	Harms <i>et al.</i> 2003
		Eau	7,4 µl	55 cycles de:	
	Amplicon 151 pb	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3,5 µl	30 sec 95°C	
		NSR1113F	0,3 µl	30 sec 63°C	
		NSR1264R	0,3 µl	30 sec 72°C	
ADN	1,0 µl	et 10 min 72°C			
Bactéries totales 16S rDNA	BACT1369F	Mastermix 2X	12,5 µl	3 min 94°C	Suzuki <i>et al.</i> 2000
		Eau	9,2 µl	40 cycles de:	
	Amplicon 123 pb	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 µl	15 sec 94°C	
		Prok1492R	0,4 µl	30 sec 56°C	
		Bact1369F	0,4 µl	30 sec 72°C	
ADN	1,0 µl	et 10 min 72°C			
Organismes dénitrifiants	F1aCu	Mastermix 2X	12,5 µl	2 min 94°C	Throbäck <i>et al.</i> 1994
		Eau	8,73 µl	35 cycles de:	
	Gène <i>nirK</i>	BSA	0,50 µl	30 sec 94°C	
		F1aCu	1,02 µl	1 min 57°C	
		R3Cu	1,25 µl	1 min 72°C	
ADN	1,0 µl	et 10 min 72°C			
Organismes dénitrifiants	cd3aF	Mastermix 2X	12,5 µl	2 min 94°C	Throbäck <i>et al.</i> 1994
		Eau	7,899 µl	35 cycles de:	
	Gène <i>nirS</i>	BSA	1,25 µl	30 sec 94°C	
		cd3aF	1,425 µl	1 min 57°C	
		R3cd	0,926 µl	1 min 72°C	
ADN	1,0 µl	et 10 min 72°C			

## A5.2 - Conditions de réactions du PCR en temps réel

Tableau A5.2. Conditions de réaction du PCR en temps réel

Cible <sup>a</sup>	Amorces et sonde	Mélange pour 25 µl de réaction	Programme d'amplification
AOB	CTO189f A/B	Mastermix 2X	12,5 µl 2 min 50°C
16S rDNA	CTO189f C RT1r TMP1	Eau	8,6 µl 2 min 95°C
		CTO189f A/B	0,3 µl 45 cycles de
		CTO189f C	0,3 µl 15 sec 95°C
		RT1r	0,3 µl 30 sec 60°C (Lecture fluo)
		TMP1	1,0 µl
		ADN	2,0 µl
<i>Nitrobacter</i> 16S rDNA	FGPS872 FGPS1269'	Mastermix 2X	12,5 µl 2 min 50°C
		Eau	9,9 µl 2 min 95°C
		FGPS872	0,3 µl 45 cycles de:
		FGPS1269	0,3 µl 1 min 94°C
		ADN	2,0 µl 1 min 50°C
			1 min 72° 15 sec 80°C (Lecture fluo)
<i>Nitrospira</i> 16S rDNA	NSR1113F NSR1264R NSR1143Taq	Mastermix 2X	12,5 µl 2 min 50°C
		Eau	6,9 µl 2 min 95°C
		MgCl <sub>2</sub>	2,0 µl 45 cycles de
		NSR1113F	0,3 µl 30 sec 95°C
		NSR1264R	0,3 µl 30 sec 63°C (Lecture fluo)
		NSR1143Taq	1,0 µl
Organismes dénitrifiants	cd3aF R3cd	Mastermix 2X	12,5 µl 2 min 50°C
		Eau	6,9 µl 2 min 95°C
		BSA	1,25 µl 35 cycles de:
		cd3aF	1,425 µl 30 sec 94°C
		R3cd	0,926 µl 1 min 57°C
		ADN	2,0 µl 1 min 72°C
	15 sec 80°C (Lecture fluo)		
Bactéries totales 16S rDNA	BACT1369F PROK1492R TM1389F	Mastermix 2X	12,5 µl 2 min 50°C
		Eau	8,7 µl 2 min 95°C
		BACT1369F	0,4 µl 45 cycles de:
		PROK1492R	0,4 µl 15 sec 95°C
		TM1389F	1,0 µl 30 sec 56°C (Lecture fluo)
	ADN	2,0 µl	

<sup>a</sup> Pour les AOB, lors du PCR en temps réel par Sybr<sup>®</sup>Green, la sonde n'était pas ajoutée à la réaction. Le volume correspondant était remplacé par de l'eau.

### A5.3 - Séquence des amorces et des sondes utilisées

Tableau A5.3. Séquences des amorces et des sondes

Cible	Amorces	Séquences
AOB	CTO189F A/B	5'-GGA GRA AAG CAG GGG ATC G-3'
16S rDNA	CTO189F C	5'-GGA GGA AAG TAG GGG ATC G-3'
	RT1R	5'-CGT CCT CTC AGA CCA RCT ACT G-3'
	TMP1	5'-(6-FAM)-CAA CTA GCT AAT CAG RCA
		TCR GCC GCT C-(TAMRA)-3'
<i>Nitrobacter</i>	FGPS872	5'-TTA AAA CTC AAA GGA ATT GA-3'
16S rDNA	FGPS1269'	5'-TTT TTT GAG ATT TGC TAG-3'
<i>Nitrospira</i>	NSR1113F	5'-CCT GCT TTC AGT TGC TAC CG-3'
16S rDNA	NSR1264R	5'-GTT TGC AGC GCT TTG TAC CG-3'
	NSR1143Taq	5'-(6-FAM)-AGC ACT CTG AAA GGA CTG
		CCC AGG-(TAMRA)-3'
Totales	BACT1369F	5'-CGG TGA ATA CGT TCY CGG-3'
16S rDNA	PROK1492R	5'-GGW TAC CTT GTT ACG ACT T-3'
	TM1389F	5'-(6-FAM)-CTT GTA CAC ACC GCC CGT
		C-(TAMRA)-3'
Dénitrifiants	F1aCu	5'-ATC ATG GTS CTG CCG CG-3'
Gène <i>nirK</i>	R3Cu	5'-GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT-3'
Dénitrifiants	cd3aF	5'-GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG-3'
Gène <i>nirS</i>	R3cd	5'-GAS TTC GGR TGS GTC TTG A-3'

Signification du code (NC-IUB 2006)

A	A
C	C
G	G
T	T
M	A or C
R	A or G
W	A or T
S	C or G
Y	C or T
K	G or T
V	A or C or G
H	A or C or T
D	A or G or T
B	C or G or T
N	A or C or G or T

## A5.4 - Solutions stock utilisées lors des PCR

Tableau A5.4. Concentration des solutions stock et dans le mélange PCR des amorces et des sondes utilisées

Cible	Amorces	Solution stock ( $\mu\text{M}$ )	Mélange PCR (nM)
AOB	CTO189F A/B	16,70	200
16S rDNA	CTO189F C	8,33	100
	RT1R	25,00	300
<i>Nitrobacter</i>	FGPS872	41,67	500
16S rDNA	FGPS1269'	41,67	500
<i>Nitrospira</i>	NSR1113F	50,00	600
16S rDNA	NSR1264R	50,00	600
	NSR1143Taq	6,25	250
Totales	BACT1369F	93,75	1500
16S rDNA	PROK1492R	62,50	1000
	TM1389F	12,5	500
Dénitrifiants	F1aCu	73,59	1000
Gène <i>nirK</i>	R3Cu	71,54	1000
Dénitrifiants	cd3aF	17,55	1000
Gène <i>nirS</i>	R3cd	27,00	1000

## A5.5 - Séquences des inserts pour les clones testés

### AOB

Clone A13

GGAGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCGCTATTGGATGAGCCGAAGTCG  
GATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACAATCAGTAGCTGGT  
CTGAGAGGACGA

