



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



Faculté des Sciences et Technologies - Campus Aiguillettes - BP 70239 - 54506
Vandœuvre-Lès-Nancy

Projet de Fin d'études

Master 2 Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement

Spécialité Microbiologie Environnementale et Sanitaire (MES)

Hassan KHALIL

**Dynamique des communautés bactériennes des boues d'épuration lors de leur
enrichissement en bactéries *Anammox***

Maître de stage : DABERT Patrick – Directeur de Recherche – Responsable de
l'équipe PANDOR.

Organisme d'accueil : Institut national de recherche en sciences et technologies
pour l'environnement et l'agriculture.

Unité d'accueil : Unité de Recherche « Gestion environnementale et traitement
biologique des déchets » (GERE).

Lieu de stage : Irstea, 17 Avenue de Cucillé, 35000 Rennes.

Date de stage : 18/01/2015 au 03/07/2015.



Remerciements

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et ma profonde gratitude à Monsieur Patrick Dabert (Directeur de recherche) de m'avoir encadré dans mon stage de fin d'études, et par son accueil au sein du laboratoire de Gestion environnementale et traitement biologique des déchets (GERE) et son équipe PANDOR, jusqu'à la correction du manuscrit via les réunions scientifiques.

Je tiens à remercier ensuite Monsieur Albert Magri (Chercheur), et Romain Connan (co-encadrant, Doctorant) pour leurs précieux conseils qui m'ont accompagné durant mes travaux. Je souhaite à Romain la réussite.

Ainsi que, Sophie Le Roux (co-encadrant, TR) pour son aide et sa collaboration. Je n'oublie pas d'adresser mes remerciements à toute l'équipe PANDOR Rennes.

Je remercie fortement mes enseignants à la faculté de Sciences et Technologies- Université de Lorraine et un remerciement particulier à Monsieur Pierre Leblond (Responsable du Master BioMANE) et Madame Claire Bertrand pour leur soutien, ainsi que tout le staff administratif.

J'adresse un remerciement particulier aux membres du Jury.

Je tiens à remercier ma famille pour son soutien aussi moral que financier et pour son sacrifice.

Encore un merci, à tous mes amis.

Irstea-Rennes

Le centre de recherche de Rennes (sous la direction de Monsieur José Martinez) est l'une des neuf implantations d'Irstea, EPST (Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique) sur le territoire national.

Il est implanté sur le site de Beauregard où il réunit sur 4 000 m² une soixantaine d'agents permanents dont 30 ingénieurs et chercheurs et une vingtaine d'agents accueillis : doctorants, post-doctorants, CDD.

Ses activités de recherche, d'expertise et d'appui aux politiques publiques environnementales s'articulent autour de 2 domaines d'après deux unités de recherche :

- GERE (Gestion environnementale et traitement biologique des déchets) qui est sous la direction de Monsieur Fabrice Béline, s'intéresse à la conception et au développement de procédés biologiques de traitement des déchets et effluents organiques (déchets municipaux, effluents d'industries agro-alimentaires, effluents d'élevage) et à leur gestion.
- TERE (Technologies des équipements agroalimentaires) qui est sous la direction de Monsieur François Mariette, focalise sur la connaissance et l'amélioration de la qualité et de la sécurité des produits alimentaires, des procédés de transformation et plus généralement la maîtrise des procédés industriels appliqués au secteur agro-alimentaire (IAA).

Le Centre Irstea de Rennes est membre associé du PRES UEB (Pôle Recherche Enseignement Supérieur Université Européenne de Bretagne) depuis le 9 juin 2008, devenu CUE (Communauté d'Université et Etablissements) le 22 juillet 2013.

ABSTRACT:

The anaerobic ammonium oxidation (anammox) with nitrite is still not known although very effective process for the treatment of effluents with a high ratio N / C. The enrichment anammox bacteria using six sludges sampled from different environments was performed in the laboratory, in batch cultures, during 4 months and under controlled conditions. Two different nitrite supply strategies were applied during the enrichment; i.e., (i) low initial concentration at 25 mg NO₂⁻-N/L and progressive increase to 150 mg NO₂⁻-N/L, and (ii) constant high concentration at 150 mg NO₂⁻-N/L. The aim of my internship was to study the evolution of the microbial communities during the enrichment. Both, total and anammox bacteria communities were assessed using the quantitative polymerase chain reaction (q-PCR). The results validated the enrichment of anammox bacteria in all the batch cultures at low initial nitrite concentration, where anammox bacteria became abundant within the microbial community at the end of the enrichment. A change of dominant anammox bacteria was observed in certain conditions during the enrichment.

Keywords: Enrichment – q-PCR – anammox bacteria – Microbial community- batch culture

R É S U M É :

L'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox) par le nitrite est un processus encore mal connu bien que très prometteur pour le traitement des effluents à fort ratio N/C. Des enrichissements en bactéries anammox ont été réalisés en culture discontinue sur une période de 4 mois à partir de six biomasses environnementales. Deux stratégies d'alimentation ont été appliquées ; i.e., (i) augmentation progressive de la concentration en nitrite de 25 jusqu'à 150 mg NO₂⁻-N/L, et (ii) forte concentration constante à 150 mg NO₂⁻-N/L. Mon stage consiste à étudier la dynamique des communautés bactériennes lors de leur enrichissement en populations Anammox. En utilisant la technologie d'amplification en chaîne par polymérase en temps réel (q-PCR), les bactéries totales et les bactéries anammox ont été quantifiées. Nos résultats valident le bon déroulement d'enrichissements dans tous les inocula alimentés par une faible concentration initiale en nitrite, et les bactéries anammox deviennent abondantes à la fin de la période expérimentale. Cet enrichissement s'accompagne dans certaines conditions d'un changement de populations anammox dominante dans les échantillons.

Mots clés : Enrichissement- q-PCR - Bactéries anammox – Communautés bactériennes- culture discontinue

Sommaire

I.	Introduction	1
II.	Revue bibliographique	2
1.	Historique (Anammox)	2
2.	Caractéristiques d'Anammox	3
a.	Caractéristiques microbiologiques	3
b.	La biochimie de l'oxydation anaérobie de l'ammonium	4
3.	Biodiversité des bactéries anammox	4
4.	Facteurs influençant la croissance des bactéries anammox	6
a.	Oxygène	6
b.	Température	7
c.	Concentrations en substrats	7
i.	Le nitrite	7
ii.	L'ammonium	8
iii.	Les mécanismes d'inhibition et le pH	8
d.	Autres facteurs	9
5.	Méthodes de détection d'anammox	9
a.	Mesures d'activité anammox	9
i.	Incubation avec ¹⁵ N- ammonium	9
ii.	Suivi des concentrations en ammonium et nitrite en conditions anaérobies	10
b.	Détection des bactéries anammox	10
i.	Analyse des lipides laddérane	10
ii.	Cytométrie en flux (FISH)	10
iii.	PCR quantitative	10
III.	Sujet de stage	12
IV.	Matériels et méthodes	12
1.	Enrichissement Anammox en culture discontinue	12
2.	Techniques moléculaires pour l'étude de la diversité microbienne des échantillons de cultures d'enrichissement	14
a.	Extraction de l'ADN total	14
b.	Etude des communautés microbiennes par PCR quantitative	14
c.	Clonage et séquençage du gène hydroxylamine oxidoréductase (<i>hzo</i>)	15

V. Résultats.....	17
1. Mise en place d'un protocole de qPCR pour le couple d'amorces <i>hzo</i>	17
a. Optimisation des conditions de réaction.....	17
b. Détermination du seuil de détection de la q-PCR.....	18
2. Dynamique des communautés bactériennes lors des enrichissements en populations <i>Anammox</i> d'inocula alimentés par de faibles concentrations en nitrite.....	
a. Quantification des bactéries anammox dans les biomasses initiales et finales.....	18
b. Suivi des communautés bactériennes lors des enrichissements.....	19
3. Dynamique des communautés bactériennes lors des enrichissements en populations <i>Anammox</i> des inocula alimentés à forte concentration en nitrite.....	21
4. Identification des bactéries anammox dans les inocula 2 et 3.....	21
VI. Discussions.....	23
VII. Conclusions.....	28
VIII. Perspectives.....	29

Liste des Figures

Figure 1 : Cycle de l'azote dans les OZMs .

Figure 2 : La relation phylogénétique entre *Anammox* et les différents groupes bactériens basés sur la phylogénie de l'ARNr 16S.

Figure 3 : Dessin représentant la cellule *Anammox* et la mise en évidence de la membrane anammoxosome avec les enzymes impliqués dans le processus anammox.

Figure 4 : L'incubation d'un enrichissement contenant des bactéries anammox avec du $^{15}\text{NH}_4^+$ (Kuypers et al. 2005).

Figure 5 : Evolution des formes de l'azote dans la bouteilleensemencée avec l'inoculum 3 et alimentée par une faible concentration de nitrite.

Figure 6 : Evolution des formes de l'azote dans la bouteilleensemencée avec l'inoculum 3 et alimentée par une forte concentration de nitrite.

Figure 7 : Courbes d'amplification du gène *hzo* par le couple d'amorces *hzocl1f1*-*hzocl1R2*

Figure 8 : Représentation de la courbe standard pour une concentration des amorces *hzocl1f1*-*hzocl1R2* à 250nM/250nM.

Figure 9 : Détermination du seuil de détection et schéma représentatif de la courbe de dissociation

Figure 10 : Activité et dynamique des bactéries anammox par rapport aux bactéries totales dans les enrichissements alimentés par une faible concentration de nitrite initiale (25mg-NO₂-N/L/Jour).

Figure 11 : Activité et dynamique des anammox par rapport aux bactéries totales dans les enrichissements alimentés par une forte concentration de nitrite initiale (150 mg-NO₂-N/L/Jour)..

Figure 12 : Arbre phylogénétique consensus des séquences du gène *hzo* des enrichissements étudiés et de leurs plus proches parentes.

Liste des Tableaux

Tableau 1. Taxonomie des bactéries anammox.

Tableau 2. Niche écologique des différents genres *Anammox*.

Tableau 3. Inhibition du processus anammox par le nitrite.

Tableau 4. Echantillons biologiques étudiés, localisations géographiques.

Tableau 5. Liste des amorces utilisées pour l'amplification de PCR de fragments d'ADN *hzo* et *ADNr16S Plantomycètes*.

Tableau 6. . Programme des différentes réactions de PCR, PCR clonage et PCR quantitative en temps réel.

Tableau 7. Milieux réactionnels de différentes réactions : PCR, PCR clonage et PCR quantitative en temps réels.

Tableau 8. Présence d'anammox dans les biomasses environnementales en début et fin enrichissement à faible concentration en nitrite (bouteilles 1 à 6).

Tableau 9. Présence d'anammox dans les biomasses environnementales en début et fin enrichissement à forte concentration en nitrite.

Tableau 10. Evolution des bactéries dans les biomasses environnementales en début et fin enrichissement à faible et forte concentration en nitrite.

Abréviations

Eq. : Equation

IC₅₀: Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition

OZM : Zone Dépourvue d'Oxygène

RDR : Réacteur à Disque Rotatif

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase

qPCR: Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNr : ADN ribosomale

ARN : Acide RiboNucléique

Hzo : Hydroxylamine oxydoréductase

Ct : Cycle Threshold ou cycle seuil

ND: Nanodrop

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

SBR: *Sequencing Batch Reactor* / Réacteur séquentiel discontinu

Pb : Paire de bases

T_m : Température de fusion de l'ADN

FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence

dNTP: Désoxyribonucléotides tri-phosphate

I. Introduction

En France, les $\frac{3}{4}$ du cheptel porcin sont localisés dans le Grand-Ouest, essentiellement en Bretagne qui représente près de 60% de la production nationale de viande porcine (FranceAgrimer 2012; Bizien 2013) pour 7% des terres agricoles.

Les deux principaux "effluents d'élevage" générés sont le lisier et le fumier. Ces effluents sont traditionnellement stockés en hiver et en été pour être épandus comme engrais en agriculture au printemps et à l'automne. Cette pratique induit des problèmes environnementaux : les émissions d'ammoniac au stockage entraînent une acidification du milieu récepteur (Sandars et al. 2003; Lopez-Ridaura et al. 2009), les excédents d'éléments nutritifs dans le sol causent un ruissèlement de nitrates et de phosphates très solubles dans les eaux de surface et les nappes phréatiques. Ces concentrations excessives d'azote et de phosphore dans l'eau peuvent entraîner une eutrophisation des rivières à débit lent, des lacs, des réservoirs et des zones côtières.

Pour lutter contre cette pollution près de 450 stations de traitement de lisier de porcs ont été construites en Bretagne depuis 2000 pour traiter les excédents d'azote, grâce à l'engagement de 630 éleveurs. La majorité des stations utilise un procédé biologique (nitrification-dénitrification) identique à celui mis en œuvre pour le traitement des effluents domestiques (Bizien 2013). La *nitrification* consiste d'abord en l'oxydation de l'azote ammoniacal (NH_4^+) en nitrite (NO_2^-), un état intermédiaire, puis ce dernier est rapidement oxydé en nitrate (NO_3^-) (Figure 1). Cette transformation est effectuée en présence d'oxygène par des bactéries autotrophes nitrifiantes. Le nitrate produit est ensuite éliminé des eaux usées en ayant recours à la *dénitrification*. Cette étape est un processus anoxique au cours duquel les bactéries hétérotrophes anaérobies facultatives vont modifier leur métabolisme pour utiliser les formes oxydées de l'azote (NO_2^- , NO_3^-) comme accepteurs d'électron au lieu de l'oxygène moléculaire. La réduction biologique du nitrate au cours de la dénitrification mènera à la production finale de N_2 (produit gazeux inerte) (Figure 1).

En parallèle, la production porcine bretonne s'est engagée dans le défi énergétique en développant la méthanisation des lisiers qui permet de produire de l'énergie renouvelable. La méthanisation est un procédé biologique de traitement des effluents dans un digesteur en conditions anaérobies. Ces conditions permettent la croissance d'un consortium microbien spécifique assurant la biodégradation de la matière organique en biogaz (mélange de méthane (CH_4) et de CO_2). Ce biogaz peut être utilisé pour produire de l'électricité, mais il peut aussi être utilisé en cogénération pour chauffer des bâtiments, produire de l'eau chaude ou encore

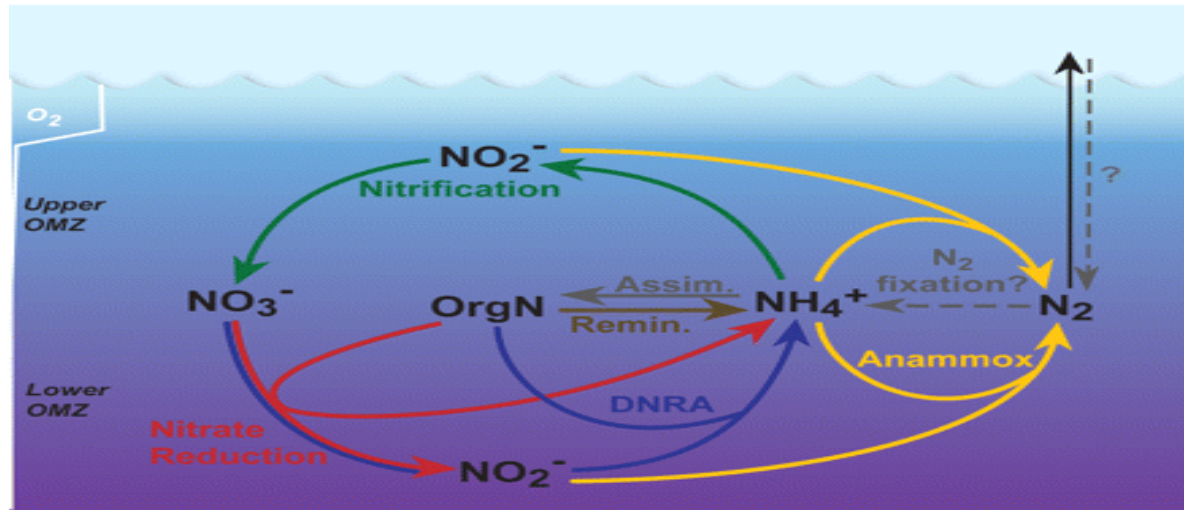


Figure 1. Cycle de l'azote dans les OZMs : 'Assim.' : pour l'assimilation (gris) et 'Remin.' pour la reminéralisation (Lam et al. 2009). **Anammox** : Oxydation anaérobie de l'ammonium, **DNRA** : Réduction dissimilative du nitrate en ammonium, OrgN : matière organique.

sécher des produits. La matière non digérée constitue le digestat qui est aujourd'hui géré par épandage agricole. Comme pour les lisiers, les risques d'émissions de NH_3 lors du stockage et de l'épandage des digestats sont élevés car l'azote est quantitativement conservé pendant la méthanisation. Un traitement ultérieur des digestats est donc nécessaire dans les zones où la production d'élevage est en excédent azoté. Toutefois, ce traitement ne peut pas être réalisé par des stations de traitement biologiques de type nitrification-dénitrification car les digestats sont particulièrement riches en azote et pauvres en carbone.

Le processus Anammox (ANAerobic-AMMonium-Oxidation) est une nouvelle voie dans le cycle de l'azote (Figure 1). Ce processus consiste à oxyder l'ammonium en conditions anaérobies en utilisant le nitrite comme accepteur d'électrons au lieu de l'oxygène. Il aboutit à la production finale de N_2 (produit gazeux inerte) et de nitrate. Il est réalisé par des microorganismes autotrophes à ce jour non cultivés en souches pures mais pour lesquels des conditions d'enrichissement sont connues en réacteurs de laboratoire. La mise en œuvre de ces microorganismes dans un réacteur pourrait permettre l'épuration des digestats de méthanisation agricole. En effet, les digestats constituent a priori un bon substrat pour les bactéries anammox.

Les travaux réalisés dans cette étude avaient pour objectif d'analyser l'évolution de la communauté microbienne de réacteurs de laboratoire d'enrichissement de bactéries anammox.

II. Revue bibliographique

1. Historique (Anammox) :

Les cycles biogéochimiques sont des processus complexes au sein desquels les microorganismes jouent un rôle majeur. Le cycle de l'azote, étudié depuis la fin du XIX^{ème} siècle, n'a pas encore livré tous ses secrets.

L'oxydation anaérobie de l'ammonium (Anammox) est une nouvelle voie métabolique dans le cycle de l'azote (Figure 1, Lam et al. 2009), offrant des nouvelles opportunités aux ingénieurs du génie des procédés et aux microbiologistes. L'existence de bactéries capables d'effectuer l'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox), avec du nitrate ou du nitrite, jusqu'au gaz diazote avait été proposée il y a plusieurs années sur la base de calculs théoriques et d'anomalies observées dans les bilans azotés (Hamm et al. 1941; Broda 1977). Cependant, il a fallu attendre les années 1990 pour que leur existence soit documentée dans un réacteur de dénitrification à Delft, aux Pays Bas sans toutefois réussir à isoler et cultiver le microorganisme enrichi (Mulder et al. 1995; Van de Graaf et al. 1995).

Le "lithotrophe manquant" a finalement été identifié grâce aux techniques de biologie moléculaire comme un groupe monophylétique de bactéries appartenant au phylum des *Planctomycètes* en 1999 (Figure 2, Strous et al. 1999). Suite à cette découverte, des stations d'épuration des eaux usées, et des usines de traitement de lixiviats, ont signalé une perte d'ammonium non caractérisée, qui ne pouvait être expliquée que par une activité Anammox (Helmer et al. 1999; Siegrist et al. 1998).

Il a fallu encore quelques années pour identifier le processus dans des conditions environnementales. C'est arrivé en 2002, lorsque la première preuve directe dans un environnement naturel - un sédiment marin - a été apportée (Thamdrup et Dalsgaard 2002). Depuis, le processus a également été identifié dans divers autres habitats : une colonne d'eau de la mer Noire (Kuypers et al. 2003), les glaces marines de l'Arctique (Rysgaard et Nohr Glud 2004), les sédiments de mangrove subtropicale (Meyer et al. 2005) et un système lacustre (Schubert et al. 2006).

1. Caractéristiques d'Anammox :

a. Caractéristiques microbiologiques :

Les bactéries anammox sont des cellules d'environ 1 µm de diamètre avec une organisation de leur enveloppe cellulaire très différente de celle des bactéries Gram négatives ou positives. Elles sont constituées d'une paroi cellulaire dépourvue de peptidoglycane, d'une membrane cytoplasmique et d'une membrane intra-cytoplasmique. Leur cytoplasme est divisé en trois compartiments : le paryphoplasme, le riboplasme et l'anammoxosome (Figure 3, Niftrik et al. 2004). Ce dernier compartiment est spécifique des bactéries anammox.

Ces micro-organismes sont anaérobies strictes et chimiolithoautotrophes (Niftrik et al. 2004). Elles sont caractérisées par un faible taux de croissance. Leur temps de doublement est de l'ordre de 1,8 à 11 jours (Magrí et al. 2012), leur rendement cellulaire est très bas (0,11 g VSS/g $\text{NH}_4^+\text{-N}$) et elles sont très sensibles aux variations de conditions environnementales, ce qui les rend extrêmement difficiles à cultiver (Strous et al. 1999; Ni et al. 2011).

Jusqu'à présent, tous les essais pour obtenir des cultures pures de bactéries anammox ont échoué. Seules des cultures d'enrichissement sont disponibles et tout ce que nous connaissons dérive de ces enrichissements (Dalsgaard et al. 2005).

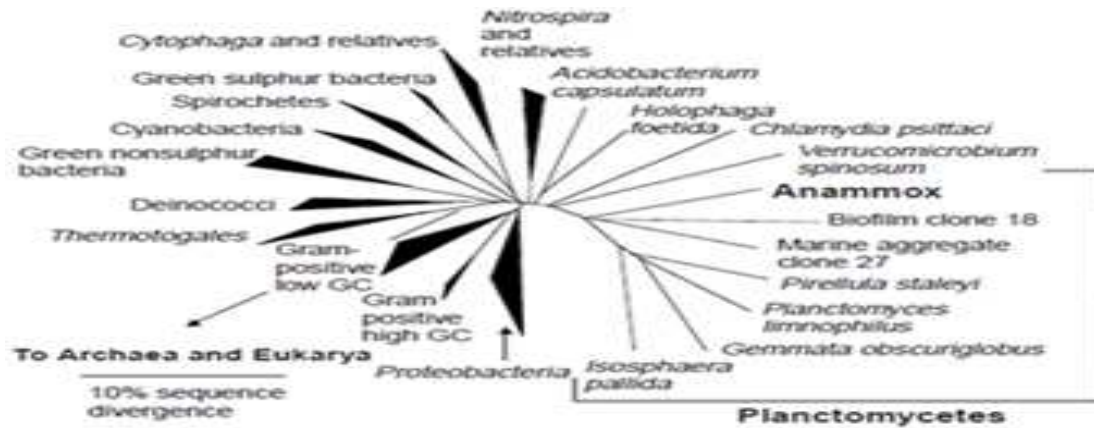


Figure 2. La relation phylogénétique entre Anammox et les différents groupes bactériens basés sur la phylogénie de l'ARNr 16S. La bactérie Anammox représente une nouvelle branche à l'intérieur du phylum *Planctomycètes* (Strous et al. 1999).

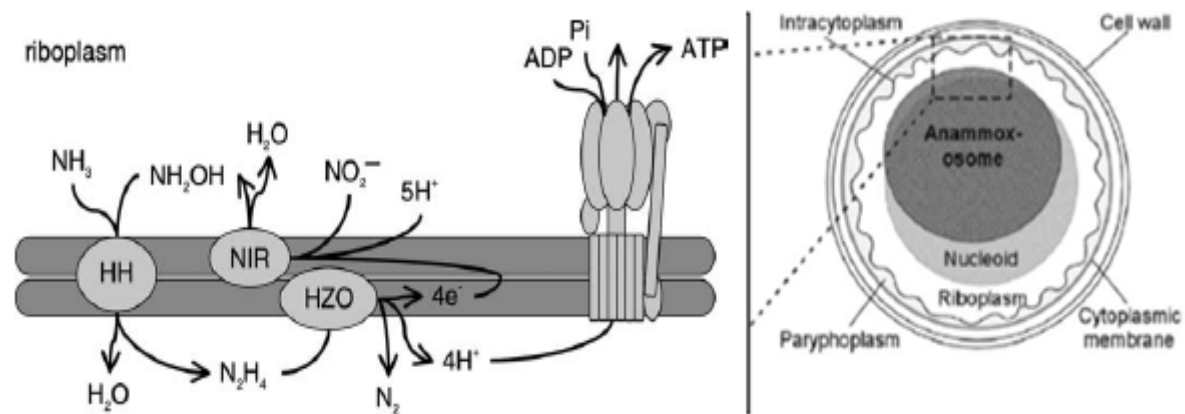


Figure 3. À droite : Dessin représentant la cellule Anammox. À gauche : Mise en évidence de la membrane anammoxosome avec les enzymes impliqués dans le processus anammox. HH : Hydrazine Hydrolase ; HZO : Hydrazine Oxydoréductase ; NIR : Nitrite Réductase (Brandes et al. 2007; Van Niftrik et al. 2004).

b. La biochimie de l'oxydation anaérobie de l'ammonium :

La biochimie des bactéries anammox n'est pas encore complètement résolue. Il est connu que le processus anammox prend place dans l'anammoxosome et qu'il a pour objectifs la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) et la fixation du carbone (Niftrik et al. 2004).

Production d'énergie et du gaz diazote. D'après le mécanisme proposé (Schalk et al. 2000; Brandes et al. 2007; Jetten et al. 2001; Jetten et al. 1999) (Figure 3 – page 3bis), le nitrite est réduit en hydroxylamine (NH_2OH) par une nitrite réductase (NIR). Ensemble, l'ammonium et l'hydroxylamine sont utilisés par l'hydrazine hydrolase (HH) aboutissant à la production de l'hydrazine (N_2H_4). L'hydrazine oxydoréductase (HZO) oxyde l'hydrazine en gaz diazote et libère 4 protons et 4 électrons. Les 4 électrons libérés sont utilisés avec 5 protons du riboplasme par la nitrite réductase (Nir) pour compléter le cycle catalytique. (Eq. (1) (2) (3)). L'ensemble des réactions établit un gradient de protons qui est utilisé pour la synthèse de l'ATP catalysée par l'adénosine triphosphatase (ATPases) liée à la membrane de l'anammoxosome. L'ATP synthétisé serait alors libéré dans le riboplasme.

Equation 1: $\text{NO}_2^- + 5\text{H}^+ + 4\text{és} = \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$

Equation 2: $\text{NH}_2\text{OH} + \text{NH}_3 = \text{N}_2\text{H}_4 + \text{H}_2\text{O}$

Equation 3: $\text{N}_2\text{H}_4 = \text{N}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{és}$

Fixation du carbone. L'excès de nitrite (0,3 mole/mole d'ammonium) est oxydé par voie anaérobie en nitrate. Les électrons provenant de cette oxydation sont probablement utilisés pour la fixation du CO_2 (A. A. van de Graaf et al. 1996). Ainsi, la réaction catabolique (Eq. (4)) est effectuée 15 fois pour fixer une molécule de dioxyde de carbone avec du nitrite. Le nitrite, en libérant des électrons conduit à la production anaérobie de nitrate (Eq. (5)).

Le bilan global de la réaction proposé par (Strous et al. 1998) pour la conversion de NH_4^+ et NO_2^- en N_2 et NO_3^- (Eq.(6)) est de 1,00 :1,32 :1,02 :0,26 de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{N}_2:\text{NO}_3^-$, respectivement.

Equation 4: $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- = \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \quad (\times 15)$

Equation 5: $\text{CO}_2 + 2\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} = \text{CH}_2\text{OH} + 2\text{NO}_3^-$

Equation 6: $\text{NH}_4^+ + 1.32\text{NO}_2^- + 0.066\text{HCO}_3^- \rightarrow 1.02\text{N}_2 + 0.256\text{NO}_3^- + 0.066\text{CH}_2\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.15} + 2.03\text{H}_2\text{O}$

3. Biodiversité des bactéries Anammox :

Jusqu'à maintenant cinq genres des bactéries Anammox ont été identifiés dans la littérature formant ensemble un groupe monophylétique « Brocadiales ». Dans ce groupe, 13 espèces différentes ont été identifiées (Tableau 1) (Ali et al. 2013). Ces différents genres semblent

Tableau 1. Taxonomie des bactéries anammox.

Taxonomie des bactéries Anammox						
Genre	Espèces					
<i>Ca. Brocadia</i>	anammoxidans	fulgida	sinica			
<i>Ca. Kuenenia</i>	stuttgartiensis					
<i>Ca. Scalindua</i>	brodae	wagneri	sorokinii	arabica	sinooilfield	zhenghei
<i>Ca. Anammoxoglobus</i>	propionicus	sulfate				
<i>Ca. Jettenia</i>	asiatica					

pouvoir occuper des niches écologiques différentes. Le métabolisme des bactéries anammox leur permet de coloniser des habitats et de s'adapter à des situations nouvelles en utilisant une variété de donneurs et accepteurs d'électrons (par exemple le manganèse, les oxydes de fer, et le formate) (Strous et al. 2006). En effet, ces bactéries sont régulièrement en compétition avec les autres bactéries du cycle de l'azote (les bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes) et avec les archées en raison des interactions biologiques entre ces groupes microbiens pour l'azote et le CO₂.

Un potentiel de différenciation de niche spécifique a ainsi été observé pour chaque genre *Anammox* dans les systèmes naturels et anthropiques, et même une domination dans certains environnements (comme les zones dépourvues d'oxygènes). Les exemples les plus évidents comprennent les milieux marins, les stations d'épuration des eaux usées, les eaux douces, les estuaires, une bouche hydrothermale des grands fonds marins (Tableau 2).

Ces observations ont conduit à de nombreuses hypothèses concernant les conditions environnementales propices à l'enrichissement en bactéries anammox :

La salinité, Brummer et al. 2004 ont suggéré que les espèces de *Planctomycètes* dans les eaux douces sont différentes de celles présentes dans les milieux marins. Dans un certain nombre d'estuaires, le taux d'anammox diminue avec l'augmentation de la salinité (Trimmer et al. 2003). La balance des communautés anammox se modifie en favorisant la croissance des genres les mieux adaptés à l'augmentation de la salinité (Kartal et al. 2006).

La présence de matière organique et/ou de nutriments, un changement dans les conditions environnementales (par exemple pour le démarrage d'un bioréacteur pour l'enrichissement anammox) peut aussi déclencher un changement dans le genre anammox dominant (van der Star et al. 2007). Les concentrations en nitrite et micronutriments, l'usage d'autres sources d'énergie alternatives, la présence de sources de carbone (propionate ou acétate) (Kartal et al. 2007, , Kartal et al. 2008) ainsi que des apports anthropiques de substances nutritives peuvent entraîner des modifications marquées dans la structure de la communauté (Li et al. 2011).

Candidatus Brocadia et *Kuenenia* ont attiré beaucoup d'attention parce qu'ils sont les genres communs dans les stations d'épuration des eaux usées. La différence de niche entre ces deux genres n'est toujours pas résolue. Ainsi, le changement de dominance au cours du temps de *Brocadia* vers *Kuenenia* a été observé dans un réacteur à biofilm sur membrane (MBR) (van der Star et al. 2008) et dans des réacteurs discontinus. Dans les deux cas l'affinité pour le nitrite est supposée être le facteur limitant. Basé sur ces observations, les auteurs ont supposé que

Tableau 2. Niche écologique des différents genres *Anammox*.

Genre	Niche	Référence
<i>Ca. Brocadia</i> / <i>Ca. Kuenenia</i>	STEP	van der Star et al. 2007; van der Star et al. 2008
	Eaux douce	(Kartal et al. 2006)
	Estuaire (eau douce)	(Dale et al. 2009; M. Li et al. 2011)
<i>Ca. Scalindua</i>	Milieux marins	Dale et al. 2009; Dang et al. 2010; Hong et al. 2011)
	Estuaire (zone saumâtre)	(M. Li et al. 2011)
<i>Ca. Jettenia</i>	Estuaire (eau douce)	(Dale, et al. 2009; M. Li et al. 2011)

Kuenenia est un stratège (k) et *Brocadia* un stratège (r) (van der Star et al. 2008). Les affinités réelles pour le nitrite n'ont cependant pas été évaluées avec suffisamment de précision pour prouver cette hypothèse ($K_s = 0,2$ à $3 \mu\text{M}$ pour *Kuenenia* (van der Star et al. 2008) et $< 5 \mu\text{M}$ pour *Brocadia* (Strous et al. 1999).

4. Facteurs influençant la croissance des bactéries anammox :

Les bactéries anammox ont des taux de croissance très faibles, et donc de longues périodes de démarrage sont nécessaires pour leur enrichissement. Des périodes de 58 jours (Liao et al. 2007) et 60 jours (Dapena-Mora et al. 2007) ont été rapportées dans des bioréacteurs discontinus (SBR) en utilisant des boues granulaires méthanogènes ou des boues activées comme inoculum. Dans des installations à grande échelle, des temps de génération de 11 jours (van der Star et al. 2007) et 27 jours (Joss et al. 2009) ont été mesurés. Ces caractéristiques font que la mise en œuvre des bactéries anammox dans un procédé de traitement est délicate pour obtenir un enrichissement puis maintenir l'activité dans le procédé. Des stratégies ont été rapportées dans la littérature visant à réduire le temps de démarrage et/ou à favoriser la formation d'un biofilm (Fernández et al. 2008), y compris l'utilisation des bioréacteurs à membrane (MBR) (van der Star et al. 2008).

Néanmoins, l'exposition à des conditions inhibitrices pourrait conduire à l'échec complet du réacteur, quelle que soit la stratégie utilisée pour conserver la biomasse et le maintien des bactéries anammox. Ainsi, la récupération de la capacité complète du traitement des eaux usées serait très longue. Très peu d'informations sont disponibles sur la sensibilité des bactéries anammox aux composés communément trouvés dans les eaux usées. Il faut prendre en considération la concentration des substrats, le taux d'oxygène, la température et le pH etc. pour l'application et l'industrialisation du procédé.

a. Oxygène :

En raison de leur métabolisme oxydatif anaérobie, l'oxygène dissout est un paramètre critique pour la croissance des bactéries anammox (Jung et al. 2007). Il a été signalé que le processus d'oxydation anaérobie de l'ammonium est inhibé de façon réversible par de l'oxygène dissous à un taux faible ($< 1\%$ de la saturation de l'air) (Strous et al. 1997). En revanche, une inhibition irréversible survient à de fortes concentrations ($> 18\%$ de la saturation de l'air) (Egli et al. 2001). Par conséquent, l'oxygène dissout doit être strictement contrôlé dans les procédés pour éviter l'arrêt du processus et protéger le maintien des bactéries anammox.

b. Température :

L'activité maximale d'anammox a été observée entre 35 et 40°C dans un réacteur discontinu séquentiel (Dosta et al. 2008). Egli et ses collègues ont signalé une température optimale de 37°C pour anammox (Egli et al. 2001). Des températures supérieures à la gamme donnée provoquent une chute irréversible de l'activité anammox due à la lyse cellulaire, tandis que des températures inférieures à 15°C rendent le processus instable (Dosta et al. 2008).

Dans les environnements marins où *Candidatus Scalindua* est le seul genre détecté, une activité anammox optimale a été mesurée à 12°C (Rysgaard et al. 2004). Ces résultats suggèrent que l'activité anammox est différente suivant le genre considéré, mais aussi qu'un processus anammox pourrait être acclimaté et ensuite utilisé pour traiter les eaux usées à des températures différentes.

c. Concentrations en substrats :

Les bactéries anammox peuvent être inhibées par leurs propres substrats, le nitrite et l'ammonium. Généralement elles sont plus sensibles à des concentrations élevées de nitrite que de fortes concentrations d'ammonium. Il sera important de contrôler les concentrations de ces substrats dans les bioréacteurs et de régler leur stœchiométrie dans l'influent. En outre, la littérature ne propose pas de consensus concernant les valeurs limites (seuil) d'inhibition.

i. Le nitrite

De nombreuses recherches ont confirmé que le nitrite est un rétro inhibiteur de l'oxydation anaérobie de l'ammonium lorsqu'il atteint de trop fortes concentrations. Cependant, les seuils d'inhibition observés varient entre 48 et 750 mg N-NO₂/L selon les modes opératoires (Tableau 3). Ces différences de seuil peuvent être attribuables à des différences de caractéristiques de la biomasse (espèces anammox) et/ou des conditions opérationnelles (pH, configuration du réacteur, température, concentrations en substrats etc.).