### *Nitrospira*

Clone Spi2

GTTTGCAGCGCTTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGTGGCCCCAGGCATAAA  
GGCCATGCTGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCCCGTTATCCTGGGCAGTC  
CCTTCAGAGTGCTCGGCATGACCCGGTAGCAACTGAAAGCAGGA

### *Nitrobacter*

Clone N1

TTTTTTGAGATTTGCTAGAGGTTGCCCTTTTGCATCCCATTGTCACCGCCATTGT  
AGCACGTGTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCA  
CCTTCCTCGCGGCTTATCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTA  
GCAACTAAGGACGGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG  
ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCTCCAGGCTCCGAAGAGAAG  
GTCACATCTCTGCGACCGGTCCTGGACATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGC  
GTTGCGTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC  
CTTTGAGTTTTAAA

### *nirS*

Clone S1

GAGTTCGGGTGGGTCTTGATGAACAGCGAGCCGCCCGCCCTGGCCCTGTAGTTC  
GGCGACTTTCTTCCAGGCGTACTGCGGATGGTTCTTCGGATCGGTGCCGATCAG  
CGAGATGCTGCCGTCGCCAGGTGGCTGGTGCTCCACACCGGGCCGTACTIONGG  
GATGCACGAAGTTGGCGCCACGCCCGGGTGCGGGGTCTTGCCGACGTCGACC  
AGGGCCGACAGGCGACGGTCCTTGAGTTCGATCACGGCAACCTTGTTGGAGTT  
GTTGGCGGCGGTCATGAAGTAGCGGTGGCTGCTGTCCCAGCCGCGTCGTGGA  
GGAACGGCGCCGCACCGATGCTGGTGACGGTGAGGTTGTCGATATCCTTGTA  
TTGACCAGCAGGACCTTGCCCGTCTCCTTCACGTTTACA

***nirK***

## Clone K7

ATCATGGTGCTGCCGCGGCTTAGACGTTGCAGGCTATAGCGTTCGCCAAACGGC  
ACGTAAGGCACGCCAGCACTGGTTACAGTCAAGAACAGGACCTGTTTCGTGCAG  
GACTTTATTGTGTTTCAGGTTATGCAATAAGGCCGGAGGGACCGAGTCGGGAA  
TGGTGCTCATGAACACCGCCGTACCTGGTACGCGGGTTGGGGCGTACTCCTCCA  
GATTCAGCAAAAATTCTTTTAGCGGCTGCTTGTTTTCCAGCAAGCGCTCGTGCA  
AAGCGGCACGCCCTGACGCCAGGTCAGCATCAAGCCCAGCAGCACAGCGCCC  
ACCAGCAATGGCAGCCAGCCACCTTCCAGAATCTTGAGCGCATTGGCCGAGAA  
CAAGAGCATGTCCAGAATCAGGAAAATACCCAAGAGCCCCAACCCAGGCCAG  
CGTTTGATACTTGCATGACGCGGCAGCACCATGATA

**Totales**

## Clone T5

CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG  
GGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGT  
GATCCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCA

## **Annexe 6.**

### **Photos des montages**

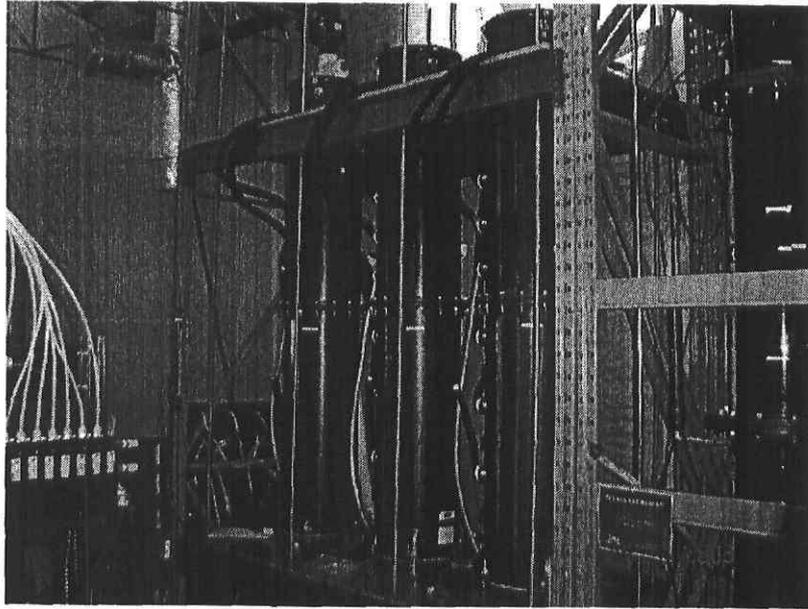


Figure A6.1. Colonnes de biofiltration

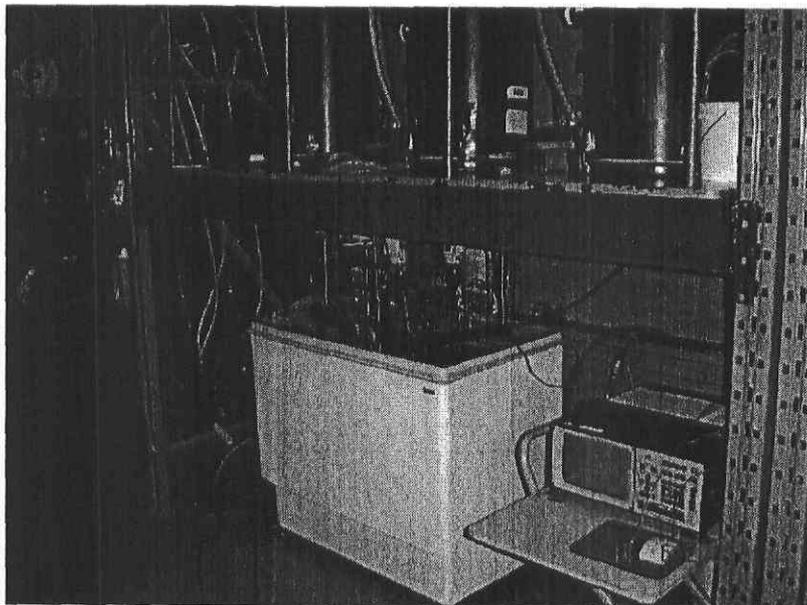


Figure A6.2. Réfrigérateur pour la conservation du lisier de l'alimentation

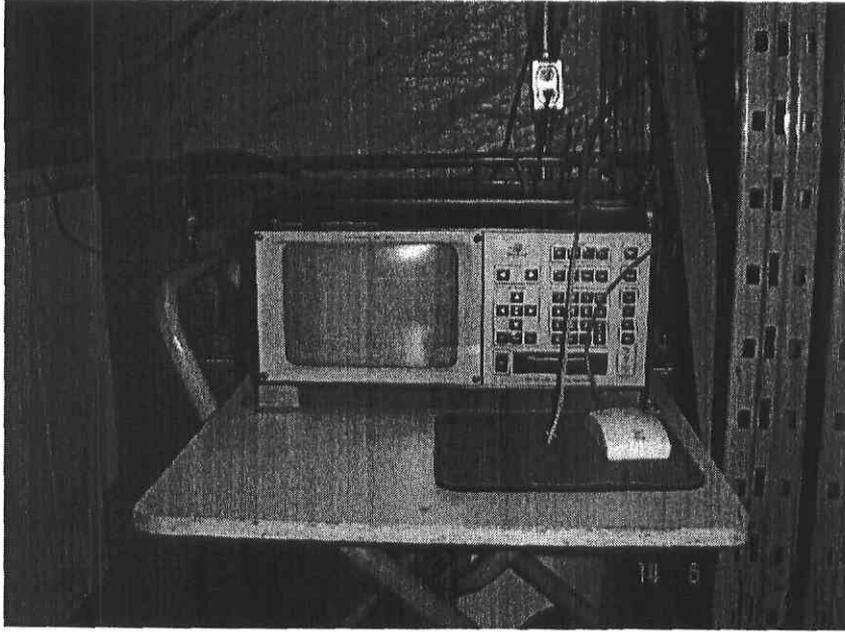


Figure A6.3. Analyseur de gaz

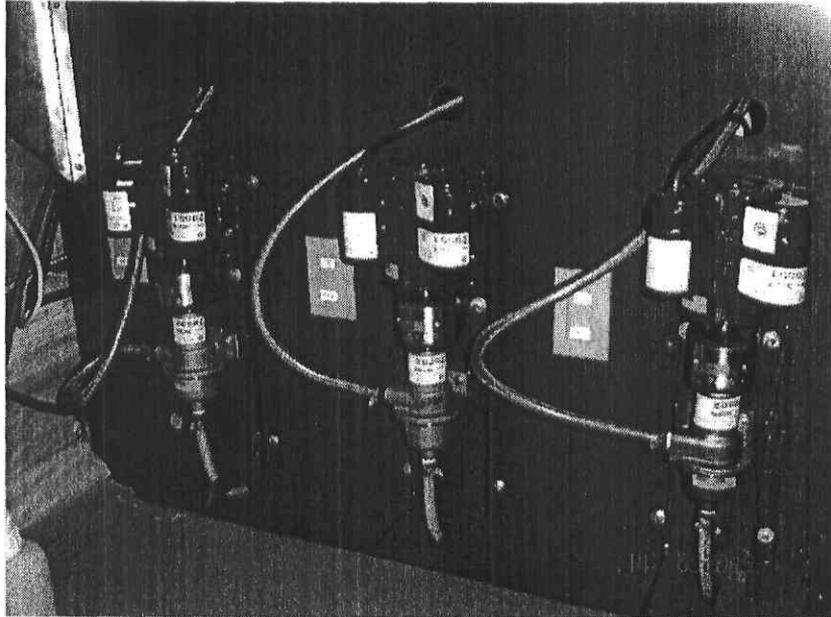


Figure A6.4. Pompes à cavités

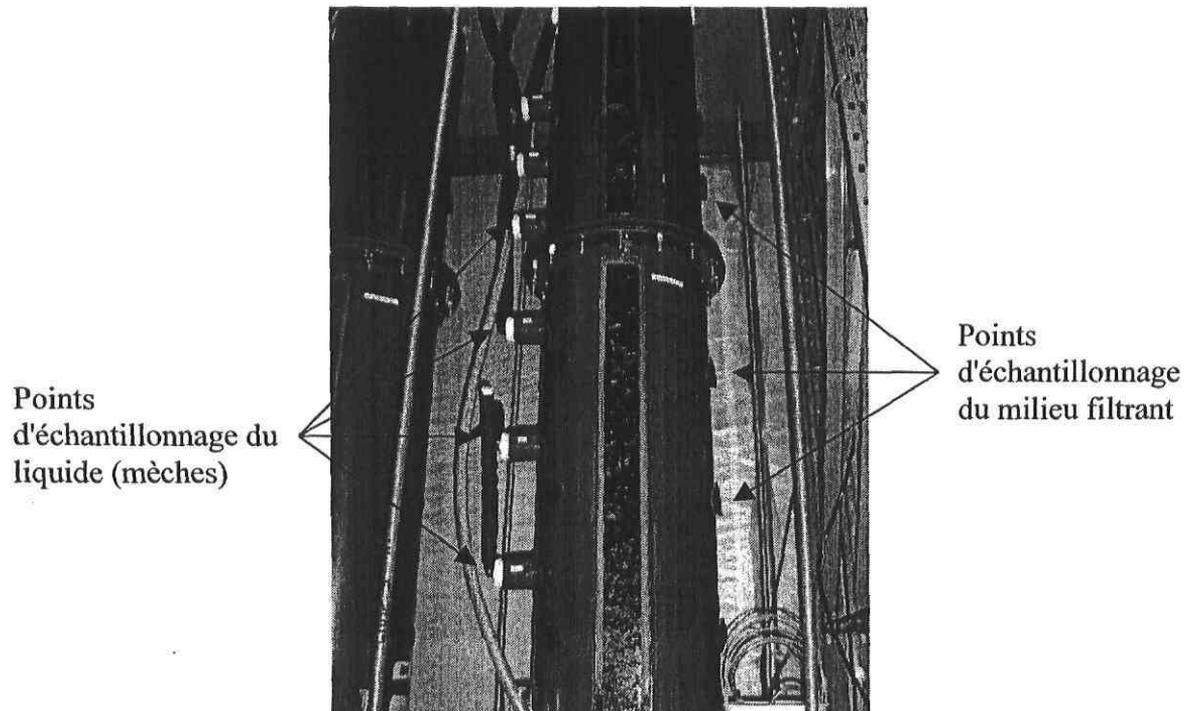


Figure A6.5. Colonne de biofiltration avec points d'échantillonnage

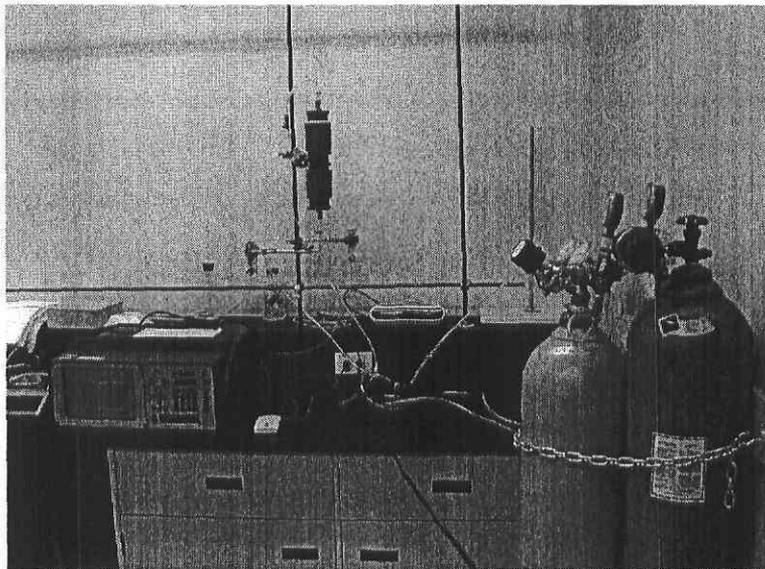