Dans un SBR contenant une biomasse anammox agrégée (80% bactéries anammox/bactéries totales), une inhibition immédiate et complète du processus anammox a été observée à des concentrations supérieures à 100 mg N-NO₂/L de nitrite (Strous et al. 1999). D'autre part, en gardant la concentration en ammonium initiale constante à 42 mg/L dans différents Fed-batch, Egli et al. (2001) ont observé une inactivation complète du processus à des valeurs supérieures à 185 mg N-NO₂/L.

En utilisant de la biomasse granuleuse, une meilleure tolérance au nitrite a été observée, l'IC₅₀ est à 350-400 mg-N/L de NO₂⁻ (Cho et al. 2010; Dapena-Mora et al. 2007; Lotti et al. 2012),

Tableau 3. Inhibition du processus anammox par le nitrite.

Biomasse	Espèces	Bioréacteur	Mode opératoire	pH	NO ₂ ⁻ (mg-N/L)	Effet	Référence
Boues anammox		SBR	Batch	7-7.8	>100	Inhibition complète	(Strous et al. 1999)
Biofilm de bactéries nitrifiantes	<i>C. Brocadia</i> <i>Anammoxidans</i> <i>C. Kuenenia stuttgartiensis</i>	Flacon de 60 ml	Batch	7	>180	Inhibition complète	(Egli et al. 2001)
Boues des réacteurs à lit fluidisé	<i>C. Kuenenia stuttgartiensis</i> <i>C. Brocadia anammoxidans</i>	Tubes Monod	Batch	-	>274	Inhibition complète	(Kimura et al. 2010)
		Réacteur cylindrique	Débit continue	-	>750	10% Inhibition	
Boues anammox	<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	Bouteille de 38ml	Batch	7.8	350	50 % Inhibition	(Dapena-Mora et al. 2007)
Biofilm anammox	<i>Candidatus Brocadia sinica</i>	Bouteille	Batch	7.8	224	50% Inhibition	Oshiki et al. 2011
Boues d'anammox d'un réacteur DEMON		SBR (à grande échelle)	Batch	7.3-7.5	4.8	Diminution d'activité	(Wett et al. 2007)
Boues granuleuses		Manometric	Batch	7.5	400	50% Inhibition	(Lotti et al. 2012)
Boues Anammox	<i>C. Brocadia caroliniensis</i>		Batch	-	465	50% Inhibition	(Magrí et al. 2012)
Boues Anammox granuleuse	<i>C. Brocadia anammoxidans</i>	Réacteur à lit fluidisé	Batch	-	400	50% Inhibition	(Cho et al. 2010)
Boues anammox granuleuse	<i>C. Brocadia</i> (86%)	SBR1 (eaux usées)	Batch	7.6-7.7	500	35% Inhibition	(Scaglione et al. 2012)
Boues anammox granuleuse	<i>C. Brocadia</i> (61%)	SBR2 (lixiviats de décharges)	Batch	7.6-7.7	171-173	50% Inhibition	(Scaglione et al. 2012)

probablement grâce à la limitation de la diffusion du substrat à l'intérieur des granules. D'autres auteurs ont utilisé des supports de gel dans lesquels les bactéries anammox sont piégées. Ainsi, les expériences Batch ont montré que lorsque ces supports sont immergés dans des solutions avec des concentrations supérieures à 274 mg N-NO₂/L, l'activité anammox diminue. Enfin, une chute de 90% de l'activité anammox a été constatée lorsque la concentration en nitrite approche 750 mg N-NO₂/L sur une période de 7 jours dans un bioréacteur avec alimentation continue (Kimura et al. 2010).

ii. L'ammonium

Dans la plupart des stations d'épuration des eaux usées (STEP), l'ammonium est l'une des principales formes de l'azote (Van Hulle et al. 2010). Il a été documenté que le processus anammox n'est inhibé qu'à des concentrations d'ammonium supérieures à 1000 mg-N/L (Strous et al. 1999). Cependant, d'autres études ont rapporté que de fortes concentrations d'ammoniac inhibent la réaction anammox. En effet, il semble y avoir un consensus sur le fait que NH₃, plutôt que NH₄⁺, est l'inhibiteur réel. A une concentration de 38 mg-N/L de NH₃ (équivalent à 770 mg-N/L de NH₄⁺), l'activité anammox a diminué de 50% (Dapena-Mora et al. 2007). De même, lors d'essais à court terme (Batch test), la concentration inhibitrice médiane est de 38 mg-N/L de NH₃, alors que dans des essais à long terme en réacteur discontinu séquentiel, une instabilité du procédé est observée au-delà de 20-25 mg-N/L d'ammoniac (Fernández et al. 2012).

iii. Les mécanismes d'inhibition et le pH

L'ammonium ne diffuse pas facilement à travers la membrane lipidique des cellules bactériennes, ce qui n'est pas le cas pour l'ammoniac (Kadam et al. 1996). Ainsi, il existe un équilibre chimique entre NH₃/NH₄⁺ : $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- = \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$, qui peut être affecté par le pH (Mosquera-Corral et al. 2005). La diffusion de l'ammoniac dans la cellule change le pH intracellulaire et neutralise le potentiel transmembranaire, qui peut provoquer la mort cellulaire (Martinelle et al. 1996).

De même, l'inhibition par le nitrite du processus anammox n'est pas causée par le nitrite lui-même, mais par l'acide nitreux (HNO₂) (Fernández et al. 2012) et le pH peut aussi affecter l'équilibre chimique de HNO₂/NO₂⁻ : $\text{HNO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{NO}_2^- + \text{H}_3\text{O}^+$. Ainsi, avec un pKa de 9,24 et 3,3 pour les couples acide-base NH₃/NH₄⁺ et HNO₂/NO₂⁻, (Mosquera-Corral et al. 2005), le pH du processus anammox est ajusté entre 6,5 et 8,8 avec un pH optimal à 8 (Strous et al. 1998; Oshiki et al. 2011). Le pH doit donc être rigoureusement contrôlé pendant le fonctionnement du procédé.

d. Autres facteurs :

D'autres paramètres peuvent également affecter le processus anammox. À cet égard, la présence de matière organique biodégradable dans les eaux usées conduira à une compétition pour le substrat (nitrite) entre les bactéries anammox autotrophes et les bactéries dénitrifiantes hétérotrophes, dans laquelle les bactéries anammox sont défavorisées par leur faible taux de croissance (Lackner et al. 2008).

Des concentrations de phosphate inhibitrices ont été signalées dans une large gamme de concentration entre 31 et 620 mg P/L (Dapena-Mora et al. 2007; K. Egli et al. 2001). L'impact du phosphate sur l'activité anammox dépend fortement du degré d'agrégation de la biomasse (Carvajal-Arroyo et al. 2013).

5. Méthodes de détection d'anammox :

En raison de son intérêt écologique et technologique, plusieurs méthodes ont été développées pour détecter la présence de bactéries anammox dans un écosystème. Ces méthodes peuvent être classées en deux catégories : les mesures d'activité anammox et la détection des bactéries anammox.

a. Mesures d'activité anammox

Dans les zones dépourvues d'oxygène comme les systèmes marins et les sédiments, les bactéries dénitrifiantes ont été pendant longtemps reconnues comme les seuls microorganismes responsables de la bioconversion des composés azotés (nitrite ou nitrate) en diazote gazeux dans des conditions anaérobies. Récemment, il a été montré que les bactéries « Anammox » sont responsables d'une production significative de N_2 dans certains sédiments marins avec des proportions proches de la dénitrification (Dalsgaard et al. 2003). Ainsi, la dénitrification et anammox peuvent se produire simultanément, et des méthodes adéquates sont nécessaires pour distinguer les deux phénomènes.

i. Incubation avec ^{15}N :

En incubant des sédiments ou de l'eau dans des flacons étanches avec un excès d'azote marqué sous forme de ^{15}N - ammonium ou ^{15}N -nitrate, la production de $^{29}N_2$ va permettre de conclure à une activité anammox selon la réaction (Eq. (6)) (Figure 4) (Thamdrup et Dalsgaard 2002 ; Trimmer et al. 2003 ; Kuypers et al. 2005). L'étape suivante consistera à valider ces mesures en corrélant les données métaboliques à un microorganisme. La quantité de $^{30}N_2$ formé sera très faible en l'absence de dénitrification.

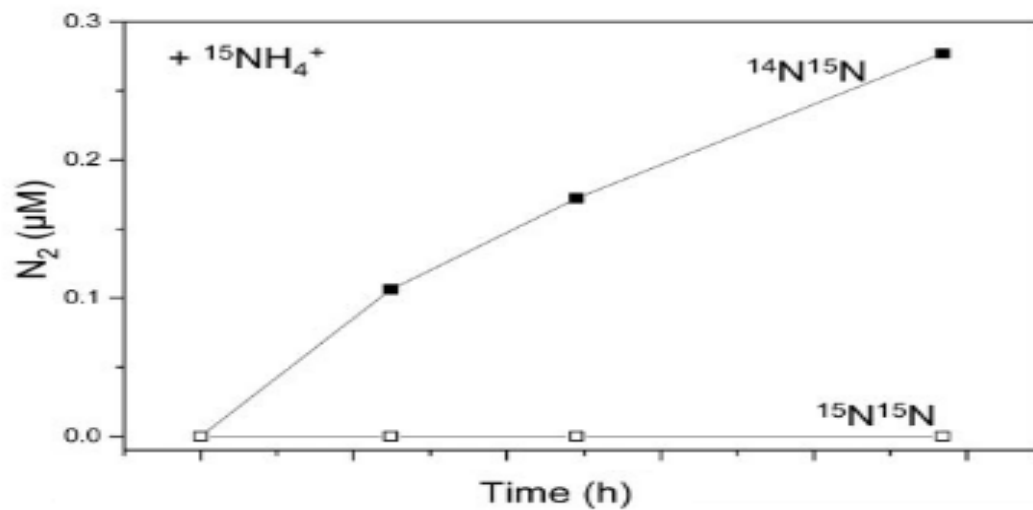


Figure 4. L'incubation d'un enrichissement contenant des bactéries anammox avec du $^{15}NH_4^+$. Les bactéries utilisent le $^{15}NH_4^+$ avec du nitrite $^{14}NO_2^-$ pour produire du $^{29}N_2$ à un taux constant dans le temps alors que presque aucun $^{30}N_2$ n'est formé par dénitrification (Kuypers et al. 2005).

ii. Suivi des concentrations en ammonium et nitrite en conditions anaérobies :

L'utilisation de molécules marquées est coûteuse et impossible sur des grands volumes d'échantillons. C'est pourquoi, la plupart des travaux réalisés à ce jour portent sur le suivi des concentrations en ammonium, nitrite et nitrate dans les procédés, par chromatographie ionique. En effet, en présence d'une activité anammox, on observera une diminution des concentrations en NO_2^- et NH_4^+ , concomitante avec une production d'azote moléculaire et de nitrate, dans des conditions anaérobies, et selon la stœchiométrie de l'Eq.(6) : 1,00 :1,32 :1,02 :0,26 de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{N}_2:\text{NO}_3^-$, respectivement.

b. Détection des bactéries anammox

Les bactéries Anammox n'étant pas isolables et cultivables en souches pures, elles peuvent être identifiées par des techniques de biochimie ou de biologie moléculaire comme la détection des lipides laddéranes, l'hybridation in situ en fluorescence (FISH), la PCR quantitative (q-PCR), ou l'analyse phylogénétique des gènes ribosomiques ARNr 16S.

i. Analyse des lipides laddéranes :

Les membranes des bactéries Anammox contiennent des lipides avec des propriétés uniques, les laddéranes (combinaison d'acide gras à liaison éther et ester), qui peuvent être utilisés en tant que biomarqueurs pour détecter leur présence dans l'environnement (Sinninghe Damsté et al. 2002, Niftrik et al. 2004). Toutefois, bien que l'analyse de ces lipides fournisse un outil puissant, plusieurs désavantages existent qui limitent l'utilisation de cette technique sur des échantillons environnementaux. Premièrement, les procédures d'extraction sont complexes (les lipides vont être extraits et séparés en acide gras et en fractions de lipides neutres puis analysés par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse), deuxièmement, un volume élevé d'échantillon est nécessaire (500 litres), et enfin, la présence de ces lipides a été observée dans de la matière organique inerte (Schmid et al. 2005 ; Jaeschke et al. 2007).

ii. Cytométrie en flux (FISH)

La FISH est une technique de microscopie dans laquelle, une hybridation spécifique des cellules ciblées est réalisée à l'aide de sondes oligonucléotidiques fluorescentes dirigées contre les ARN ribosomiques cellulaires. Les cellules marquées sont ensuite dénombrées au microscope ou en cytométrie à fluorescence. Aujourd'hui des sondes spécifiques existent pour toutes les espèces anammox connues. Cette technique permet de fournir des données qualitatives et quantitatives sur anammox dans des échantillons environnementaux (Schmid et al. 2005). Elle a été

appliquée avec succès pour la détection de ces microorganismes dans des bioréacteurs et des stations d'épurations (Pavlekovic et al. 2009).

Néanmoins, le seuil de détection est la limite basse de cette technique, 1000 cellules dans un millilitre d'eau de mer. En plus, les sondes produisent une faible fluorescence dans des échantillons contenant un biofilm, soit à cause de la faible teneur en ribosome cellulaire, soit à cause de problèmes de pénétration des sondes à travers la paroi cellulaire. Par exemple, aucune détection de bactéries anammox n'a été observée pendant les 400 premiers jours dans un réacteur à grande-échelle, à Rotterdam (van der Star et al. 2007) ou dans un réacteur biofilm à disk rotatif (RDR) en discontinu pendant 350 jours, malgré la détection d'une activité anammox (Tsushima et al. 2007).

iii. PCR quantitative

La nécessité d'une méthode rapide, spécifique, sensible et fiable est essentielle pour la quantification des bactéries anammox. Récemment, plusieurs PCR quantitatives en temps réel ont été appliquées et optimisées. L'amplification des gènes ARNr 16S a été utilisée pour dénombrer les bactéries anammox dans l'eau et les sédiments anoxiques, mais les amorces utilisées se sont révélées peu spécifiques (Junier et al. 2010). Afin de résoudre les problèmes de spécificité de détection, des gènes fonctionnels (*nirS* et *hzo*) ont été ciblés (Lam et al. 2009; Dang et al. 2010). En plus de leur grande spécificité, l'amplification des gènes fonctionnels pourrait permettre dans l'avenir d'évaluer l'activité des bactéries anammox par RT-PCR quantitative.

Avec la PCR en temps réel, les bactéries anammox ont été quantifiées dans des bioréacteurs de traitement des eaux usées (Bae et al. 2010), des sédiments marins (Meng Li et al. 2010) et des zones marines de minimum d'oxygène (OMZ) (Hamersley 2007). Le démarrage d'un bioréacteur a été contrôlé avec succès par q-PCR pendant les périodes où la conversion de l'azote ne donnait pas encore une preuve claire de l'activité anammox (van der Star et al. 2007).

III. Sujet de stage

L'objectif à long terme d'Irstea est de mettre en œuvre un réacteur biologique de traitement de l'azote des digestats de méthanisation par le procédé anammox. En l'absence d'inoculum source, la première étape du projet a consisté dans la réalisation d'enrichissements à partir de prélèvements de l'environnement (boues activées et sédiments). L'objectif de ce stage était :

- De mettre en place au laboratoire une méthode de quantification des bactéries anammox
- D'étudier la présence ou l'absence des populations anammox dans différentes sources d'inoculum et valider leur enrichissement lors des travaux réalisés antérieurement
- Identifier le genre et l'espèce des bactéries anammox présentes dans les enrichissements et rechercher des synergies / ou inhibitions dues à la présence d'autres espèces bactériennes en traitant les données brutes de pyroséquençage des ADN_r16S réalisé sur deux séries d'échantillons enrichis.
- Rechercher des corrélations entre les données métaboliques obtenues lors des enrichissements (NH_4^+ , NO_2^- et NO_3^- par analyses chimiques réalisées avant mon arrivée) et l'évolution des communautés microbiennes déterminée par q-PCR et pyroséquençage.

IV. Matériels et méthodes

1. Enrichissements Anammox en culture discontinue (travaux réalisés avant le stage) :

Six biomasses ont été collectées dans des zones naturelles ou anthropisées potentiellement riches en azote et suspectées selon les données bibliographiques de contenir des bactéries anammox (Tableau 4).

Tableau 4. Echantillons biologiques étudiés, localisations géographiques

Numéro de l'Inoculum	Echantillons	Sources
1	Boues activées	Station d'épuration des eaux usées - Betton-France
2	Boues activées	Station de traitement de lisier de porc - Meslin-France
3	Boues activées	Station de traitement de lisier de porc - Calldetenes-Espagne
4	Sédiments	Lagune de traitement des eaux usées - Amanlis-France
5	Sédiments	Lagune de finition du traitement des eaux usées - Amanlis-France
6	Sédiments	Lagune aérée de traitement de lisier de porc - Almancelles-Espagne

Chaque biomasse a été répartie à parts égales dans 2 bouteilles en verre hermétiquement fermées et « flushées » à l'azote pour créer des conditions anaérobies. Afin de favoriser la biodégradation de la matière organique disponible, la dénitrification a été promue pendant les

premiers jours après le prélèvement par l'ajout de nitrate de potassium (KNO_3). Le protocole d'enrichissement en anammox a été mis en œuvre dès que la dénitrification a diminué.

Chaque biomasse a été répartie à parts égales dans 2 bouteilles en verre hermétiquement fermées et « flushées » à l'azote pour créer des conditions anaérobies. Afin de favoriser la biodégradation de la matière organique disponible, la dénitrification a été promue pendant les premiers jours après le prélèvement par l'ajout de nitrate de potassium (KNO_3). Le protocole d'enrichissement en anammox a été mis en œuvre dès que la dénitrification a diminué.

Le protocole d'enrichissement a consisté dans des cycles successifs composés d'une semaine d'incubation à 35°C dans un milieu minéral sélectif pour anammox suivie d'une décantation en fin de semaine pour remplacer le surnageant par du milieu frais. Le milieu sélectif est constitué d'une solution nutritive synthétique (Magri et al. 2012) : 1 g/L de KHCO_3 , 50 mg de $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$ et de 25 mg $\text{NH}_4^+ \text{-N/L}$. Pour un lot de bouteilles (bouteilles 1 à 6 contenant les inocula 1 à 6 respectivement), le nitrite a d'abord été ajouté à une faible concentration (25 mg $\text{NO}_2^- \text{-N/L}$), puis une seconde addition de nitrite et d'ammonium a été réalisée une fois qu'une activité anammox a été détectée ($\text{NO}_2^- \text{-N}/\text{NH}_4^+ \text{-N} = 1,2$). Selon cette procédure, la concentration de nitrite a été progressivement augmentée de 25 à 150 mg $\text{NO}_2^- \text{-N/L}$ par incréments de 12,5 mg $\text{NO}_2^- \text{-N/L}$. Pour l'autre lot (bouteilles 7 à 12 contenant les inocula 1 à 6 respectivement), le nitrite a été ajouté à une forte concentration (150 mg $\text{NO}_2^- \text{-N/L}$) dès le début de l'incubation et a été maintenue constante tout au long de la période expérimentale. Le pH a été contrôlé dans la gamme de 7 à 8 et le taux d'oxygène dissous (OD) maintenu à des niveaux inférieurs à 0,2 mg/L. L'enrichissement a duré 4 mois. Des échantillons liquides ont été prélevés avant et après chaque nouvel événement d'alimentation pour déterminer les concentrations en ammonium, nitrite et nitrate par chromatographie ionique 850 Professional IC, Metrohm, Switzerland).

Tous les enrichissements initiés avec une faible concentration de nitrite (25 mg $\text{NO}_2^- \text{-N/L}$) montrent une activité anammox en fin de période expérimentale (Figure 5). Trois phases principales sont observées : (P1) la dénitrification hétérotrophe endogène est le processus dominant, et l'ammonium a légèrement augmenté en raison de la matière organique restante, (P2) disparition totale et simultanée de l'ammonium et du nitrite suggérant la mise en place d'une activité anammox et (P3) correspond à l'oxydation de l'ammonium à une concentration de nitrite élevée.

Pour les enrichissements débutés avec une forte concentration de nitrite (150 mg $\text{NO}_2^- \text{-N/L}$), aucune activité anammox n'a été détectée pendant toute la période expérimentale (Figure 6).

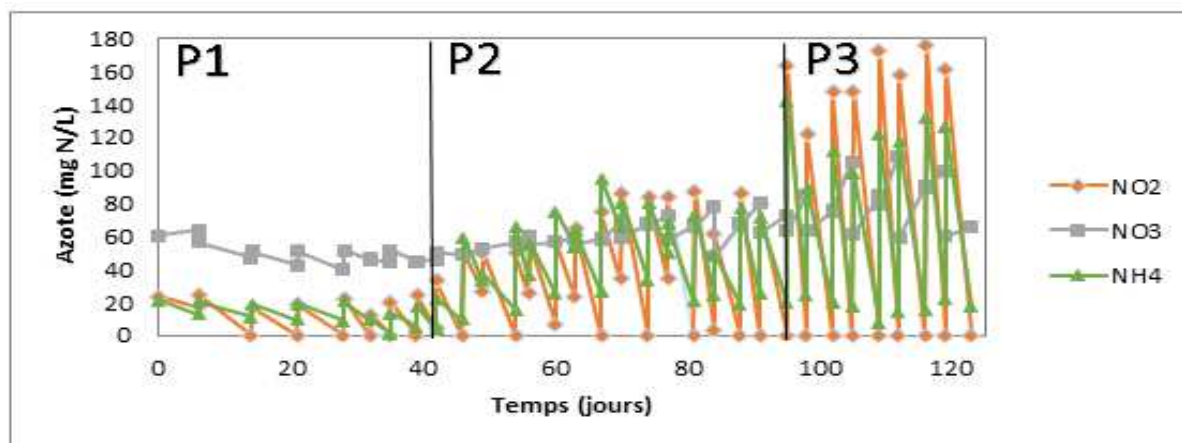


Figure 5. Evolution des formes de l'azote tout au long de la période expérimentale (4 mois) dans la bouteilleensemencée avec l'inoculum 3 et alimentée par une faible concentration de nitrite.

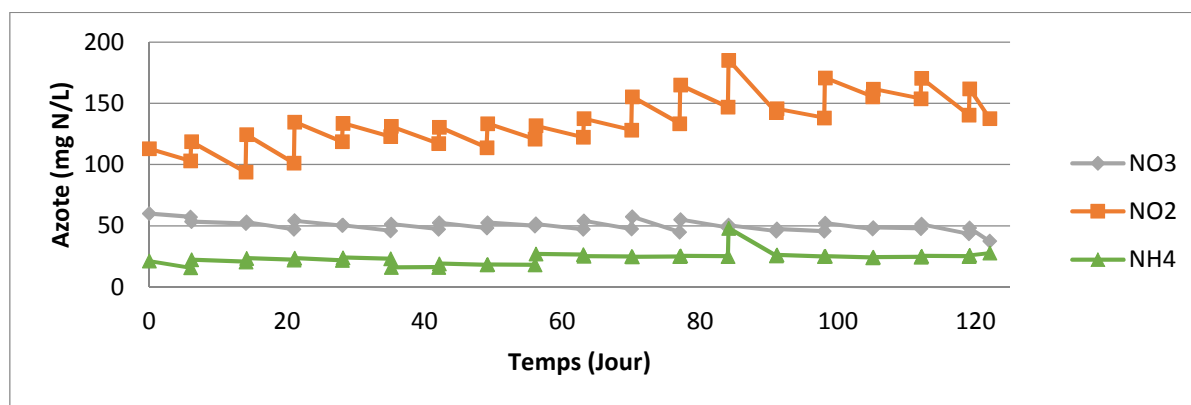


Figure 6. Evolution des formes de l'azote tout au long de la période expérimentale (4 mois) dans la bouteilleensemencée avec l'inoculum 3 et alimentée par une forte concentration de nitrite.

Des échantillons biologiques (10mL) ont été pris une fois par mois dans chacune des bouteilles et centrifugés 4 min à 10000 g. Les culots ont été congelés à -20°C en attente de l'analyse microbiologique réalisée durant ce stage.

2. Techniques moléculaires pour l'étude de la diversité microbienne des échantillons de cultures d'enrichissement.

a. Extraction de l'ADN total :

Les extractions ont été réalisées en duplicats avec le kit PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio) selon les instructions du fournisseur : 250 mg de culot sont placés dans des tubes contenant une solution de lyse ainsi que des billes de silice dont le rôle est de briser les membranes des bactéries. Pour cela, les tubes sont placés 3 fois pendant 45 secondes dans un «Fast-prep.24» (MP™). Cette lyse, combinant des procédés physiques et chimiques, permet de libérer l'ADN contenu dans les cellules présentes dans les échantillons. La solution obtenue est ensuite soumise à différentes centrifugations et purifications sur colonnes avant d'éluer l'ADN purifié. Enfin, un dosage par mesure d'absorbance (230/260/280 nm) permet de quantifier l'ADN et de déterminer sa pureté en utilisant le Nanodrop N1000. Les extraits sont stockés à -20°C.

b. Etude des communautés microbiennes par PCR quantitative :

Les densités de la communauté bactérienne totale et des populations anammox au sein des différentes cultures d'enrichissement ont été déterminées par q-PCR en ciblant le gène de l'ARN ribosomale 16S (*ADNr16S*) et le gène de l'hydrazine oxydoréductase (*hzo*) à l'aide respectivement des couples d'amorces 1055F/1392R pour les bactéries totales et *hzoc11F1/hzoc11R2* pour anammox selon les protocoles détaillés dans les tableaux (5-6-page 14bis). La q-PCR est réalisée au moyen du kit (IQ™SYBR®Green Supermix), selon les conditions réactionnelles présentées dans le tableau (7).

La gamme standard pour la PCR quantitative du gène *ARNr16S* des bactéries totales provient de produits de PCR en point final d'un clone d'*ADNr 16S* bactérien à l'aide des amorces *1055F/1392R*. Les ADNs servant de standards pour la q-PCR du gène *hzo* proviennent de produits de PCR *hzo* réalisées sur les échantillons de culture d'enrichissement anammox avec le couple d'amorces (*hzoF1/hzoR1*) (Tableaux 5-6-7-page 15bis). Après vérification de la présence d'une bande unique de taille attendue sur gel d'agarose 1,5%, les produits de PCR sont rassemblés et purifiés.

Tableau 5. Liste des amorces utilisées pour l'amplification PCR de fragments d'ADN *hzo* et *ADNr16S*.
S : amorce sens ; AS : amorce anti-sens.

Amorces	Séquence 5'-3'	Nb	Sens	Cible	Référence
<i>hzocl1f1</i>	TGY AAG ACY TGY CAY TGG	18	S	<i>hzo</i> <i>Anammox</i>	(Schmid et al. 2008)
<i>hzocl1R2</i>	ACT CCA GAT RTG CTG ACC	18	AS	<i>hzo</i> <i>Anammox</i>	(Schmid et al. 2008)
<i>hzoF1</i>	TGT GCA TGG TCA ATT GAA AG	20	S	<i>hzo</i> <i>Anammox</i>	(Li et al. 2011)
<i>hzoR1</i>	CAA CCT CTT CWG CAG GTG CAT G	22	AS	<i>hzo</i> <i>Anammox</i>	(Li et al. 2011)
<i>Pla46F</i>	GGA TTA GGC ATG CAA GTC	18	S	<i>16S</i> Planctomycètes	(Neef et al. 1998)
<i>1392R</i>	ACG GGC GGT GTG TAC	15	AS	<i>16S</i> Bactéries totales	(Rich et al. 2008)
<i>1055F</i>	ATGGCTGTCGTCAGCT	16	S	<i>16 S Bactéries totales</i>	(Harms et al. 2003)
<i>T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGG	20	S	ADN Plasmidique	Promega
<i>pUC/M13</i>	CAG GAA ACA GCT ATG AC	17	AS	ADN plasmidique	Promega

Tableau 6. Programme des différentes réactions de PCR, PCR clonage et PCR quantitative en temps réel.

	PCR						PCR Clonage		q-PCR			
	Anammox <i>hzoF1-hzoR1</i>		<i>Anammox</i> <i>hzocl1f1-hzocl1R2</i>		<i>Planctoymèctes</i> <i>Pla46F-1392R</i>		Analyse des transformants <i>T7-pUC/M13</i>		Bactéries totales <i>1055F-1392R</i>		Bactéries anammox <i>hzocl1f1-hzocl1R2</i>	
Dénaturation initiale	5' à 95°C		5' à 95°C		4' à 95°C		10' à 94°C		10' à 95°C		2' à 95°C	
Dénaturation	1' à 95°C	x 35	1' à 95°C	x30	30s à 95°C	x30	1' à 94°C	x30	30s à 95°C	x45	30s à 95°C	x40
Hybridation des amorces	1' à 53°C		1' à 50°C		40s à 55°C		1' à 55°C		50s à 60°C		1' à 51°C	
Elongation	1's à 72°C		2' à 72°C		1' à 72°C		1' à 72°C		30s à 72°C		1' à 72°C	
Elongation finale	5' à 72°C		10' à 72°C		1' à 72°C		10' à 72°C		Melting curve : 65-95°C (1°C toutes les 5s)			
Conservation	Infini à 10°C						Infini à 10°C					

Les concentrations d'ADN sont mesurées à l'aide d'un Nanodrop ND 1000 et le nombre de copies du gène/ μ L de réaction est déterminé selon l'équation :

$$\text{Copie}/\mu\text{L} = \frac{6,023 \cdot 10^{23} \text{ copie d'ADN cible/mol} \times [\text{ADN}] \text{ en ng}/\mu\text{L} \times 10^9}{\text{Taille en pb (fragment amplifié)} \times 660 \text{ en g/mol} \times 10^9}$$

Ensuite, les gammes standards sont obtenues par dilution successive au dixième des produits de PCR pour obtenir une gamme du gène *hzo* allant de $9 \cdot 10^9$ à $9 \cdot 10^2$ copies/ μ L et du gène *ADNr 16S* des bactéries totales de $1,02 \cdot 10^{10}$ copies/ μ L à $1,02 \cdot 10^3$ copies/ μ L.

Les duplicats d'ADN extraits des 12 bouteilles d'enrichissement sur cinq temps différents ont été analysés dans un Thermocycleur CFX96-Real-Time System Bio-Rad en plaques à 96 puits. Les PCR quantitative ont été effectuées en triplicat pour chaque échantillon dilué au dixième et au centième et en sixplicat pour le témoin négatif.

A la fin du programme d'amplification, les courbes d'amplification de chaque échantillon ont été analysées via le logiciel CFX Manager pour déterminer le cycle seuil, cycle au cours duquel la fluorescence de l'échantillon est significativement différente du bruit de fond. La concentration initiale du gène cible dans les échantillons testés, a été obtenue en reportant leur Ct sur la courbe standard correspondante.

La mise en place du protocole de quantification des bactéries anammox par q-PCR des gènes *hzo* au laboratoire Irstea faisait partie de ce stage et est donc présentée en début de résultats.

c. Clonage et séquençage du gène hydroxylamine oxidoréductase (*hzo*) :

L'identification des bactéries anammox présentes dans les échantillons a été recherchée par clonage puis séquençage du gène *hzo*. En raison du faible nombre de copies en début d'enrichissement, un protocole de PCR nichée a été appliqué. Des fragments de gène *hzo* (1033pb) ont été amplifiés à partir des extraits d'ADN total avec l'ADN *Taq* polymérase et le couple d'amorces (*hzoF1/hzoR1*) spécifique des bactéries anammox (Tableaux 5-6-7). Puis les produits de PCR obtenus ont été amplifiés à nouveau en utilisant le couple d'amorces (*hzocl1f1/hzocl1R2*) et l'enzyme *Taq* polymérase (Tableaux 5-6-7). La taille des fragments ciblés (470pb) a été vérifiée sur gel d'agarose 1,5%. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés sur colonne Promega (Wizard SV Gel and PCR clean up System) avant d'être clonés chez *Escherichia coli*.

Les clonages ont été réalisés avec le kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) selon les instructions du fournisseur. La première étape du clonage consiste à faire la ligation de l'insert

Tableau 7. Milieux réactionnels de différentes réactions : PCR, PCR clonage et PCR quantitative en temps réels.

	PCR			PCR Clonage		q-PCR	
	<i>hzoF1-hzoR1</i> <i>hzocl1f1-hzocl1R2</i>	<i>Pla46F-1392R</i>		<i>T7-pUC/M13</i>		<i>1055F-1392r</i>	<i>hzocl1f1-hzocl1R2</i>
H2O	30,2µl	15.25µl	H2O	14,3µl	Sybr Green	12,5µl	12,5µl
Tp <i>pfu</i>	5µl	2.5µl	Tp <i>taq</i>	2 µl	Amorce reverse (10µM)	1,5µl	0,625 µl
dNTP (2,5µM)	6µl	2µl	dNTP (2,5µM)	1,6 µl	Amorce Forward (10µM)	1,5µl	0,625 µl
Amorce reverse (10µM)	2µl	1.5µl	Amorce reverse (10µM)	0,8µl	H ₂ O	7,5µl	9,25µl
Amorce Forward (10µM)	2µl	1.5µl	Amorce Forward (10µM)	0,8µl			
MgCl ₂ (25mM)	2.5µl	0.75µl					
<i>pfu</i> turbo	0,3µl	0,5µl	<i>taq</i> Polymerase	0,5µl			
Echantillon	2µl	1µl	Echantillon	1colonie			
Volume finale	50µl	25µl	Vfinal	20µl			

avec le vecteur linéarisé « pGEM T Easy Vector » à l'aide de l'ADN T4 DNA ligase. La transformation est ensuite effectuée en ajoutant les plasmides à des cellules compétentes d'*Escherichia coli* (M109 competent cells, High efficiency). Le couple insert-vecteur est introduit après une incubation de 20 minutes dans les cellules compétentes par un choc thermique de 45 secondes à 42°C puis 2 minutes sur glace. La sélection des clones positifs est réalisée, après 1h d'incubation à 37°C des suspensions bactériennes, par étalement des cellules transformées (50 µl, 100 µl, 200 µl, et 300 µl) sur 4 boîtes de milieu LB Agar contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), de l'IPTG (100 mM) et du Xgalactose. Les boîtes de pétri sont incubées 24 heures à 37°C. Les cellules ayant incorporé le plasmide ligué au fragment d'ADN seront de couleur blanche, ainsi 30 colonies des 4 boîtes ont été sélectionnées pour chaque échantillon et repiquées sur un milieu LB sans Xgal. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les colonies blanches ont été analysées par PCR sur colonie en amplifiant l'insert et un fragment du plasmide de part et d'autre de l'insert en utilisant le couple d'amorce (*T7/pUC-M13r*). La présence et la taille du fragment amplifié ont été vérifiées par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% (taille de l'insert + 195pb). Les produits de PCR de taille correcte ont été envoyés pour séquençage à la plateforme de service génomique Biogenouest (Nantes).

Les séquences d'ADN obtenues ont été alignées et corrigées à l'aide du logiciel BioEdit (copyright 1997-2005 Tom Hall) puis comparées par blast à la banque de données en ligne via le site internet du NCBI. Un arbre phylogénétique a finalement été construit à partir des séquences réalisées au cours du stage et des séquences les plus proches obtenues dans les bases de données en utilisant le pipeline du site internet Phylogeny.fr (Réseau National des Génopoles).

V. Résultats

L'objectif de l'étape d'enrichissement réalisée avant ce stage était de favoriser la croissance des bactéries anammox en leur fournissant les substrats (NH_4^+ et NO_2^-) et les conditions appropriées à leur développement. Pour la réalisation des enrichissements, six biomasses ont été collectées dans des zones naturelles ou anthropisées, potentiellement riches en azote et susceptibles d'héberger des bactéries anammox. Chaque biomasse a ensuite été incubée dans deux conditions susceptibles de favoriser leur enrichissement en bactéries anammox tel que décrit dans le M&M. Pour le lot de bouteilles (n°1 à 6), le nitrite a été ajouté à une faible concentration de 25 mg NO_2^- -N/L et progressivement augmenté à 150 mg NO_2^- -N/L. Pour toutes ces bouteilles une activité anammox a été observée en fin d'enrichissement (4 mois). Pour le lot (n°7 à 12) où le nitrite a été ajouté à une forte concentration (150 mg NO_2^- -N/L) tout au long de l'expérience, aucune des bouteilles n'a présenté d'activité anammox.