Figure A6.6. Montage de la cellule pour l'évaluation de l'activité dénitrifiante

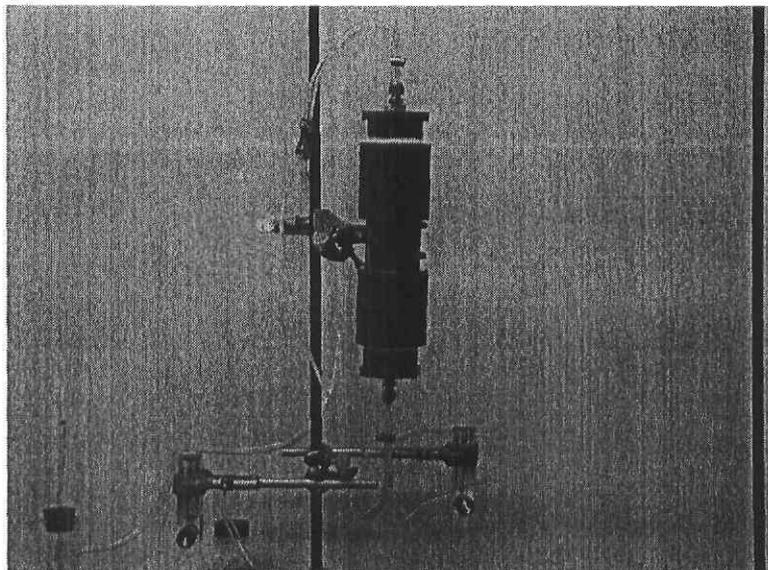


Figure A6.7. Cellule pour l'évaluation de l'activité dénitrifiante

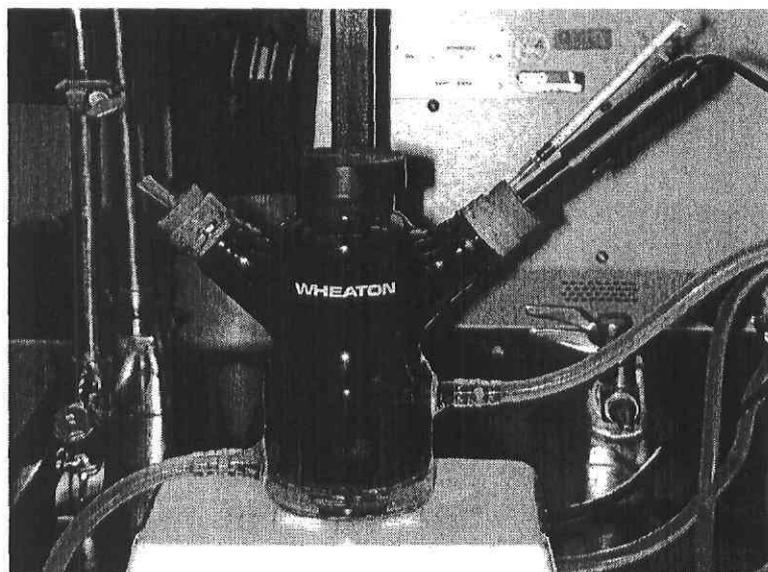


Figure A6.8. Respiromètre

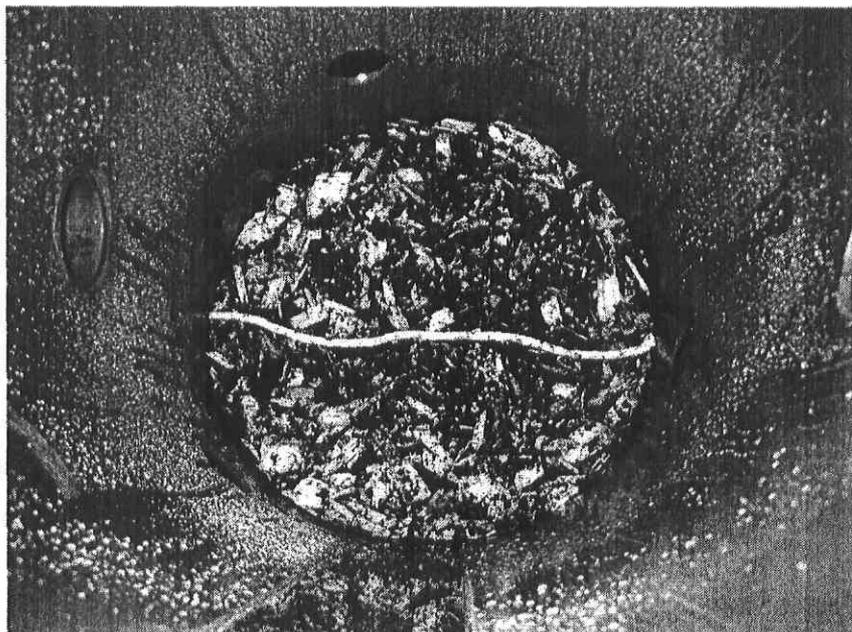


Figure A6.9. Installation d'une mèche de fibre de verre dans le biofiltre



Figure A6.10. Outil de compaction semi-circulaire

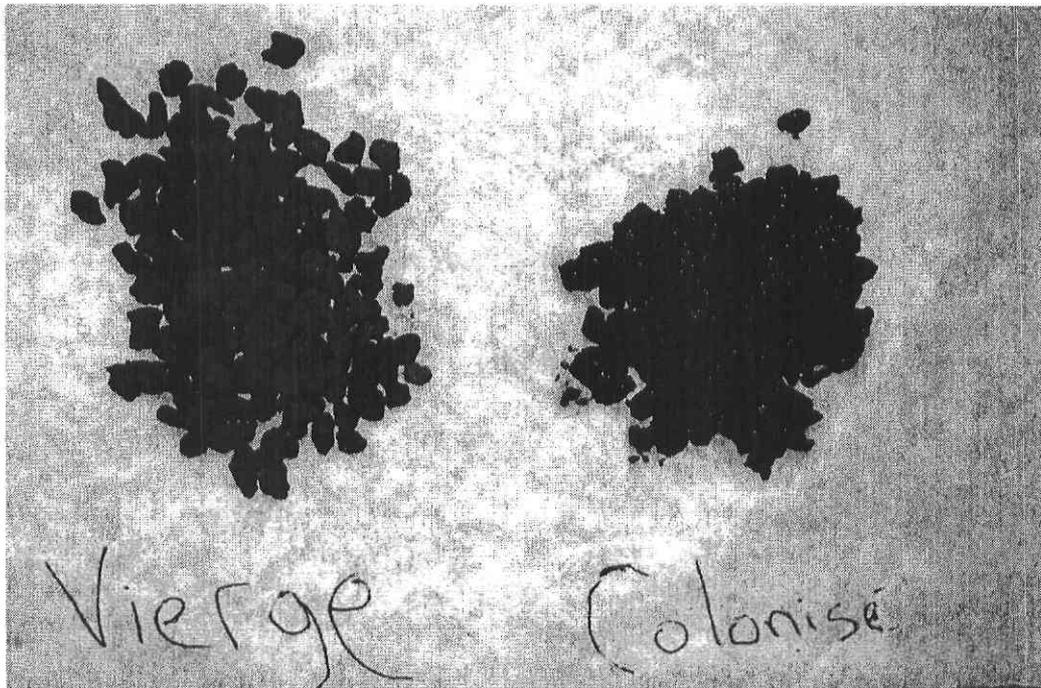


Figure A6.11. Comparaison entre de la pouzzolane vierge et la pouzzolane colonisée après 180 jours d'opération