A la fin de l'enrichissement les bactéries anammox doivent être majoritaires dans le milieu utilisé pour pouvoir être utilisées comme ensemencement pour la réalisation d'un réacteur de traitement. Afin de quantifier les bactéries anammox dans les enrichissements nous avons installé au laboratoire une méthode de PCR quantitative utilisant des amorces spécifiques (*hzoclIf1*-*hzoclIR2*). Cet outil a ensuite été utilisé pour analyser la dynamique des bactéries anammox pendant la période d'enrichissement au regard des mesures d'activité anammox réalisées précédemment au laboratoire. Enfin, les bactéries anammox présentes dans deux inoculas ont été identifiées par clonage, séquençage et analyse phylogénétique de leur gène *hzo*.

1. Mise en place d'un protocole de qPCR pour le couple d'amorces *hzo*

a. Optimisation des conditions de réaction

Pour des raisons pratiques et de techniques disponibles au laboratoire, la méthode de détection choisie pour anammox a été la q-PCR ciblant le gène *hzo* à l'aide des amorces *hzoclIf1*/*hzoclIR2*. Cette méthode a été adaptée au Thermocycleur CFX96-Real-Time System (BIO-RAD) à partir de Tao et al. (2013).

La température d'hybridation de la réaction de q-PCR *hzo* a été déterminée en réalisant un gradient thermique sur la gamme de température (50°C-65°C), qui encadre la T_m calculée des amorces (53°C). La température d'hybridation optimale de 51°C est celle qui entraîne le plus faible C_t , sans aucune amplification non spécifique (Figure 7).

Le SYBR Green se lie à tous les ADN double brins, il est donc nécessaire de vérifier la spécificité de la q-PCR en analysant la courbe de dissociation des produits de la réaction afin

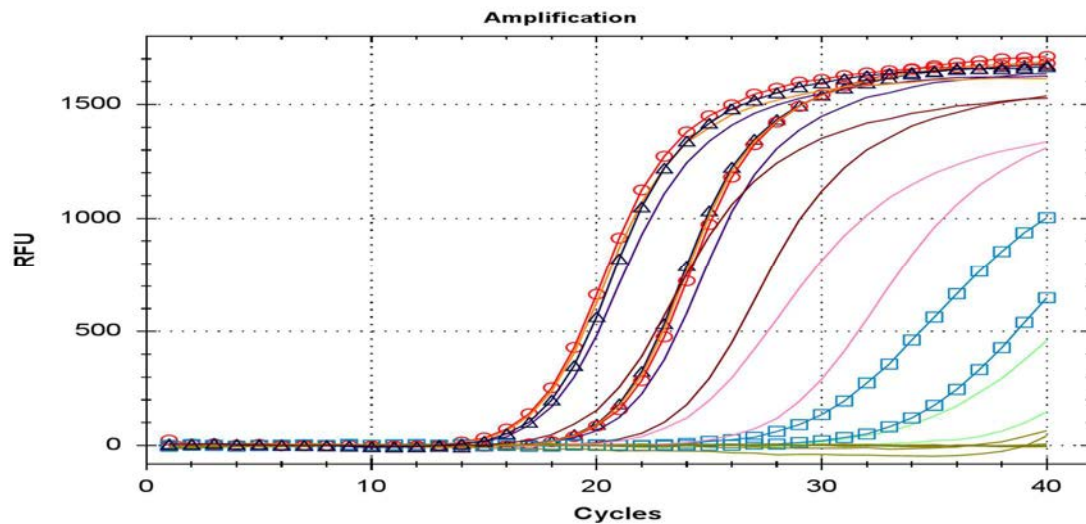


Figure 7. Courbes d'amplification du gène *hzo* par le couple d'amorces *hzocl1f1-hzocl1R2* à 8 températures d'hybridation différentes avec une dilution au dixième et au centième de l'échantillon utilisé pour cet essai. Température 50°C (Ronds rouge) ; Température **optimale** 51°C (Triangles bleu foncé) ; 53°C (orange) ; 55,9°C (violet) ; 59,5°C (marron) ; 62,5°C (rose) ; 64,1°C (Carrés bleu-) ; 65°C (vert clair) ; Témoin négatif à toutes les températures (vert foncé).

de visualiser les potentiels produits de PCR non spécifiques, y compris des dimères d'amorces. La courbe de dissociation, à partir de l'expérience d'optimisation de la température d'hybridation, n'a montré aucune amplification non spécifique et aucune dimérisation d'amorces (pour exemple voir Figure 9-droite).

Enfin, le rendement d'amplification a été optimisé en ajustant la concentration en amorces pour la température d'hybridation optimale déterminée (**51°C**). La réaction de q-PCR a été réalisée avec des concentrations en amorces de 200nM, 250nM ou 300nM sur une gamme de dilution d'ADN entre 10^{-4} et 10^{-8} . Les concentrations de **250nM** *hzocl1f1* et **250nM** *hzocl1r2* ont induit la plus haute efficacité d'amplification (proche de 100%) et une reproductibilité supérieure à 0,99 (Figure 8).

Les conditions optimisées d'amplification utilisées pour la suite des expérimentations sont résumées dans les tableaux 5 et 6 du M&M.

b. Détermination du seuil de détection de la q-PCR

Le seuil de détection en PCR quantitative des amorces *hzocl1f1/hzocl1r2* a été déterminé en mélangeant à parts égales un échantillon d'ADN extrait de compost (validé comme témoin négatif sans anammox) avec des dilutions successives au dixième d'un produit de PCR *hzo* obtenu sur nos échantillons (de 9.10^9 à 9.10^0 copies/ μ l). La même gamme de dilution du produit de PCR *hzo* a été amplifiée en parallèle seule ou en mélange dans les conditions optimisées ci-dessus. Aucune amplification n'a été observée pour les ADN de compost seuls, confirmant leur utilisation comme témoins négatifs et l'absence de faux positifs (Figure 9). Le seuil de détection observé pour la réaction de q-PCR *hzo* a été de 9 copies de gène *hzo*/ μ l de réaction de PCR, que l'ADN cible soit seul ou en mélange. En revanche, la comparaison des Ct des amplifications des ADN cibles seuls ou en mélange montre un point de déviance entre les deux courbes qui permet d'estimer un seuil de quantification des ADN cible en mélange à 9.10^3 copies de gène *hzo*/ μ l de milieu réactionnel de PCR.

2. Dynamique des communautés bactériennes lors des enrichissements en populations *Anammox* d'inocula alimentés par de faibles concentrations en nitrite

a. Quantification des bactéries anammox dans les biomasses initiales et finales

La proportion de bactéries anammox dans les biomasses initiales et finales des enrichissements a été déterminée par q-PCR ciblant le gène *hzo* pour anammox et à l'aide d'amorces universelles ciblant le gène des *ARNr16S* pour les bactéries totales (Tableau 8).

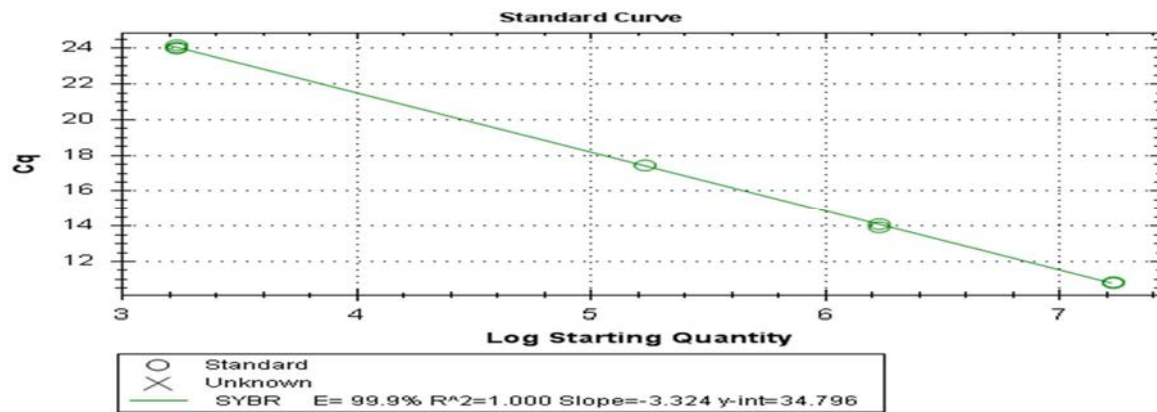


Figure 8. Représentation de la courbe standard pour une concentration des amorces *hzocI1f1-hzocI1R2* à 250nM/250nM à une température de 51°C. Les courbes standard faites d'après des dilutions successives au dixième de 10^{-4} à 10^{-8} des extraits d'ADN du prélèvement à T4 (4mois) de l'inoculum 4. Les essais ont été faits en duplicats.

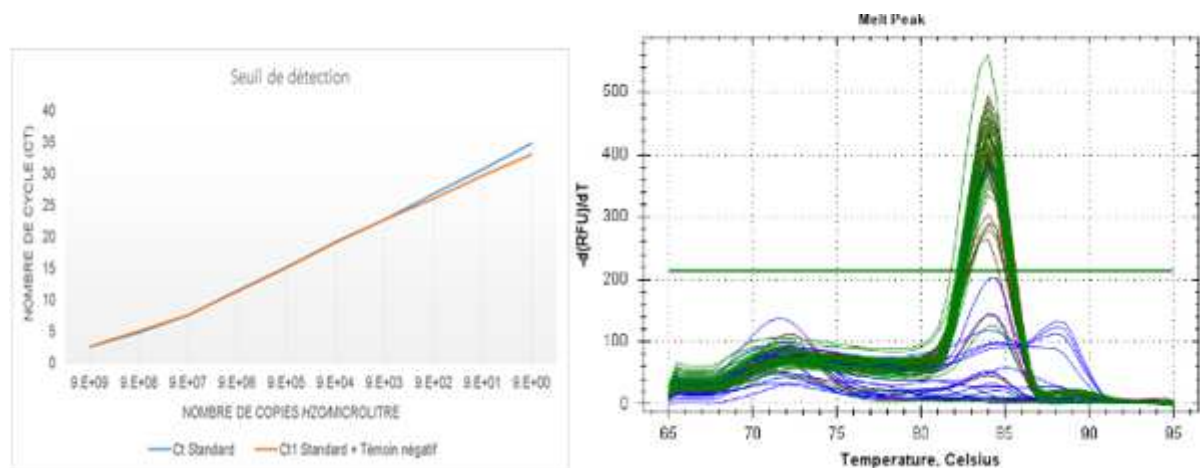


Figure 9. A gauche : Détermination du seuil de détection suite à une comparaison des Ct de la gamme standard seule et du mélange d'ADN de compost avec la gamme standard. A droite : Schéma représentatif de la courbe de dissociation (Témoin négatif : en bleu, Gamme standard : en vert, Gamme standard + Témoin négatif : en marron).

Tableau 8. Présence d'anammox dans les biomasses environnementales en début et fin d'enrichissement à faible concentration en nitrite (bouteilles 1 à 6).

Numéro de l'Inoculum	Début d'enrichissement		Fin d'enrichissement		Nb copies final <i>hzo</i> / Nb copies initial <i>hzo</i>
	Nombre de copies <i>hzo</i> /g matière fraîche	% des bactéries anammox dans la communauté	Nombre de copies <i>hzo</i> /g matière fraîche	% Bactéries anammox dans la communauté	
1 Boues activées eaux usées	3,4 ($\pm 1,1$).10 ⁷	0,44	7,4 (± 6).10 ⁹	214	221
2 Boues activées lisier de porc	7,2 ($\pm 4,8$).10 ⁷	3,1	2,7 ($\pm 3,33$).10 ⁹	187	38
3 Boues activées lisier de porc	1,9 ($\pm 1,5$).10 ⁷	0,03	1, ($\pm 0,3$).10 ⁹	34	54
4 Lagune des eaux usées	2,3 ($\pm 1,6$).10 ⁷	0,91	1,7 ($\pm 2,39$).10 ⁹	89	76
5 Lagune des eaux usées	1,1 ($\pm 0,1$).10 ⁷	0,84	2,1 ($\pm 0,34$).10 ⁹	8,5	191
6 Lagune aérée lisier de porc	3,6 ($\pm 0,6$).10 ⁸	0,21	1,7 ($\pm 1,44$).10 ¹⁰	16,9	47

Le nombre de copies de *hzo* détecté dans les inocula varie entre 1,1 ($\pm 0,14$).10⁷ et 3,62 ($\pm 0,56$).10⁸ copies par g de boue ou sédiment soit une différence d'environ 30 fois. Ces valeurs sont relativement élevées comparé à ce qui est décrit dans des études précédentes, entre 10⁴ à 10⁶ copies par millilitres (Tao et al. 2013). Rapporté à la communauté, les bactéries anammox représenteraient donc moins de 1% des bactéries totales sauf pour l'inoculum 2 où la proportion de gènes *hzo*/*ARNr16S* est de 3,1%.

En fin d'enrichissement, le nombre de copies de *hzo* observé a augmenté dans toutes les bouteilles, de 38 à 221 fois, pour atteindre des valeurs entre 1,05 ($\pm 0,3$).10⁹ copies *hzo*/g de matière fraîche dans la boue 3 et 1,7 ($\pm 1,44$).10⁹ copies dans l'inoculum 6. Les inocula qui montrent la plus grande croissance sont les n° 1 et 5.

Au regard de ces chiffres, il est clair qu'il y a bien eu croissance et enrichissement des bactéries anammox pour les communautés bactériennes étudiées. Toutefois, il ne semble pas y avoir de lien entre le nombre de bactéries anammox dans la biomasse initiale et l'efficacité de l'enrichissement (Tableau 8).

b. Suivi des communautés bactériennes lors des enrichissements

L'évolution des populations anammox au cours des enrichissements a été suivie par q-PCR *hzo* et *ADNr16S*.

La figure 10 résume les données obtenues pour les enrichissements débutés à une faible concentration de nitrite (25 mg NO₂⁻-N/L). Concernant l'activité anammox, on observe un

démarrage variable de l'activité pour les 6 inocula qui se traduit par une consommation simultanée d'ammonium et de nitrite concomitante avec une production de nitrate. Ainsi, les inoculas peuvent être classés en 3 catégories : l'inoculum 3 présente une activité quasi immédiate ; les inocula 1, 4, 5 et 6 présentent un temps de latence d'environ 2 mois ; tandis que l'activité anammox de l'inoculum 2 n'est visible qu'en fin d'enrichissement (à 4 mois).

En analysant les résultats de la PCR quantitative, on observe généralement une légère diminution du nombre de copies du gène *ARNr16S* bactéries totales en début d'incubation qui se prolonge sur 1 à 2 mois mais ne persiste pas jusqu'à la fin de l'expérience. Ce phénomène conduit au final à une apparente stabilité globale autour de 10^9 à 10^{10} copies ADN_r16S/g de matière fraîche pour tous les inocula. Dans le cas de l'inoculum 4, on remarque une chute significative de 0,8 log des bactéries totales après 1 mois d'enrichissement $2,49.10^9 \pm 0,7.10^9$ au temps 0 à $4,58 \pm 0,3.10^8$ copies ADN_r16S/g MF), qui remonte à $1,93 (\pm 0,4).10^9$ copies à la fin de l'enrichissement. Les inocula 3, 5 et 6 semblent peu affectés. A noter la plus forte densité de bactéries totales de l'inoculum 6 autour de 10^{11} copies ADN_r16S/g de matière fraîche.

Concernant les bactéries anammox, on constate une évolution du nombre de copies du gène *hzo* très semblable à l'évolution de l'activité anammox. En effet, comme décrits ci-avant, trois comportements sont visibles : l'inoculum 3 présente une augmentation quasi immédiate du nombre de gènes *hzo* dès le début de l'enrichissement ; les inocula 1, 4, et 6 présentent une diminution du nombre de gènes *hzo* au cours des 1 et/ou 2 premiers mois d'enrichissement mais leur nombre augmente ensuite considérablement en parallèle de l'activité anammox ; et enfin, le nombre de copies *hzo* des inocula 2 et 5 reste stable jusqu'à ce qu'une activité anammox soit détectée dans les enrichissements. Pendant les enrichissements, les concentrations en bactéries anammox augmentent d'environ 100 fois depuis 10^7 à 10^8 copies *hzo*/g MF au T0 à 10^9 à 10^{10} copies après 4 mois. Les proportions de *hzo*/*ARNr16S* en fin d'enrichissement varient alors entre 8,5% pour l'inoculum 5 et 214% pour l'inoculum 1 (Tableau 8).

Il est intéressant de constater que la longueur du temps de latence observé lors des enrichissements anammox (Figure 10) ne semble pas liée au nombre de bactéries anammox présentes dans la biomasse initiale (Tableau 8) ; et que l'augmentation du nombre de gènes *hzo* détectés en q-PCR précède légèrement celle de l'activité anammox pour les inocula 1, 3 et 4 (Figure 10).