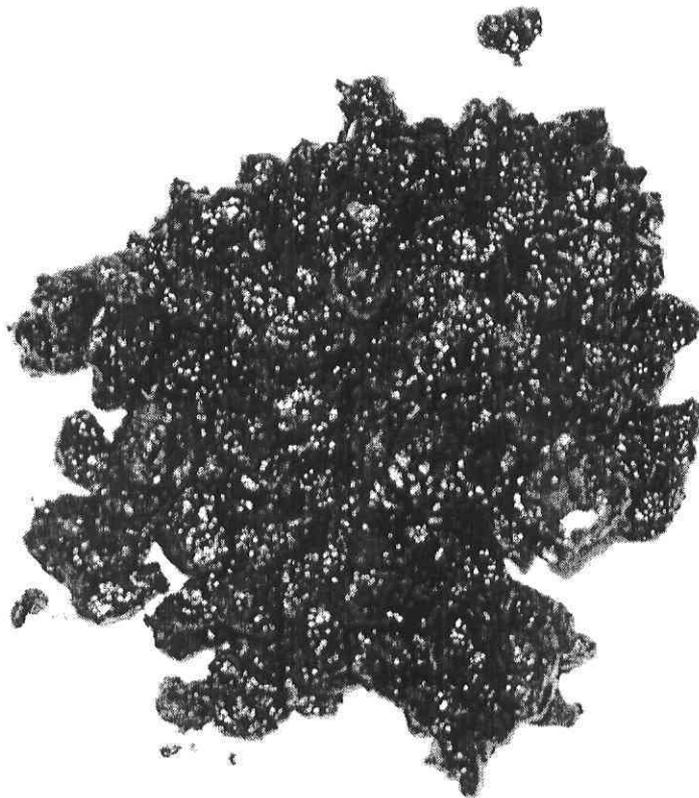


Figure A6.12. Pouzzolane colonisée après 180 jours d'opération

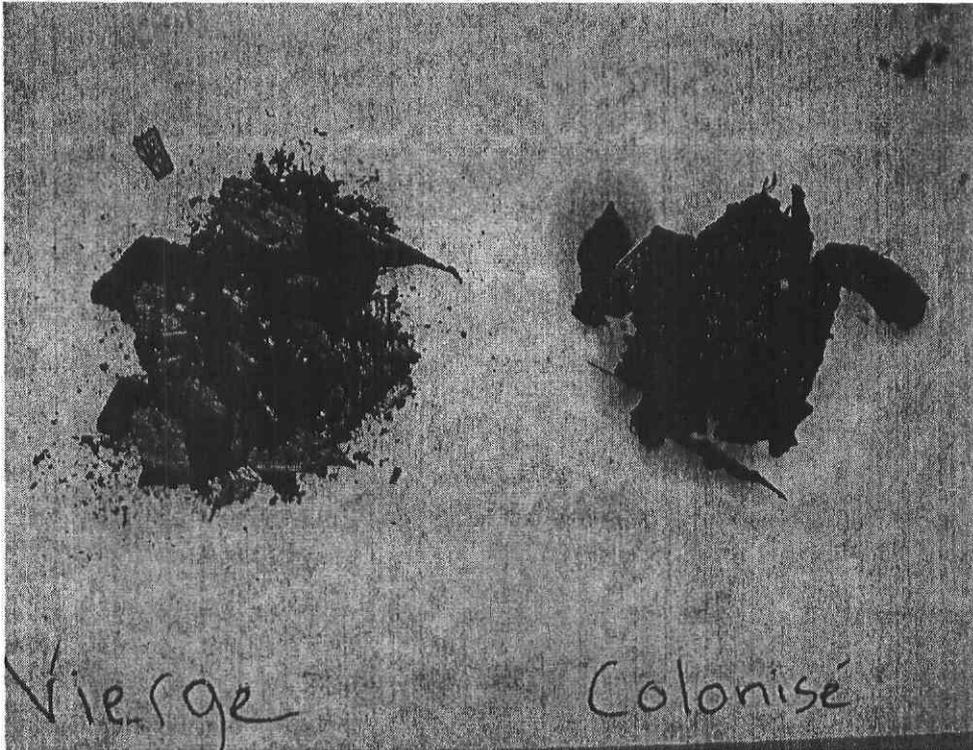


Figure A6.13. Comparaison entre une tourbe vierge et une tourbe colonisée après 180 jours d'opération

## **Annexe 7.**

**Note technique sous presse dans JEES**

**Acetylene blockage technique as a tool to determine denitrification potential of a biomass fixed on an organic media treating wastewater**

Y. Gilbert<sup>1,2</sup>, Y. Le Bihan<sup>1</sup> and P. Lessard<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche Industrielle du Québec, 333 Franquet, Québec, Canada, G1P 4C7

<sup>2</sup> Département de génie civil, Pavillon Pouliot, Université Laval, Québec, Canada, G1K 7P4

**Corresponding author**

Yann Le Bihan  
Centre de Recherche Industrielle du Québec  
333, Franquet Street  
Québec, Québec, Canada  
G1P 4C7  
Tel. : (418) 659-1550  
Fax : (418) 652-2202  
[Yann.LeBihan@criq.qc.ca](mailto:Yann.LeBihan@criq.qc.ca)

Words Count : 3939 (250 words per figure)

**Abstract:** Biofiltration on organic media is used in many wastewater applications. However, no tools are available to survey the microorganisms' activity inside the process. The acetylene blockage technique was adapted to evaluate the potential denitrifiers' activity. The objectives of this work were to adapt and verify the applicability of the method by evaluating its sensitivity and variability. A closed cell was built and installed in an open network where pure gaseous nitrogen and acetylene have successively been injected at fixed rate on filtering media samples.  $N_2O$  produced by the denitrifying biomass has been monitored during the test. Assays were realized in replicates, with different quantities of filtering media, to observe the sensitivity and the variability of the method. Potential denitrifying activity and quantity of biomass correlation shows that the adapted method was sensitive for 50 to 150 grams (wet basis) of filtering media. Moreover, when under an acetylene atmosphere, the coefficients of variation observed for the tests varied between 10 to 32 % when under anoxic conditions. This work shows that the technique as adapted could be used as a tool to survey the potential activity of denitrifiers fixed on an organic media.

*Key words:* Denitrification; Biofilter; Acetylene; Nitrous oxide; Organic media; Potential activity.

## Introduction

Garzón-Zúñiga *et al.* (2005) studied the behaviour of nitrogen compounds in an aerated biofilter using an organic media. The process was found to totally oxidize the ammonia in  $\text{NO}_3^-$  but unable to reduce completely the latter in  $\text{N}_2$ . In order to optimize the denitrification step of the process, characterization of the denitrifying biomass activity was needed for a better understanding of its behaviour inside the system.

Denitrifiers have already been characterized both in terms of quantity or activity in suspended and fixed biomass processes, different types of soil and sediment (Seitzinger *et al.* 1993; Bothe *et al.* 2000; Lee *et al.* 2002; Biesterfeld *et al.* 2003; Gregory *et al.* 2003). But for processes using fixed biomass on an organic media, the evaluation of denitrifying activity has rarely been made.

Many techniques are available to monitor denitrifying activity inside environmental samples. The utilization of  $^{15}\text{N}$  isotope allows precise determination of nitrogen transformations by microbiological processes (Beline *et al.* 2001; Morkved *et al.* 2005). However, due to its complexity, the equipment required, and associated high costs, it is not possible for many laboratories to routinely apply this method. Mass balances provide interesting information about nitrogen transformations inside a system and allows models calibration. On the other hand, because of all the processes prevailing in nitrogen removal (stripping, adsorption, absorption, filtration, assimilation, nitrification and denitrification...), one must analyse a lot of parameters to be able to evaluate denitrifiers' activity. The acetylene inhibition technique is a method allowing the determination of this activity at low cost and with a good accuracy.

The latter method has been widely used to evaluate denitrifying activity, mostly in soil and sediments (Ryden *et al.* 1987; Seitzinger *et al.* 1993). It consists in inhibiting the last step of denitrification, reduction of nitrous oxide to atmospheric nitrogen, by an acetylene partial pressure of 1 to 20 kPa (Yoshinari and Knowles 1976; Yoshinari *et al.* 1977). Further  $\text{N}_2\text{O}$  production rate measurement allows the evaluation of denitrifying activity. However, these applications of the acetylene technique are not representative of the conditions found inside an organic biofilter, being done with a static gaseous phase.

Parkin *et al.* (1984) developed a technique to evaluate *in-situ* denitrifiers' activity by recirculating in a loop an acetylene atmosphere and measuring the cumulative  $N_2O$  produced. Their method was efficient for the evaluation of soil denitrification activity, but it is challenging to evaluate *in-situ* the activity of denitrifying microorganisms inside a biofilter by this method without any loss of process performance.

The principal objective of this work was thus to adapt and verify the applicability of the acetylene technique to evaluate *ex-situ*, with more representativity, the potential denitrifying activity of a biomass fixed on an organic media. More specifically, the variability of the results and the simplicity of the method for its routine application were tested. Also, the sensitivity of the method was verified, that is if it allows the distinction between a biomass more active than another.

## **Experimental methods**

Lab-scale biofilters were enriched with denitrifying bacteria and assays were made in replicates with different quantities of this enriched filtering media in order to simulate diverse activities. A technique that could distinguish between different activities would show a direct relation between the activity and the quantity of biomass tested, in the case of identical environmental conditions. The assays consisted in saturating the biomass with a nutritive solution containing sodium acetate and potassium nitrate, to obtain maximal denitrifying activity (Sigunga 2003), and to successively apply flows of pure  $N_2$  and of acetylene at a partial pressure of 10 kPa, after which  $N_2O$  produced was evaluated. The  $N_2O$  measured in the presence of  $N_2$  represents the basic quantity produced by incomplete denitrification and chemodenitrification (Thorn and Mikita 2000; Garzón 2001; Kappelmeyer *et al.* 2003) while the differential concentration produced in the acetylene atmosphere represents the nitrogen completely denitrified. Total gaseous nitrogen production rate in an acetylene atmosphere constitutes the potential denitrifying activity of the sample. The goal of this approach was to reproduce, during the assays, the conditions found inside the biofilter environment, in order to obtain the most representative potential activity possible.

Because a continuous flow is applied to the sample, the maximum activity is attained when a stable production of  $N_2O$  can be measured. Another way to measure denitrification rates is to evaluate cumulative  $N-N_2O$  and plot it against time. The cumulative  $N-N_2O$  can be calculated by summing the mass produced at each measuring time (Eq. 1).

$$[1] \quad N - N_2O_{cumul} = \frac{28}{44} Q \sum_{i=1}^n T_i (N_2O_i - N_2O_{inlet})$$

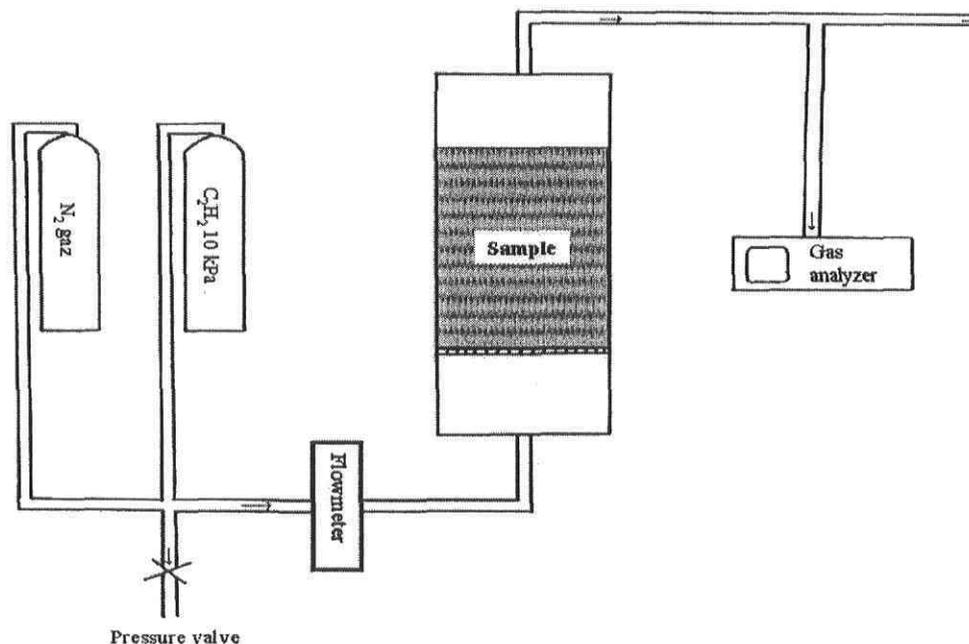
where  $N-N_2O_{cumul}$  is the cumulative mass of nitrogen produced from  $t = 0$  to  $t = i$  ( $\mu g$ ),  $N_2O_i$  is the concentration of  $N_2O$  at  $t = i$  ( $\mu g m^{-3}$ ),  $N_2O_{inlet}$  is the concentration of  $N_2O$  of the gaseous inlet ( $\mu g m^{-3}$ ),  $Q$  is the gaseous flow ( $m^3 min^{-1}$ ),  $28/44$  is the factor to obtain the mass of  $N$  instead of  $N_2O$  and  $T_i$  is the incremental time at  $t = i$  (min). The maximum activity is reached when a constant accumulation can be detected. The slopes give the potential denitrifying activity for each operational condition during the assay.

### Enrichment of filtering media

Enriched organic media originated from two lab-scale biofilters with a surface of  $7.8 \times 10^{-3} m^2$  each. They contained 2.4 liters of a fixed bed made of a peat and wood chips mix. The biofilters were fed with a synthetic nutritive solution containing acetate ( $300 mgC L^{-1}$ ), nitrate ( $200 mgN-NO_3 L^{-1}$ ) and trace mineral elements ( $0.1 mg FeCl_3 L^{-1}$ ,  $0.1 mg (NH_4)Mo_7O_{24}.4H_2O L^{-1}$ ,  $0.1 mg Na_2B_4O_7.10H_2O L^{-1}$ ,  $0.1 mg CdSO_4 L^{-1}$ ,  $0.1 mg CuSO_4 L^{-1}$ ,  $0.1 mg ZnSO_4.7H_2O L^{-1}$ ,  $0.1 mg MnSO_4.H_2O L^{-1}$  and  $16.3 mg NH_4HCO_3 L^{-1}$ ) (Ouellette 1994), at an hydraulic loading rate of  $0.050 m^3 m^{-2} d^{-1}$  during six to eight months. Since there was no mechanical aeration applied on the biofilters, anoxic conditions were supposed to prevail in the system. Filtering media sampling was done by emptying the biofilter and by gently stirring the filtering media manually to homogenize the biomass. Before dismantling the biofilters to evaluate denitrifying activities, liquid samples from inlet and effluents were tested for nitrate to ensure the presence of denitrifiers in the system. Nitrate was analyzed by Hach method 8039 with a spectrophotometer Perkin Elmer Lambda EZ210 (Wellesley, MA, USA).

### Experimental setup

The potential denitrifying activity was measured in a cylindrical PVC cell. Its effective volume was 0.55 L with a diameter of 50 mm. A stainless steel perforated plate, with 2 mm holes, was installed at 75 mm of the bottom to retain the filtering media while providing a space allowing the distribution of the gas onto the surface of the sample (Fig. 1).



**Figure 1.** Denitrifying activity measurement cell

The cell was connected, by a tubing network, to bottles of gaseous nitrogen (N<sub>2</sub>) and of acetylene (10% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-90% Ar) with which the biomass was put under diverse environmental conditions. A flowmeter allowed the regulation of the gas flow applied to the media (accuracy ± 3%). A gas analyzer, using photoacoustic spectroscopy (Brüel & Kjøer model 1301), was connected to the top of the cell to evaluate the concentration of nitrous oxide (accuracy ± 5%) produced by the microorganisms.

### Potential denitrifying activity measurements

The filtering media sample was placed on the perforated plate and lightly compacted. A synthetic nutritive solution (as described above) was directly spread over the sample until

completely soaked, to ensure that the biomass was in contact with the substrates. A screwing cap was placed at each end of the cell to close it hermetically.

A flow of  $N_2$  was applied at a velocity of  $6 \text{ m h}^{-1}$  to reproduce the aeration flow of full scale aerated biofilters actually in use. The  $N_2$  flow was stopped to be replaced by acetylene, at a partial pressure of 10 kPa under atmospheric conditions. The concentration of nitrous oxide produced was measured during 60 to 180 minutes for each condition tested, depending on the time necessary to get a maximum  $N_2O$  production. The assays were made at room temperature (20 to  $23^\circ\text{C}$ ).