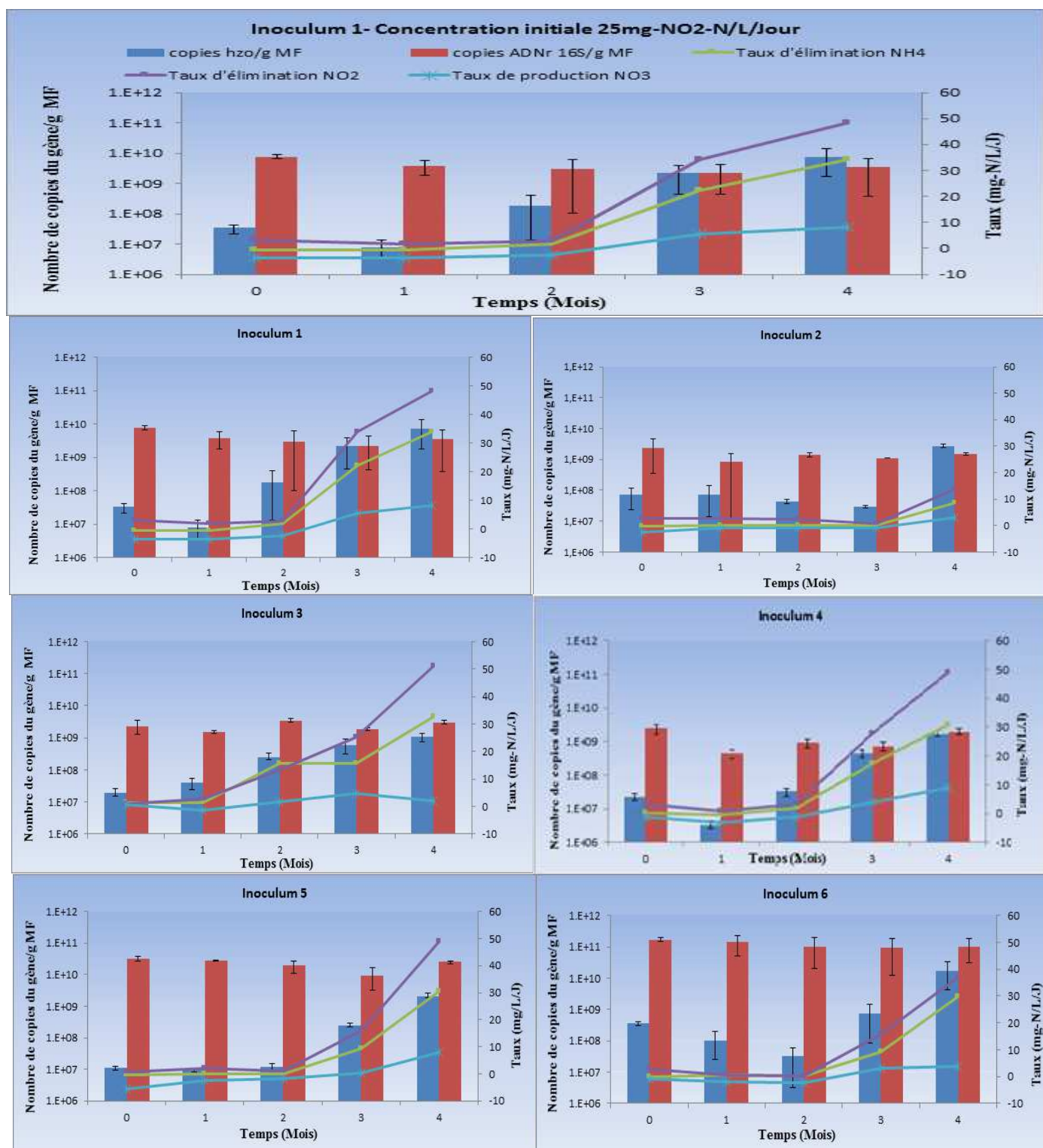


Figure 10. Activité et dynamique des bactéries anammox par rapport aux bactéries totales dans les enrichissements alimentés par une faible concentration de nitrite initiale (25mg-NO₂-N/L/Jour). Nombre de copies du gène *hzo* bactéries anammox (Barre bleue) et nombre de copies du gène *ADNr* 16S bactéries totales (Barre rouge) par gramme de matière fraîche sur la base de l'analyse de q-PCR. Les barres d'erreur indiquent la plage des données de duplicats d'échantillon. Sur l'axe secondaire, l'activité anammox est représentée par les taux d'élimination de l'ammonium (courbe verte) et du nitrite (courbe violette) et le taux de production du nitrate (courbe bleue) en mg-N/L/Jour.

3. Dynamique des communautés bactériennes lors des enrichissements en populations *Anammox* des inocula alimentés à forte concentration en nitrite

Pour le lot d'enrichissements débuté avec une forte concentration en nitrite (bouteilles 7 à 12 ; 150 mg NO₂⁻-N/L) (Figure 11), les taux d'élimination de nitrite et d'ammonium et la production de nitrate restent approximativement égaux à 0 mg-N/L/Jour dans tous les inocula testés pendant toute la période expérimentale. Ces observations montrent qu'il n'y a pas d'activité anammox détectable dans les enrichissements.

Les résultats de la PCR quantitative (Tableau 9 et figure 11) montrent une stabilité globale au niveau du nombre de copies du gène *ARNr16S* bactéries totales dans tous les inocula, avec toujours 1 log de plus environ pour l'inoculum 6. En revanche, contrairement aux enrichissements réalisés à faible concentration en nitrite, on remarque une diminution plus ou moins marquée du nombre de copies du gène *hzo* au cours de temps avec une chute significative de 1 log d'abattement à la fin des enrichissements pour tous les inocula sauf le 5.

Tableau 9. Présence d'anammox dans les biomasses environnementales en début et fin d'enrichissement à forte concentration en nitrite (bouteilles 7 à 12)

Numéro de l'Inoculum	Début d'enrichissement		Fin d'enrichissement		Nb copies final <i>hzo</i> / Nb copies initial
	Nombre de copies <i>hzo</i> /mg matière fraîche	% des bactéries anammox dans la communauté	Nombre de copies <i>hzo</i> /mg matière fraîche	% Bactéries anammox dans la communauté	
1 Boues activées eaux usées	3,1 (±0,88).10 ⁷	0,69	6,8 (±0,31).10 ⁶	0,2	0,22
2 Boues activées lisier de porc	1,9 (±2,04).10 ⁸	8,2	2,7 (±2,56).10 ⁷	0,91	0,14
3 Boues activées lisier de porc	2,71(±1,48).10 ⁷	0,46	3,04 (±136,).10 ⁶	0,06	0,11
4 Lagune des eaux usées	4,7 (±0,11).10 ⁸	4,2	5,3 (±3,1).10 ⁷	0,53	0,51
5 Lagune des eaux usées	6,78 (±2,66).10 ⁷	1,51	3,8 (±0,69).10 ⁷	1,13	0,55
6 Lagune aérée lisier de porc	3,6 (±0,58).10 ⁸	0,08	6,7 (±0,4.10 ⁷	0,02	0,18

4. Identification des bactéries anammox dans les inocula 2 et 3 :

L'identification des espèces anammox présentes dans les échantillons a été recherchée par clonage puis séquençage du gène hydroxylamine oxydoréductase *hzo* pour l'inoculum 2 aux temps 0 et 1 mois et au temps 0 mois pour l'inoculum 3. Ces échantillons ont été choisis car la courbe de dissociation des produits de q-PCR *hzo* correspondant au T0 de l'inoculum 2 montrait deux températures de dissociation 84°C et 83,5°C (données non montrées) lors des suivis d'enrichissement, alors qu'une seule température de dissociation à 84°C était visible pour les

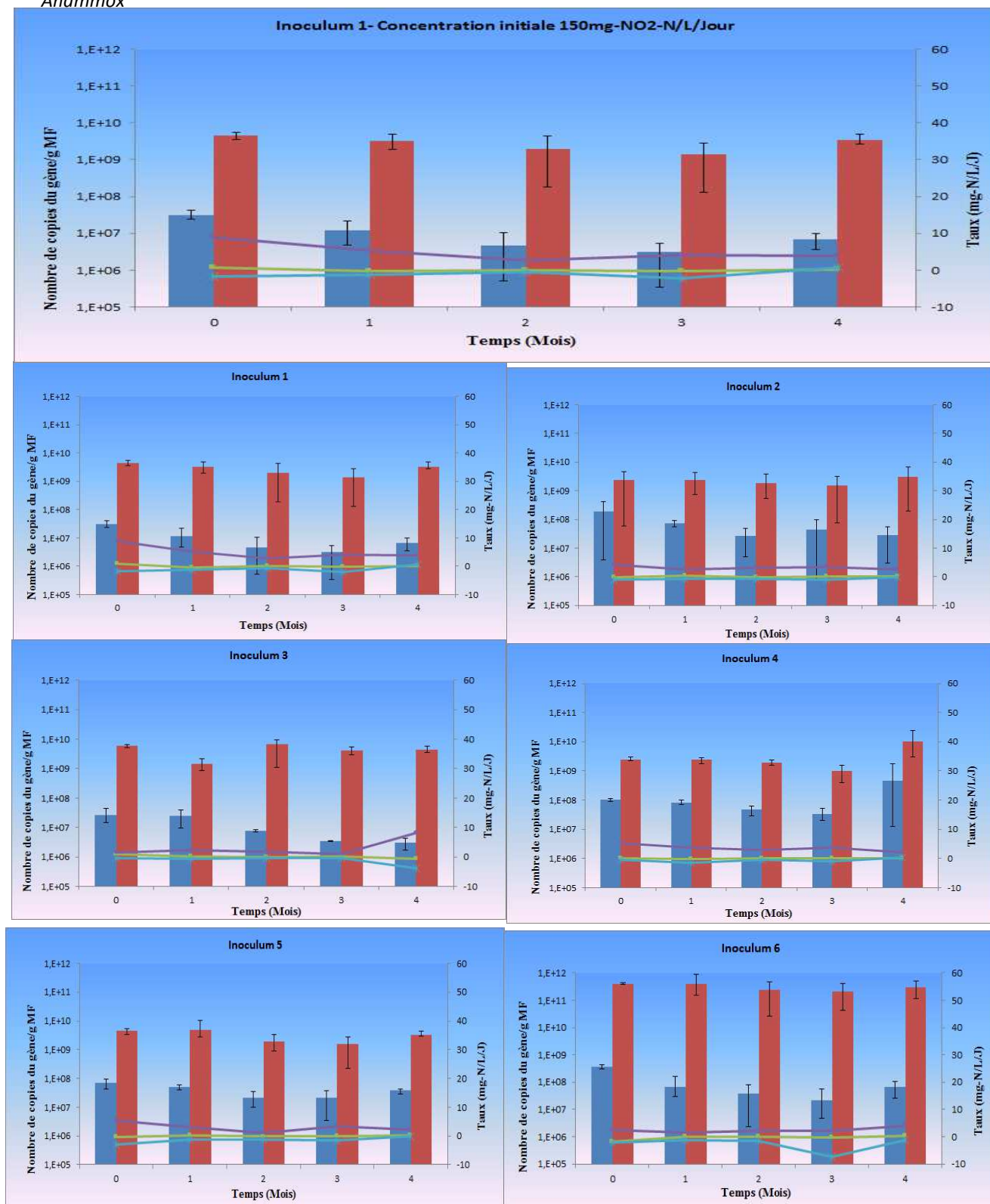


Figure 11. Activité et dynamique des anammox

par rapport aux bactéries totales dans les enrichissements alimentés par une forte concentration de nitrite initiale (150 mg-NO₂-N/L/Jour). Nombre de copies du gène *hzo* bactéries anammox (Barre bleu) et nombre de copies du gène *ADNr 16S* bactéries totales (Barre rouge) par gramme de matière fraîche sur la base de l'analyse de q-PCR. Les barres d'erreur indiquent la plage des données de duplicats d'échantillon. Sur l'axe secondaire, l'activité anammox est représentée par les taux d'élimination de l'ammonium (courbe verte) et du nitrite (courbe violette) et le taux de production du nitrate (courbe bleu) en mg-N/L/Jour.

autres inocula. D'autre part, un début d'analyse des données de pyroséquençage de l'inoculum 3 avait permis d'identifier des séquences proches de celles des bactéries anammox *Candidatus Brocardia anammoxidans* (données non montrées).

Au total, sur les 3 clonages réalisés, 3 fois 30 clones ont été purifiés, 64 clones ont été séquencés et 64 séquences d'ADN ont été obtenues. La recherche d'homologies dans la base de données GenBank (Blast-NCBI) a permis d'identifier 19 séquences très proches (Figure 12). Toutes ces séquences appartiennent au phylum des *Planctomycètes* et branchent dans le groupe des bactéries anammox. À T0, les séquences de 17 clones sur 22 de l'inoculum 2 (T0-B2) sont étroitement liées aux séquences CT573073 et CT573072 du génome de *Kuenenia stuttgartiensis* avec une homologie supérieure à 99%. Les cinq clones restant ont une homologie de 92% avec le *Planctomycète* HM851969. La biomasse issue des boues provenant de l'usine de traitement de lisier de porc de Meslin (France) présente donc au moins 2 espèces différentes d'anammox avec une dominance pour *Kuenenia stuttgartiensis*.

Après un mois d'enrichissement, tous les clones de l'inoculum 2 (T1-B2) sont proches à 92% avec le *Planctomycète* HM851969 à l'exception d'un seul clone ayant une homologie entre 69 et 74% avec toutes les séquences nucléotidiques analysées et référencées. Il y a donc eu un changement de dominance au sein des populations anammox dans cet enrichissement.

Au contraire, tous les clones analysés à T0 pour l'inoculum 3, issu de la boue de traitement de lisier de porc - Calldetenes-Espagne ont une similarité de 92% avec le *Planctomycète* HM851969.

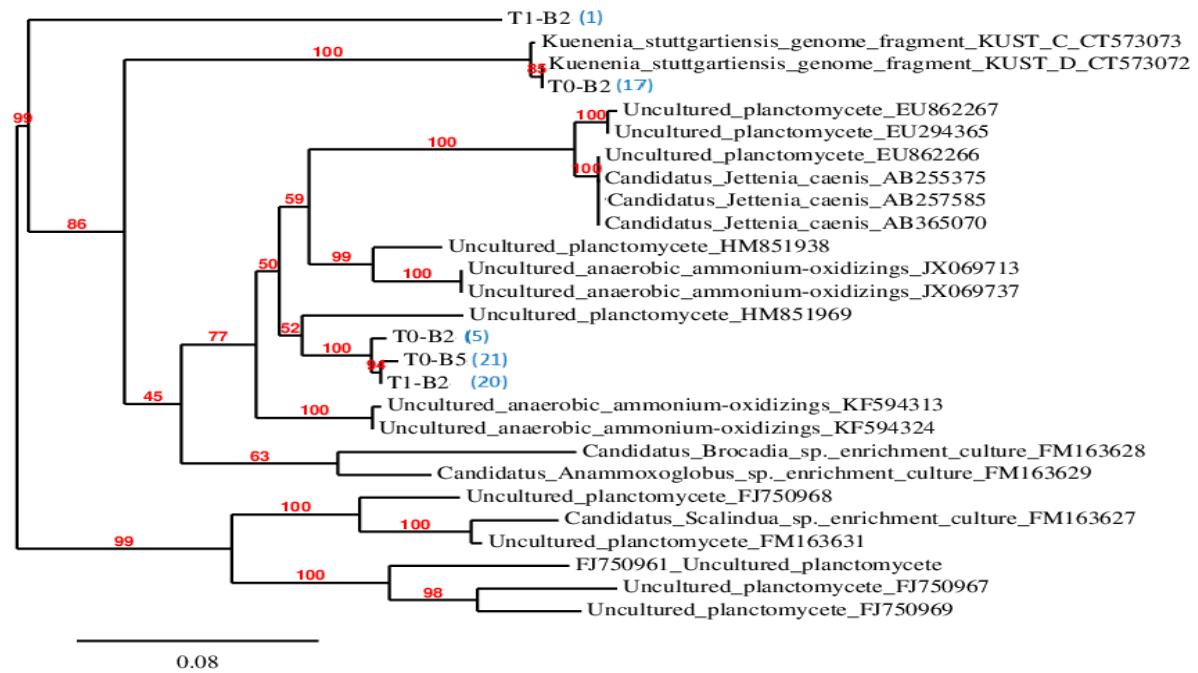


Figure 12. Arbre phylogénétique consensus des séquences du gène *hzo* des enrichissements étudiés et de leurs plus proches parents. T0-B2 et T1-B2, séquences des temps 0 et 1 mois pour l'enrichissement 2 et T0-B5, temps 0 mois pour l'enrichissement 3. Les séquences ont été alignées à l'aide de ClustalW et l'arbre construit selon la méthode de maximum de vraisemblance. Les nombres entre parenthèses se rapportent aux nombres des clones du gène *hzo* des échantillons prélevés. Les chiffres au niveau des nœuds indiquent la robustesse de la phylogénie obtenue après 100 répétitions (seules les valeurs supérieures à 45% sont représentées). Les longueurs de branches correspondent à la distance génétique entre les différentes séquences comme indiqué dans la barre d'échelle.

VI. Discussions

Les objectifs de cette étude étaient : de mettre en place au laboratoire un outil moléculaire pour valider ou non le bon déroulement d'enrichissements *Anammox* réalisés à partir de deux concentrations initiales en nitrite (Faible/Forte) ; puis d'étudier la dynamique et la diversité des populations *Anammox* au sein des communautés microbiennes des enrichissements pour mieux en comprendre le processus. Deux approches moléculaires avaient été envisagées. La première approche, basée sur la q-PCR a été menée à bien et a permis de suivre l'évolution des bactéries *anammox* dans la communauté bactérienne pendant l'enrichissement. La deuxième approche, basée sur le pyroséquencage des ADN r16S bactériens devait permettre de déterminer et suivre l'évolution de la composition globale de la communauté bactérienne pour identifier les espèces *anammox* présentes et rechercher des synergies et/ou inhibitions dues à la présence ou à l'absence d'autres espèces bactériennes. Bien que les réactions de pyroséquencage aient été réalisées pendant la période du stage, le traitement des données n'a pas pu être fait dans le temps imparti par manque d'un pipeline efficace d'analyse des données. Pour remplacer cette partie, une identification des espèces *anammox* présentes dans deux inocula a été recherchée par clonage puis séquençage et analyse phylogénétique « classiques » du gène *hzo*.

Intérêts et limitations de la quantification des gènes *hzo* et *ARNr 16S* par q-PCR

L'utilisation de la q-PCR pour la quantification des bactéries *anammox* a été rapportée assez récemment (Tsushima et al, 2007). Son utilisation dans le domaine du traitement de l'eau, où la détection du processus *anammox* est normalement basée sur les taux de conversion des composés azotés, est relativement nouvelle.

La quantification des gènes *hzo* par q-PCR s'est révélée être un outil sensible (seuil de détection à 9 copies/ μ L de milieu réactionnel), performant (seuil de quantification à 9.10^3 copies/g de matière fraîche), spécifique et relativement facile à utiliser pour quantifier les bactéries *anammox* dans un grand nombre d'échantillons.

Dans un premier temps, les résultats de la q-PCR ont validé la présence des bactéries *anammox* dans les boues et sédiments utilisés comme inocula. Cette présence confirme des données de la littérature (Bae et al. 2010; Tao et al. 2013) et suggère qu'il existe une niche écologique pour *anammox* dans les procédés de traitement des eaux usées et de lisier, malgré la présence de procédés d'aération supposés efficaces. Cette technique pourra donc être utilisée à l'avenir pour choisir les boues et sédiments à enrichir au laboratoire. En effet, bien que tous les inocula analysés dans cette étude se soient révélés positifs, des essais antérieurs réalisés sur d'autres

stations d'épuration ne contenaient pas d'anammox (Albert Magri, communication personnelle). Cette technique pourrait aussi être utilisée pour mieux identifier les zones des stations d'épuration qui contiennent anammox (bassins mal aérés, biofilms) dans le but de comprendre son écologie. Enfin, nous avons vu que la courbe de dissociation des produits de q-PCR pouvait donner une indication sur la diversité des populations anammox présentes dans l'inoculum et permettre de choisir des inoculas avec un plus fort potentiel de diversité.