#### **Sensitivity of the potential denitrifying activity measurements**

Filtering media, varying from 50, 100 and 150 grams of media (wet basis), were tested; in triplicate for 50 g and 150 g and in four replicates for 100 g. At the end of each test, the sample was analyzed for its dry matter. Because of the difficulty to measure biomass in the sample, this value was then used as a reference for the microorganisms present in the cell as done with soil (Sigunga 2003) to get specific denitrifying activity. The correlation between the potential denitrifying activity and the biomass tested has been verified.

#### **Variability of the potential denitrifying activity measurements**

Four more replicates of 100 g of media (wet basis) were tested for potential denitrifying activity by the same method described above. The coefficients of variation (CV) for the production rates of  $N-N_2O$  were then calculated to verify the variability of the test. The CVs were also evaluated for the samples tested during the sensitivity determination.

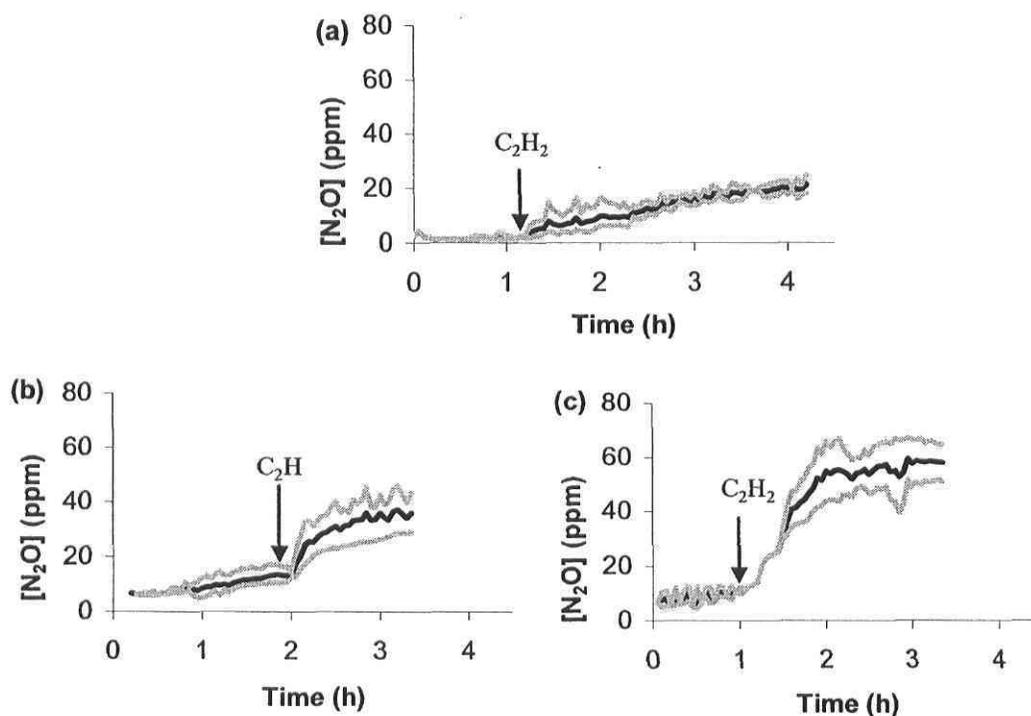
## **Results and discussion**

### **Denitrification performances of the biofilters before dismantling**

Influents and effluents of the biofilters were analyzed for nitrate concentration to ensure the presence of denitrifiers inside the system just before using the filtering media. Near complete removal of nitrate (86 to 98 %) indicated the presence of denitrifiers on the filtering media. The performances were satisfying and hence the filtering media was considered enriched by denitrifying microorganisms.

### Sensitivity of the test

To verify the sensibility of the acetylene blockage technique as adapted in this work, different quantities of biomass were tested. The mean  $N_2O$  production of the replicates is shown in Figure 2. Note that the scale is the same for the three graphs to appreciate the differences between each type of assay. It can be seen for all cases that the biomass reacted rapidly to the addition of acetylene by increasing their production of  $N_2O$  until a maximum was reached. Those values have been used to calculate the cumulative nitrogen produced by denitrifiers as described by equation 1.

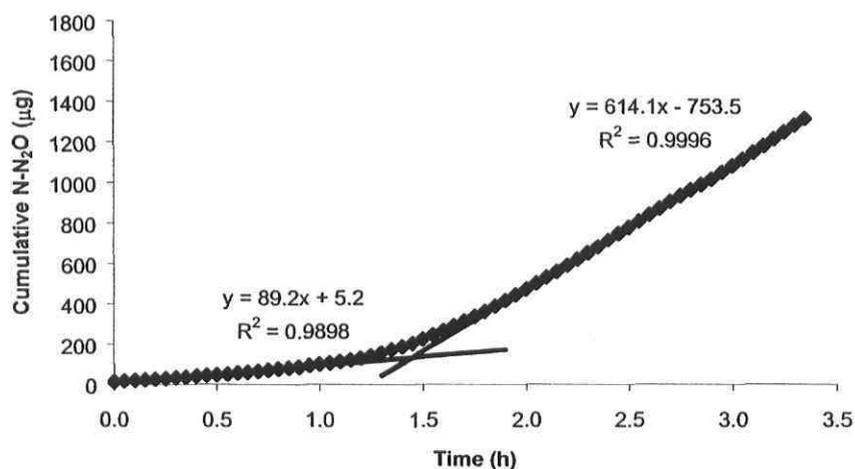


**Figure 2.**  $N_2O$  production measurements during acetylene blockage tests with (a) 50 g, (b) 100g and (c) 150 g of filtering media (wet basis). Black lines represent the mean value for the measurement conditions and gray lines show minima and maxima attained during the replicates

The time required to attain the maximum  $N_2O$  concentration after the addition of acetylene probably represents the lag phase as described by Sigunga (2003). It seems that this phase was longer when there was less biomass tested, most likely because acetylene acts as a non-competitive substrate on nitrous oxide reductase (Knowles 1990). There is also a part of this lag that was probably due to the slow distribution of the acetylene in the filtering media

sample. The maximum denitrifying activity can be associated with the plateaus because of the open gaseous flow applied on the measurement cell.

Figure 3 shows an example of the results obtained with the cumulative N-N<sub>2</sub>O calculated, for a 150 g replicate assay. The inflexion of the curve represents the inhibition of N<sub>2</sub> production by acetylene that is stopped to its previous intermediate, N<sub>2</sub>O. The slope before adding acetylene represents N-N<sub>2</sub>O production rate in an anoxic environment, hypothetically produced by incomplete denitrification and chemodenitrification, while that obtained with C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> shows the total N-N<sub>2</sub>O production rate in this condition. The difference between them corresponds to the gaseous nitrogen production rate of complete denitrifiers. The mean N-N<sub>2</sub>O production rates calculated can be seen in Table 1 with their associated standard deviation.