Dans un second temps, la q-PCR a permis de confirmer l'enrichissement des communautés en bactéries anammox pour les bouteilles 1 à 6, même durant la phase initiale lorsque l'activité anammox était faible et encore non mesurable (Inocula 1 et 3 entre les temps 1 et 2). La q-PCR pourrait donc être utilisée comme outil de suivi d'enrichissements réalisés dans différentes conditions (température, substrat, etc.) et permettre de sélectionner ou ajuster plus rapidement les conditions et enrichissements favorables.

Après cette phase, la quantification des gènes *hzo* a montré une augmentation significative et forte de la concentration en bactéries anammox à la fin des enrichissements. Les concentrations étaient à 10^9 à 10^{10} copies/g de matière fraîche dans les cinq bouteilles, semblables aux valeurs précédemment rapportées (Bae et al. 2010; Tao et al. 2013). Au contraire, aucune augmentation du nombre d'anammox n'a été observée pour les enrichissements à forte concentration en nitrite qui n'ont pas développé d'activité anammox. Cette observation montre l'efficacité de la méthode mais aussi ses limitations : la possibilité d'enrichir les boues en populations anammox ne dépend pas que de la présence initiale d'anammox dans les inocula mais aussi des conditions environnementales qui doivent être appropriées à leur croissance (anaérobiose, 35°C, pH contrôlé, milieu synthétique).

Ainsi, la q-PCR des gènes *hzo* doit être utilisée en suivi dynamique des écosystèmes et pas en mesure ponctuelle car il n'existe (apparemment) pas de relation directe entre le nombre de copies de gène *hzo* mesuré en q-PCR à un moment donné et l'activité anammox mesurée. Ainsi, plusieurs aspects doivent être discutés :

1. L'abondance des copies de *hzo* dans la communauté à la fin des enrichissements des bouteilles 1 et 2 atteint des pourcentages supérieurs à 100% des copies d'ADNr16S, ce qui n'est théoriquement pas possible. Cette différence peut avoir de nombreuses raisons : La première hypothèse est simplement un écart type important sur les mesures en nombre absolu qui conduit à des différences importantes une fois les calculs exprimés en proportion. La deuxième est que les deux réactions de q-PCR ne sont pas directement comparables car elles ne ciblent pas les mêmes gènes et n'ont pas les mêmes rendements d'amplification. La troisième est la présence

possible de plusieurs copies de gène *hzo* et ARNr16S dans les bactéries. En effet, le génome séquencé de *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* présente 2 copies de gène *hzo* pour une seule copie de gène ARNr16S (Strous et al. 2006). De même, les amorces « universelles » utilisées pour quantifier les bactéries totales ciblent des genres microbiens avec des nombres différents d'opérons ARNr16S. On considère généralement que les bactéries contiennent en moyenne 4 copies d'ARNr16S.

2. Nos résultats montrent que la concentration initiale des bactéries anammox dans les boues ne joue pas un rôle important. Le classement qualitatif des activités anammox d'après la figure 10 et le tableau 8 n'est pas en accord avec le nombre de copies de gène *hzo* mesuré dans les biomasses initiales. En effet, l'inoculum 3 qui démarre le plus rapidement est celui qui présente le plus faible taux de gènes *hzo*, tandis que l'inoculum 2 qui démarre le plus tardivement est celui avec le taux de gènes *hzo* le plus élevé.

De même, alors que les enrichissements sont initiés avec les mêmes quantités de biomasse mais des concentrations en nitrite différentes, seuls les enrichissements réalisés à faible concentration en nitrite présentent une activité et un enrichissement en anammox.

Tableau10. Evolution des bactéries dans les biomasses environnementales en début et fin d'enrichissement à faible et forte concentration en nitrite (bouteilles 1 à 12)

Inoculum	Faible concentration nitrite		Forte concentration nitrite		Classement activité Anammox ^a (faible concentration nitrite)
	Nb copies final <i>hzo</i> / Nb copies initial <i>hzo</i>	% <i>hzo</i> final/ % <i>hzo</i> initial	Nb copies final <i>hzo</i> / Nb copies initiale <i>hzo</i>	% <i>hzo</i> final/ % <i>hzo</i> initial	
1 Boues activées eaux usées	221	486	0,22	0,28	2
2 Boues activées lisier de porc	38	60	0,14	0,11	4
3 Boues activées lisier de porc	54	1133	0,11	0,13	1
4 Lagune des eaux usées	76	98	0,51	0,12	2
5 Lagune des eaux usées	191	10	0,55	0,74	2
6 Lagune aérée lisier de porc	47	80,5	0,18	0,25	3

^a Classement qualitatif des activités anammox d'après la figure 10 depuis l'enrichissement le plus rapide 1 au plus lent 4.

Ces résultats confirment que les conditions environnementales sont très importantes pour garantir le succès des enrichissements car elles vont conditionner l'activité des bactéries anammox et leur capacité à se multiplier.

Au final, la q-PCR permet de valider la présence ou l'absence d'anammox dans les inocula mais seul le suivi dynamique permet de confirmer l'enrichissement, légèrement en avance sur les mesures d'activité. Les enrichissements en populations anammox observés dans notre étude sont un peu plus rapides que ceux montrés dans la littérature qui présente des durées de 4 mois à 1 an à partir de boues activées classiques à partir de (Araujo et al. 2011; Chamchoi et Nitisoravut 2007; Shen et al. 2012). Nos résultats confirment aussi la variabilité observée lors des études introduisant une biomasse anammox dans des boues dans le but de favoriser l'enrichissement et le temps de démarrage (50 jours-180 jours) (Tao et al. 2013; Trigo et al. 2006).

Apports de l'étude pour la compréhension du processus d'enrichissement en anammox

Un des aspects les plus critiques dans la stabilité du procédé ou le démarrage d'un enrichissement anammox est le nitrite. Il est l'accepteur d'électrons dans le processus Anammox mais également un composé inhibiteur potentiel. De nombreuses recherches ont confirmé que le nitrite est un rétro inhibiteur de l'oxydation anaérobie de l'ammonium lorsqu'il atteint de trop fortes concentrations. Strous et ses collègues, les premiers ont rapporté l'effet défavorable du nitrite en observant une inhibition complète mais réversible du processus à 100mg-NO₂-N/L (Strous et al. 1999). Des concentrations de nitrite aussi faibles que 5 mg et 40 mg-NO₂-N/L ont été signalées fortement inhibitrice par (Wett et al. 2007; Fux et al. 2003), respectivement). Pourtant, très peu d'informations sont disponibles sur la sensibilité des bactéries anammox et la faisabilité de leur enrichissement à une faible ou forte concentration initiale de nitrite dans un fed-batch réacteur. En outre, la littérature ne propose pas de consensus concernant les concentrations de nitrite initial pour le démarrage d'un enrichissement anammox.

La combinaison d'une approche de mesure d'activité anammox avec la quantification des gènes *hzo* et *ADNr16S* par q-PCR permet de démontrer l'inhibition d'anammox par une concentration en nitrite de 150 mg de NO₂ - N/L dans nos conditions d'enrichissement. De plus, puisque dans notre étude le pH a été contrôlé, nous pouvons confirmer que l'effet observé dépend bien du nitrite et non pas de l'acide nitreux.

D'autre part, combinée à l'identification des espèces anammox présentes pendant les enrichissements, cette approche doit nous permettre de démontrer si l'adaptation de la communauté anammox résulte de l'adaptation métabolique des populations anammox initiales

qui persistent jusqu'en fin d'enrichissement ou de changements importants des populations dominantes dans la communauté. Une autre possibilité pourrait être une meilleure tolérance au nitrite de la biomasse agrégée tel que rapporté dans un SBR par (Strous et al. 1999). En effet, en fin d'enrichissement, la biomasse s'est acclimatée aux cycles successifs d'incubation – décantation en formant des floccs denses et quelques granules qui se rapprochent de la biomasse des SBR.

Les résultats des clonages réalisés aux temps 0 et 1 mois de l'inoculum 2 sont en faveur de la seconde hypothèse. En effet, à T0 l'inoculum 2 semble dominé par une seule espèce d'anammox proche de *Candidatus Kuenenia*. Après 1 mois, un changement de dominance est observé en faveur d'une bactérie anammox proche de *Planctomycète* HM851969 tandis qu'en fin d'enrichissement, les premières données de pyroséquençage proposent une dominance de *Candidatus Brocadia* (data not shown). Ces résultats devront être confortés par l'ensemble des analyses de pyroséquençage mais ils sont aussi en accord avec la littérature qui montre que *Candidatus Brocadia* et *Kuenenia* sont les genres communs dans les stations d'épuration des eaux usées. La différence de niche entre ces deux genres n'est toujours pas résolue. Nous pouvons ici émettre l'hypothèse que *Brocadia* serait favorisé par les fortes concentrations en nitrite comparé à *Kuenenia*. Cette hypothèse serait en accord avec le changement inverse de dominance observé au cours du temps de *Brocadia* vers *Kuenenia* dans un réacteur à biofilm sur membrane (MBR) (van der Star et al. 2008) et dans des réacteurs discontinus où la formation d'un biofilm, en réduisant localement la concentration en nitrite, favoriserait *Kuenenia*.

A côté de la concentration en nitrite, d'autres paramètres peuvent aussi inhiber l'enrichissement d'anammox :

La dénitrification. En début d'enrichissement, on a observé une dominance de la dénitrification hétérotrophe (consommation de nitrite et du nitrate) et d'une ammonification (production de l'ammonium) en raison de la matière organique restante dans les inocula. Dans la plupart des enrichissements, un taux d'élimination d'ammonium négatif a été observé aux temps 0 (voire 1 mois) à environ -0,7 mg-N/L par jour, associé à un taux de production de nitrate négatif de valeurs proches de -2 à -3 mg-N/L/J. Ce phénomène reflète la présence d'une activité dénitrifiante dans les biomasses initiales, favorisée par des résidus de matière organique en début d'enrichissement. Les bactéries dénitrifiantes hétérotrophes sont des concurrents potentiels des bactéries anammox sur le nitrite en présence de la matière organique, dans lequel les bactéries anammox sont défavorisées à cause de leur faible taux de croissance.

La diversité des inocula. La période de démarrage d'enrichissement anammox dans cette étude varie selon les inocula (2, 3 et 4 mois) mais est très proche des périodes rapportées (58 jours et 60 jours) dans des bioréacteurs discontinus (SBR) en utilisant des boues granulaires méthanogènes ou des boues activées comme inoculum (Dapena-Mora et al. 2007; Liao et al. 2007). Cette variabilité de la phase de latence pour les différents enrichissements peut provenir de la diversité initiale de la communauté et/ou de la matière organique biodégradable déjà présente dans les inocula. Des études précédentes, montrent que la diversité bactérienne peut jouer un rôle important sur le démarrage d'un enrichissement anammox, à savoir une communauté avec une grande diversité est sujette à acquérir une dominance plus rapidement sous des contraintes sélectives appropriées (par exemple extrêmement faible disponibilité de carbone organique et d'oxygène) (Tao et al. 2013).

L'adaptation aux changements d'environnement. Nos résultats montrent une disparition simultanée de l'ammonium et du nitrite en augmentant la concentration de nitrite. La dynamique des bactéries totales reste stable tout au long de la période expérimentale. Seule une chute du niveau de la communauté bactérienne dans la boue provenant du bassin de traitement de lisier de porc (Amanlis - France) est observée pendant le démarrage de l'enrichissement. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un changement soudain de l'environnement organique à minéral dans des conditions anaérobies provoque la mort des bactéries hétérotrophes et autotrophes aérobies des boues inoculées.

A la fin de l'enrichissement, la dominance d'anammox sur les autres activités microbiennes semble complète car les ratios molaires pour la conversion de NH_4^+ et NO_2^- en N_2 et NO_3^- dans les six bouteilles sont très proches du bilan global de la réaction anammox proposé par (Strous et al. 1998) ; 1,00 :1,32 :0,26 de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{N}_2:\text{NO}_3^-$, respectivement.

VII. Conclusions

- (1) Notre protocole de q-PCR a réussi à évaluer la dynamique des bactéries anammox dans la communauté microbienne et montre une corrélation entre l'activité et l'enrichissement en populations anammox.
- (2) La concentration initiale de nitrite est un facteur essentiel pour le succès d'un enrichissement anammox et pourrait conditionner l'espèce enrichie.
- (3) Un grand nombre de bactéries anammox dans un inoculum n'est pas suffisant pour obtenir un temps de démarrage court des enrichissements.
- (4) Les enrichissements qui présentent une activité ont une forte abondance d'anammox.

- (5) Un enrichissement en batch culture à une faible concentration initiale en nitrite couplée à des techniques moléculaires (PCR-quantitative-Séquençage-Clonage) est une approche appropriée pour analyser l'enrichissement d'un inoculum, ainsi la mise en œuvre de réacteurs biologiques de traitement de l'azote des digestats de méthanisation par le procédé anammox.

VIII. Perspectives

- (1) Identifier les genres et espèces anammox observées dans les enrichissements par pyroséquençage.
- (2) Rechercher des synergies et/ou inhibitions possibles dues à la présence ou l'absence d'autres groupes bactériens.
- (3) Continuer l'enrichissement en continu dans des conditions stables.

Références :

- Ali, Mohammad, Li-Yuan Chai, Chong-Jian Tang, Ping Zheng, Xiao-Bo Min, Zhi-Hui Yang, Lei Xiong, et Yu-Xia Song. 2013. « The Increasing Interest of ANAMMOX Research in China: Bacteria, Process Development, and Application. » *BioMed Research International* 2013: 1-21. doi:10.1155/2013/134914.
- Araujo, J. C., A. C. Campos, M. M. Correa, E. C. Silva, M. H. Matté, G. R. Matté, M. Von Sperling, et C. A. L. Chernicharo. 2011. « Anammox Bacteria Enrichment and Characterization from Municipal Activated Sludge. » *Water Science & Technology* 64 (7): 1428. doi:10.2166/wst.2011.632.
- Bae, Hyokwan, Kyung-Soon Park, Yun-Chul Chung, et Jin-Young Jung. 2010. « Distribution of Anammox Bacteria in Domestic WWTPs and Their Enrichments Evaluated by Real-Time Quantitative PCR. » *Process Biochemistry* 45 (3): 323-34. doi:10.1016/j.procbio.2009.10.004.
- Bizien, Philippe. 2013. « Le porc en Bretagne. » www.leporcenbretagne.com
- Brandes, Jay A. Brandes, Allan H. Devol, et Curtis Deutsch. 2007. « New Developments in the Marine Nitrogen Cycle. » *Chemical Reviews* 107 (2): 557-89. doi:10.1021/cr050377t.
- Broda, E. 1977. « Two kinds of lithotrophs missing in nature. » *Journal of Basic Microbiology* 17 (6): 491-93.
- Brummer, I. H. M., A. D. M. Felske, et I. Wagner-Dobler. 2004. « Diversity and Seasonal Changes of Uncultured Planctomycetales in River Biofilms. » *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5094-5101. doi:10.1128/AEM.70.9.5094-5101.2004.
- Carvajal-Arroyo, José M., Wenjie Sun, Reyes Sierra-Alvarez, et Jim A. Field. 2013. « Inhibition of Anaerobic Ammonium Oxidizing (anammox) Enrichment Cultures by Substrates, Metabolites and Common Wastewater Constituents. » *Chemosphere* 91 (1): 22-27. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.11.025.
- Chamchoi, Nuchanat, et Suwanchai Nitisoravut. 2007. « Anammox Enrichment from Different Conventional Sludges. » *Chemosphere* 66 (11): 2225-32. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.09.036.
- Cho, Sunja, Yoshitaka Takahashi, Naoki Fujii, Yohei Yamada, Hisashi Satoh, et Satoshi Okabe. 2010. « Nitrogen Removal Performance and Microbial Community Analysis of an Anaerobic up-Flow Granular Bed Anammox Reactor. » *Chemosphere* 78 (9): 1129-35. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.12.034.
- Dale, Olivia R., Craig R. Tobias, et Bongkeun Song. 2009. « Biogeographical Distribution of Diverse Anaerobic Ammonium Oxidizing (anammox) Bacteria in Cape Fear River Estuary. » *Environmental Microbiology* 11 (5): 1194-1207. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01850.x.

- Dalsgaard, Tage, Bo Thamdrup, et Donald E. Canfield. 2005. « Anaerobic Ammonium Oxidation (anammox) in the Marine Environment. » *Research in Microbiology* 156 (4): 457-64. doi:10.1016/j.resmic.2005.01.011.
- Dang, H., R. Chen, L. Wang, L. Guo, P. Chen, Z. Tang, F. Tian, S. Li, et M. G. Klotz. 2010. « Environmental Factors Shape Sediment Anammox Bacterial Communities in Hypernutrified Jiaozhou Bay, China. » *Applied and Environmental Microbiology* 76 (21): 7036-47. doi:10.1128/AEM.01264-10.
- Dapena-Mora, A., I. Fernández, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral, R. Méndez, et M.S.M. Jetten. 2007a. « Evaluation of Activity and Inhibition Effects on Anammox Process by Batch Tests Based on the Nitrogen Gas Production. » *Enzyme and Microbial Technology* 40 (4): 859-65. doi:10.1016/j.enzmitec.2006.06.018.
- Dosta, J., I. Fernández, J.R. Vázquez-Padín, A. Mosquera-Corral, J.L. Campos, J. Mata-Álvarez, et R. Méndez. 2008. « Short- and Long-Term Effects of Temperature on the Anammox Process. » *Journal of Hazardous Materials* 154 (1-3): 688-93. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.10.082.
- Egli, K., U. Fanger, P. J. Alvarez, H. Siegrist, J. R. van der Meer, et A. J. Zehnder. 2001. « Enrichment and Characterization of an Anammox Bacterium from a Rotating Biological Contactor Treating Ammonium-Rich Leachate. » *Archives of Microbiology* 175 (3): 198-207.
- Egli, Konrad, Urs Fanger, Pedro J.J. Alvarez, Hansruedi Siegrist, Jan R. van der Meer, et Alexander J.B. Zehnder. 2001. « Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. » *Archives of Microbiology* 175 (3): 198-207. doi:10.1007/s002030100255.
- Fernández, I., J. Dosta, C. Fajardo, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral, et R. Méndez. 2012. « Short- and Long-Term Effects of Ammonium and Nitrite on the Anammox Process. » *Journal of Environmental Management* 95 (mars): S170-74. doi:10.1016/j.jenvman.2010.10.044.
- Fernández, I., J.R. Vázquez-Padín, A. Mosquera-Corral, J.L. Campos, et R. Méndez. 2008. « Biofilm and Granular Systems to Improve Anammox Biomass Retention. » *Biochemical Engineering Journal* 42 (3): 308-13. doi:10.1016/j.bej.2008.07.011.
- FranceAgrimer. 2012. « L'observatoire national des ressources en biomasse-Evaluation des ressources disponibles en France. »
- Fux, C., K. Lange, A. Faessler, P. Huber, B. Grueniger, et H. Siegrist. 2003. « Nitrogen Removal from Digester Supernatant via Nitrite--SBR or SHARON? » *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 48 (8): 9-18.
- Hamersley, M. Robert, Gaute Lavik, et D. Woebken. 2007. « Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. » *Limnology and Oceanography* 52 (3): 923-33.

Hamm, Randall Earl, et Thomas Gordon Thompson. s. d. « Dissolved Nitrogen in the Sea Water of the Northeast Pacific with Notes on the Total Carbon Dioxide and the Dissolved Oxygen. » 4: 11-27.

Helmer, C., S. Kunst, S. Juretschko, M.C. Schmid, et K. H. Schleifer. 1999. « Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. » *Water Science and Technology* 39 (7): 13-21.

Hong, Yi-Guo, Bo Yin, et Tian-Ling Zheng. 2011. « Diversity and Abundance of Anammox Bacterial Community in the Deep-Ocean Surface Sediment from Equatorial Pacific. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (4): 1233-41. doi:10.1007/s00253-010-2925-4.

Jaeschke, Andrea, Ellen C. Hopmans, Stuart G. Wakeham, Stefan Schouten, et Jaap S. Sinninghe Damsté. 2007. « The presence of ladderane lipids in the oxygen minimum zone of the Arabian Sea indicates nitrogen loss through anammox. » *Limnology and Oceanography* 52 (2): 780-86. doi:10.4319/lo.2007.52.2.0780.

Jetten, M.S.M., et M. Strous. 1999. « The anaerobic ammonium oxidation. » *FEMS Microbiology Reviews* 22 (421-437).

Jetten, M.S.M., M. Wagner, et J. Fuerst. 2001. « Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. » *Elsevier Science Ltd* 12: 283-88.

Joss, Adriano, David Salzgeber, Jack Eugster, Roger König, Karin Rottermann, Sabine Burger, Peter Fabijan, Susanne Leumann, Joachim Mohn, et Hansruedi Siegrist. 2009. « Full-Scale Nitrogen Removal from Digester Liquid with Partial Nitritation and Anammox in One SBR. » *Environmental Science & Technology* 43 (14): 5301-6. doi:10.1021/es900107w.

Jung, J. Y., S. H. Kang, Y. C. Chung, et D. H. Ahn. 2007. « Factors Affecting the Activity of Anammox Bacteria during Start up in the Continuous Culture Reactor. » *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 55 (1-2): 459-68.

Junier, Pilar, Verónica Molina, Cristina Dorador, Ora Hadas, Ok-Sun Kim, Thomas Junier, Karl-Paul Witzel, et Johannes F. Imhoff. 2010. « Phylogenetic and Functional Marker Genes to Study Ammonia-Oxidizing Microorganisms (AOM) in the Environment. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (3): 425-40. doi:10.1007/s00253-009-2228-9.

Kadam, P. C., et D. R. Boone. 1996. « Influence of pH on Ammonia Accumulation and Toxicity in Halophilic, Methylophilic Methanogens. » *Applied and Environmental Microbiology* 62 (12): 4486-92.

Kartal, Boran, Mariana Koleva, Roumen Arsov, Wouter van der Star, Mike S.M. Jetten, et Marc Strous. 2006. « Adaptation of a Freshwater Anammox Population to High Salinity Wastewater. » *Journal of Biotechnology* 126 (4): 546-53. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.05.012.

Kartal, Boran, Laura Van Niftrik, Jayne Rattray, Jack L.C.M. Van De Vossenberg, Markus C. Schmid, Jaap Sinninghe Damsté, Mike S.M. Jetten, et Marc Strous. 2008. « Candidatus 'Brocadia Fulgida': An Autofluorescent Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacterium:

Autofluorescent Anammox Bacteria. » *FEMS Microbiology Ecology* 63 (1) : 46-55. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00408.x.

Kartal, B., J. Rattray, L.A. van Niftrik, et J. van de Vossenberg. 2007. « Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria ». *Systematic and Applied Microbiology* 30 (1): 39-49.

Kimura, Yuya, Kazuichi Isaka, Futaba Kazama, et Tatsuo Sumino. 2010. « Effects of Nitrite Inhibition on Anaerobic Ammonium Oxidation. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (1): 359-65. doi:10.1007/s00253-009-2359-z.

Kuypers, Marchel M. M., A. Olav Sliekers, Gaute Lavik, et Markus Schmid. 2003. « Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. » *Nature* 422 (février): 608-11.

Lackner, Susanne, Akihiko Terada, et Barth F. Smets. 2008. « Heterotrophic Activity Compromises Autotrophic Nitrogen Removal in Membrane-Aerated Biofilms: Results of a Modeling Study. » *Water Research* 42 (4-5): 1102-12. doi:10.1016/j.watres.2007.08.025.

Lam, P., G. Lavik, M. M. Jensen, J. van de Vossenberg, M. Schmid, D. Woebken, D. Gutierrez, R. Amann, M. S. M. Jetten, et M. M. M. Kuypers. 2009. « Revising the Nitrogen Cycle in the Peruvian Oxygen Minimum Zone. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (12): 4752-57. doi:10.1073/pnas.0812444106.

Liao, Dexiang, Xiaoming Li, Qi Yang, Zhihong Zhao, et Guangming Zeng. 2007. « Enrichment and Granulation of Anammox Biomass Started up with Methanogenic Granular Sludge. » *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (7): 1015-20. doi:10.1007/s11274-006-9328-9.

Li, M., H. Cao, YG. Hong, et JD. Gu. 2011. « Seasonal dynamics of anammox bacteria in estuarial sediment of the Mai Po Nature Reserve revealed by analyzing the 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase (hzo) genes. » *Microbes and environments/ JSME* 26 (1): 15-22.

Li, Meng, Tim Ford, Xiaoyan Li, et Ji-Dong Gu. 2011. « Cytochrome cd1 -Containing Nitrite Reductase Encoding Gene nirS as a New Functional Biomarker for Detection of Anaerobic Ammonium Oxidizing (Anammox) Bacteria. » *Environmental Science & Technology* 45 (8): 3547-53. doi:10.1021/es103826w.

Li, Meng, Yiguo Hong, Martin Gunter Klotz, et Ji-Dong Gu. 2010. « A Comparison of Primer Sets for Detecting 16S rRNA and Hydrazine Oxidoreductase Genes of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Marine Sediments. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (2): 781-90. doi:10.1007/s00253-009-2361-5.

Lopez-Ridaura, Santiago, Hayo van der Werf, Jean Marie Paillat, et Bertrand Le Bris. 2009. « Environmental evaluation of transfer and treatment of excess pig slurry by life cycle assessment » 90 (Issue 2): 1296-1304. doi:10.1016/j.jenvman.2008.07.008.

- Lotti, T., W.R.L. van der Star, R. Kleerebezem, C. Lubello, et M.C.M. van Loosdrecht. 2012. « The Effect of Nitrite Inhibition on the Anammox Process. » *Water Research* 46 (8): 2559-69. doi:10.1016/j.watres.2012.02.011.
- Magrí, Albert, Matias B. Vanotti, et Ariel A. Szögi. 2012. « Anammox Sludge Immobilized in Polyvinyl Alcohol (PVA) Cryogel Carriers. » *Bioresource Technology* 114 (juin): 231-40. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.077.
- Martinelle, Kristina, Anna Westlund. 1996. « Ammonium Ion Transport? a Cause of Cell Death. » *Cytotechnology* 22 (1-3): 251-54. doi:10.1007/BF00353945.
- Meyer, Rikke Louise, Nils Risgaard-Petersen, et Diane Elizabeth Allen. 2005. « Correlation between Anammox Activity and Microscale Distribution of Nitrite in a Subtropical Mangrove Sediment. » *Applied and Environmental Microbiology* 71 (10): 6142-49.
- Mosquera-Corral, A., F. González, J.L. Campos, et R. Méndez. 2005. « Partial Nitrification in a SHARON Reactor in the Presence of Salts and Organic Carbon Compounds. » *Process Biochemistry* 40 (9): 3109-18. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.042.
- Mulder, A., A. A. Van de Graaf, L. A. Robertson, et J.G. Kuenen. 1995. « Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. » *FEMS Microbiology Ecology* 16 (3): 177-83.
- Neef, A., R. Amann, H. Schlesner, et K. H. Schleifer. 1998. « Monitoring a Widespread Bacterial Group: In Situ Detection of Planctomycetes with 16S rRNA-Targeted Probes. » *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 12) (décembre): 3257-66.
- Niftrik, Laura A., John A. Fuerst, Jaap S. Sinninghe Damsté, J. Gijs Kuenen, Mike S.M. Jetten, et Marc Strous. 2004. « The Anammoxosome: An Intracytoplasmic Compartment in Anammox Bacteria. » *FEMS Microbiology Letters* 233 (1): 7-13. doi:10.1016/j.femsle.2004.01.044.
- Ni, S. Q., et J. Meng. 2011. « Performance and Inhibition Recovery of Anammox Reactors Seeded with Different Types of Sludge. » *Water Science & Technology* 63 (4): 710. doi:10.2166/wst.2011.293.
- Oshiki, M., M. Shimokawa, N. Fujii, H. Satoh, et S. Okabe. 2011. « Physiological Characteristics of the Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacterium "Candidatus Brocadia Sinica". » *Microbiology* 157 (6): 1706-13. doi:10.1099/mic.0.048595-0.
- Pavlekovic, Marko, Markus C. Schmid, Nadja Schmitter-Boegner, Stefan Spring, Martin Pilhofer, Tobias Gaul, Mark Fiandaca, et al. 2009. « Optimization of Three FISH Procedures for in Situ Detection of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria in Biological Wastewater Treatment. » *Journal of Microbiological Methods* 78 (2): 119-26. doi:10.1016/j.mimet.2009.04.003.

- Rich, Jeremy J., Olivia R. Dale, Bongkeun Song, et Bess B. Ward. 2008. « Anaerobic Ammonium Oxidation (anammox) in Chesapeake Bay Sediments. » *Microbial Ecology* 55 (2): 311-20. doi:10.1007/s00248-007-9277-3.
- Rysgaard, S., et Ronnie Nøhr Glud. 2004. « Anaerobic N₂ production in Arctic sea ice. » *Limnology and Oceanography* 49 (1): 86-94.
- Rysgaard, Søren, Ronnie Nøhr Glud, Nils Risgaard-Petersen, et Tage Dalsgaard. 2004. « Denitrification and Anammox Activity in Arctic Marine Sediments. » *Limnology and Oceanography* 49 (5): 1493-1502. doi:10.4319/lo.2004.49.5.1493.
- Sanders, D.L., E. Audsley, C. Canete, T.R. Cumby, I.M. Scotford, et A.G. Williams. 2003. « Environmental Benefits of Livestock Manure Management Practices and Technology by Life Cycle Assessment » 84 (3): 267-81. doi:10.1016/S1537-5110(02)00278-7.
- Scaglione, D., M. Rusalleda, E. Ficara, M.D. Balaguer, et J. Colprim. 2012. « Response to High Nitrite Concentrations of Anammox Biomass from Two SBR Fed on Synthetic Wastewater and Landfill Leachate. » *Chemical Engineering Journal* 209 (octobre): 62-68. doi:10.1016/j.cej.2012.07.106.
- Schalk, Jos, Simon de Vries, J. Gijs Kuenen, et Mike S. M. Jetten. 2000. « Involvement of a Novel Hydroxylamine Oxidoreductase in Anaerobic Ammonium Oxidation. » *Biochemistry* 39 (18): 5405-12. doi:10.1021/bi992721k.
- Schmid, Markus C., Alan B. Hooper, Martin G. Klotz, Dagmar Woebken, Phyllis Lam, Marcel M. M. Kuypers, Andreas Pommerening-Roeser, Huub J. M. op den Camp, et Mike S. M. Jetten. 2008. « Environmental Detection of Octahaem Cytochrome *c* Hydroxylamine/hydrazine Oxidoreductase Genes of Aerobic and Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria ». *Environmental Microbiology* 10 (11): 3140-49. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01732.x.
- Schmid, M. C., B. Maas, A. Dapena, K. van de Pas-Schoonen, J. van de Vossenberg, B. Kartal, L. van Niftrik, et al. 2005. « Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria. » *Applied and Environmental Microbiology* 71 (4): 1677-84. doi:10.1128/AEM.71.4.1677-1684.2005.
- Schubert, CJ, E Durisch-Kaiser, B Wehrli, B Thanmdrup, P Lam, et MM Kuypers. 2006. « Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). » *Applied and Environmental Microbiology* 8 (10): 1857-63.
- Shen, Li-dong, An-hui Hu, Ren-cun Jin, Dong-qing Cheng, Ping Zheng, Xiang-yang Xu, et Bao-lan Hu. 2012. « Enrichment of Anammox Bacteria from Three Sludge Sources for the Startup of Monosodium Glutamate Industrial Wastewater Treatment System. » *Journal of Hazardous Materials* 199-200 (janvier): 193-99. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.10.081.
- Siegrist, H., S. Reithaar, G. Koch, et P. Lais. 1998. « Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. » *Water Science and Technology* 38 (8-9): 241-48.

Sinninghe Damsté, Jaap S., Marc Strous, W. Irene Rijpstra, et Ellen C. Hopmans. 2002. « Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. » *Nature* 419 (août): 708-12.

Strous, Marc, John A. Fuerst, Evelien H. M. Kramer, et Gerard Muyzer Logemann. 1999. « Missing lithotroph identified as new planctomycete. » *Nature* 400 (juin): 446-49. doi:Missing lithotroph identified as new planctomycete.

Strous, Marc, J. Gijs Kuenen, et Mike S. M. Jetten. 1999. « Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. » *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7): 3248-50.

Strous, Marc, Eric Pelletier, Sophie Mangenot, Thomas Rattei, Angelika Lehner, Michael W. Taylor, Matthias Horn, et al. 2006. « Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. » *Nature* 440 (7085): 790-94. doi:10.1038/nature04647.

Strous, Marc, Eric van Gerven, et J. Gijs Kuenen. 1997. « Effects of Aerobic and Microaerobic Conditions on Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Sludge. » *American Society for Microbiology* 63 (6): 2446-48.

Strous, M., J. J. Heijnen, J. G. Kuenen, et M. S. M. Jetten. 1998. « The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (5): 589-96. doi:10.1007/s002530051340.

Tao, Yu, Da-Wen Gao, Hao-Yu Wang, Merle de Kreuk, et Nan-Qi Ren. 2013. « Ecological Characteristics of Seeding Sludge Triggering a Prompt Start-up of Anammox. » *Bioresource Technology* 133 (avril): 475-81. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.147.

Thamdrup, Bo, et Tage Dalsgaard. 2002. « Production of N₂ through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments. » *Applied and Environmental Microbiology* 68 (3): 1312-18.

Trigo, C., J.L. Campos, J.M. Garrido, et R. Méndez. 2006. « Start-up of the Anammox Process in a Membrane Bioreactor. » *Journal of Biotechnology* 126 (4): 475-87. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.05.008.

Trimmer, M., J. C. Nicholls, et B. Deflandre. 2003. « Anaerobic Ammonium Oxidation Measured in Sediments along the Thames Estuary, United Kingdom. » *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11): 6447-54. doi:10.1128/AEM.69.11.6447-6454.2003.

Tsushima, Ikuo, Tomonori Kindaichi, et Satoshi Okabe. 2007. « Quantification of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Enrichment Cultures by Real-Time PCR. » *Water Research* 41 (4): 785-94. doi:10.1016/j.watres.2006.11.024.

Van de Graaf, A. A., P. de Bruijn, L. A. Robertson, M. S. M. Jetten, et J. G. Kuenen. 1996. « Autotrophic Growth of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Micro-Organisms in a Fluidized Bed Reactor. » *Microbiology* 142 (8): 2187-96. doi:10.1099/13500872-142-8-2187.

Van de Graaf, A. A. van, A. Mulder, P. De Bruijn, M. S. Jetten, L. A. Roberstson, et J. G. Kuenen. 1995. « Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. » *AEM-Appl. Environ. Microbiol.* 61 (4): 1246-51.

Van der Star, Wouter R.L., Wiebe R. Abma, Dennis Blommers, Jan-Willem Mulder, Takaaki Tokutomi, Marc Strous, Cristian Picioreanu, et Mark C.M. van Loosdrecht. 2007. « Startup of Reactors for Anoxic Ammonium Oxidation: Experiences from the First Full-Scale Anammox Reactor in Rotterdam. » *Water Research* 41 (18): 4149-63. doi:10.1016/j.watres.2007.03.044.

Van der Star, Wouter R.L., Andreea I. Miclea, Udo G.J.M. van Dongen, Gerard Muyzer, Cristian Picioreanu, et Mark C.M. van Loosdrecht. 2008. « The Membrane Bioreactor: A Novel Tool to Grow Anammox Bacteria as Free Cells. » *Biotechnology and Bioengineering* 101 (2): 286-94. doi:10.1002/bit.21891.

Van Hulle, Stijn W.H., Helge J.P. Vandeweyer, Boudewijn D. Meesschaert, Peter A. Vanrolleghem, Pascal Dejans, et Ann Dumoulin. 2010. « Engineering Aspects and Practical Application of Autotrophic Nitrogen Removal from Nitrogen Rich Streams. » *Chemical Engineering Journal* 162 (1): 1-20. doi:10.1016/j.cej.2010.05.037.

Wett, B., S. Murthy, I. Takacs, M. Hell, et G. Bowden. 2007. « Key parameters for control of denitrification process. »