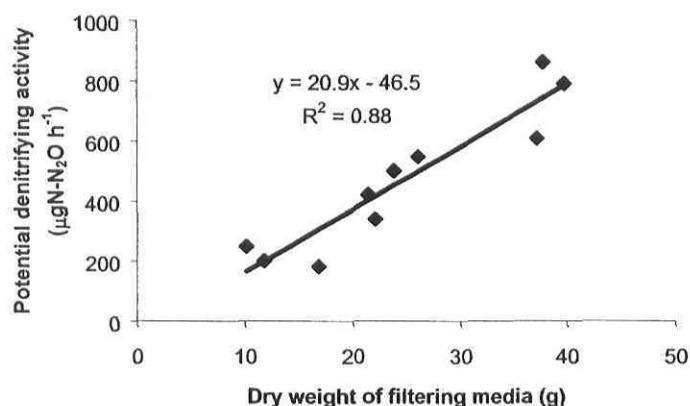


**Figure 3.** Example of cumulative N-N<sub>2</sub>O during an acetylene blockage test on a 150 g (dry basis) replicate of filtering media

**Table 1.** Denitrifying activities of the biofilters samples for the evaluation of sensitivity

Mass of filtering media (g wet basis)	N-N <sub>2</sub> O production rates ( $\mu\text{gN-N}_2\text{O h}^{-1}$ )					
	N <sub>2</sub> atmosphere		C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> atmosphere		Complete denitrification	
	Mean	Std dev.	Mean	Std dev.	Mean	Std dev.
50	18	5	210	35	193	30
100	86	21	463	110	374	133
150	164	52	755	131	646	196

The relation between potential denitrifying activity and the quantity of biomass was verified and can be seen in Figure 4. The linearity of the regression curve demonstrates that these parameters were correlated (Pearson's coefficient  $r(10) = 0.937$ ,  $P < 0.05$ ) and thus shows that the method was sensible for 10 to 40 grams of dry filtering media, corresponding to 50 to 150 grams of media (wet basis). Similar results have been observed when the biomass was under nitrogen atmosphere (results not shown), allowing the calculation of complete potential denitrification activity (Table 1). It is however important to note that those results were specific to the filtering media used and that the same linearity would not necessarily be observed in the same range of dry mass for another biomass.

**Figure 4.** Relation between potential denitrifying activity and dry mass of filtering media

Because all the samples tested during the evaluation of sensitivity had the same origin, it was logical to suppose that the specific potential denitrifying activities ( $\mu\text{gN-N}_2\text{O}$  “dry g of filtering media”<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), calculated for each assay, were the same. The mean specific potential denitrifying activities calculated here are, for 50, 100 and 150 g, respectively 17.5, 19.2 and 19.7  $\mu\text{gN-N}_2\text{O}$  “dry g of filtering media”<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. A statistical analysis of these data (t-test) shows with a confidence of 95% that they are similar (data not shown).

### Variability of the test

To determine the repeatability of a method, one must determine empirically the variability of the technique and decide statistically if this interval satisfies the precision desired. Replicates have thus been tested in order to compare their potential denitrifying activity (Table 2).

**Table 2.** Denitrifying activities of the biofilters samples for the evaluation of repeatability

Replicates	N-N <sub>2</sub> O production rates ( $\mu\text{gN-N}_2\text{O}$ h <sup>-1</sup> )		
	N <sub>2</sub> atmosphere	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> atmosphere	Complete denitrification
1	90	1077	987
2	152	1347	1195
3	80	1257	1177
4	140	1320	1180
Mean	116	1250	1135
Std dev.	36	122	99

Coefficients of variation have been calculated for each set of replicates. The values obtained varied between 24 to 32 % while under a N<sub>2</sub> atmosphere and between 10 to 24 % in the presence of acetylene, suggesting a higher variability at the beginning of the test. It was supposed that those higher CVs were due to a lower quality of the gas analyzer calibration at low N<sub>2</sub>O concentrations, as those measured in N<sub>2</sub> atmosphere. Parkin *et al.* (1984) obtained coefficients of variation varying from 11 to 16 % when doing replicated tests on the same sample but achieved 63 to 89 % when doing replicates with sub-samples, as realized in this work. Those data suggests that the acetylene inhibition technique, as adapted here, gives a better repeatability than Parkin *et al.* (1984).

## CONCLUSION

In order to optimize denitrification of an organic biofilter, it is necessary to understand the behaviour and the distribution of this biomass inside the system. Therefore, the acetylene blockage technique was adapted to evaluate the potential denitrifying activity in a way mostly representative of the real environment surrounding the biomass inside the biofilter.

The sensitivity and the variability tested in this work have demonstrated that this technique is applicable for the measurement of potential denitrification of organic media samples. This technique provides a simple way to measure potential denitrification of a filtering media sample, corresponding to the potential of the biofilter's section studied. The results obtained with this method will allow the understanding of the biofilter's colonization by indirectly providing information about denitrifiers quantity and the possible nitrogen removal reachable by each layer of the biofilter under particular operational conditions.

One should consider that the  $N_2O$  production rates obtained in this work are particular of the biomass used. Preliminary tests should provide useful information to determine which mass of filtering media (wet basis) to use in order to attain a maximum  $N_2O$  value easily distinguishable from the basic production, values used for the calculation of potential activity of complete denitrifiers.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Centre de Recherche Industrielle du Québec for its financial support during this project.

## References

- Beline, F., Martinez, J., Marol, C. and Guiraud, G. 2001. Application of the  $^{15}\text{N}$  technique to determine the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from aerated pig slurry. *Water Research*, **35**(11) : 2774-2778.
- Biesterfeld, S., Farmer, G., Figueroa, L., Parker, D., & Russel, P. 2003. Quantification of denitrification potential in carbonaceous trickling filters. *Water Research*, **37**(16): 4011-4017.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B. and Witzel, K.-P. 2000. Molecular Analysis of Ammonia Oxidation and Denitrification in Natural Environments. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**: 673-690.
- Garzón, M. 2001. Mécanismes d'enlèvement de l'azote du lisier de porc par biofiltration aérée sur tourbe. Thèse de Doctorat, Université Laval, Sainte-Foy.
- Garzón-Zúñiga, M., Lessard, P. and Buelna, G. 2005. Nitrogen elimination mechanisms in an aerated peat biofilter treating pig manure. *Environmental Technology*, **26** : 361-371.
- Kappelmeyer, U., Kusch, P. and Stottmeister, U. 2003. Model experiments on the influence of artificial humic compounds on chemodenitrification. *Water, Air, and Soil Pollution*, **147**: 317-330.
- Knowles, R. 1990. Acetylene inhibition technique: development, advantages, and potential problems. In N.P. Revsbech and J. Sorensen (Eds.), *Denitrification in soil and sediment*. FEMS Symposium, New-York, NY. 151-166.
- Lee, H.-W., Lee, S.-Y., Lee, J.-W., Park, J.-B., Choi, E.-S. and Park, Y.K. 2002. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology*, **41**: 85-94.
- Morkved, P.T., Sovik, A.K., Klove, B. and Bakken, L.R. 2005. Removal of nitrogen in different wetland filter materials: use of stable nitrogen isotopes to determine factors controlling denitrification and DNRA. *Water Science and Technology*, **51**(9) : 63-71.
- Ouellette, Y. 1994. Optimisation de la récupération des microorganismes fixés sur un biofiltre organique. Mémoire de maîtrise, Département de biochimie et microbiologie. Université Laval, Sainte-Foy.
- Parkin, T.B., Kaspar, H.F., Sexstone, A.J. and Tiedje, J.M. 1984. A gas-flow soil core method to measure field denitrification rates. *Soil Biology & Biochemistry*, **16**: 323-330.
- Ryden, J.C., Skinner, J.H. and Nixon, D.J. 1987. Soil core incubation system for the field measurement of denitrification using acetylene-inhibition. *Soil Biology & Biochemistry*, **19**(6): 753-757.
- Seitzinger, S.P., Nielsen, L.P., Caffrey, J. and Christensen, P.B. 1993. Denitrification measurements in aquatic sediments: A comparison of three methods. *Biogeochemistry*, **23**: 147-167.

- Sigunga, D.O. 2003. Potential denitrification: concept and conditions of its measurement. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **34**(17-18): 2405-2418.
- Thorn, K.A. and Mikita, M.A. 2000. Nitrite fixation by humic substances: Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance evidence for potential intermediates in chemodenitrification. *Soil Science Society of American Journal*, **64**: 568-582.
- Yoshinari, T. and Knowles, R. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **69**(3): 705-710.
- Yoshinari, T., Hynes, R. K. and Knowles, R. 1977. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **9**: 177-183.

