

La diversité microbienne dans les bioprocédés

Richard Villemur, Ph. D.

Professeur titulaire

INRS-Institut Armand-Frappier

Spécialiste en écologie microbienne des bioprocédés de dépollution

Date : 31 octobre 2013

Bioprocédés étudiés

- Bioréacteur de type Upflow anaerobic sludge blanket
- Bioréacteur film fixe anaérobie
 - Dégradation du pentachlorophénol
- Bioprocédé de dénitrification en eaux de mer
 - Diminution du nitrate dans le bassin d'eau de mer du Biodôme de Montréal
- Bioprocédé d'enlèvement de phosphate
 - Enlèvement du phosphate dans le bassin d'élevage de poisson
- Bioréacteur thermophile pour la dégradation de lisier de porc
 - Développement d'un consortium microbien pour la dégradation de modulateurs endocriniens
 - Biotraitement d'un effluent minier aurifère pour la dégradation du thiocyanate

Establishment of enrichment cultures adapted to two-phase partitioning system for the degradation of endocrine disruptors

Richard Villemur, Silvia dos Santos, Julianne Ouellette, Pierre Juteau, François Lépine, Eric Déziel.

Villemur, dos Santos, Ouellette J, Juteau P, Lépine F, Déziel E. 2013. Establishment of enrichment cultures adapted to a two-phase partitioning Hytrel/water system for the degradation of endocrine disruptors. **Appl. Environ. Microbiol.** 79:4701 -4711.

Ouellette J, dos Santos S, Lépine F, Juteau P, Déziel E, **Villemur R.** 2013. High absorption of endocrine disruptors by Hytrel: Towards the development of a two-phase partitioning biosystem. **J. Chemical Technology & Biotechnology.** 88:119 -125.

Problématique

- Estrogènes sont des hormones impliqués dans le développement des individus.
 - 17- α -Éthinylestradiol : pilule contraceptive
- D'autres molécules issues de l'activité industrielle (Bis-phénol A, n-nonyl phénol) ont des effets sur le système endocrinien.
- Ils se retrouvent dans les urines et donc les eaux usées, à des concentrations faibles, mais toujours actives.
- Les traitements des eaux usées sont, pour la plupart, inefficaces pour les éliminer dues à leurs faibles concentrations.
- Se retrouvent dans l'environnement et deviennent des perturbateurs endocriniens.

Problématique

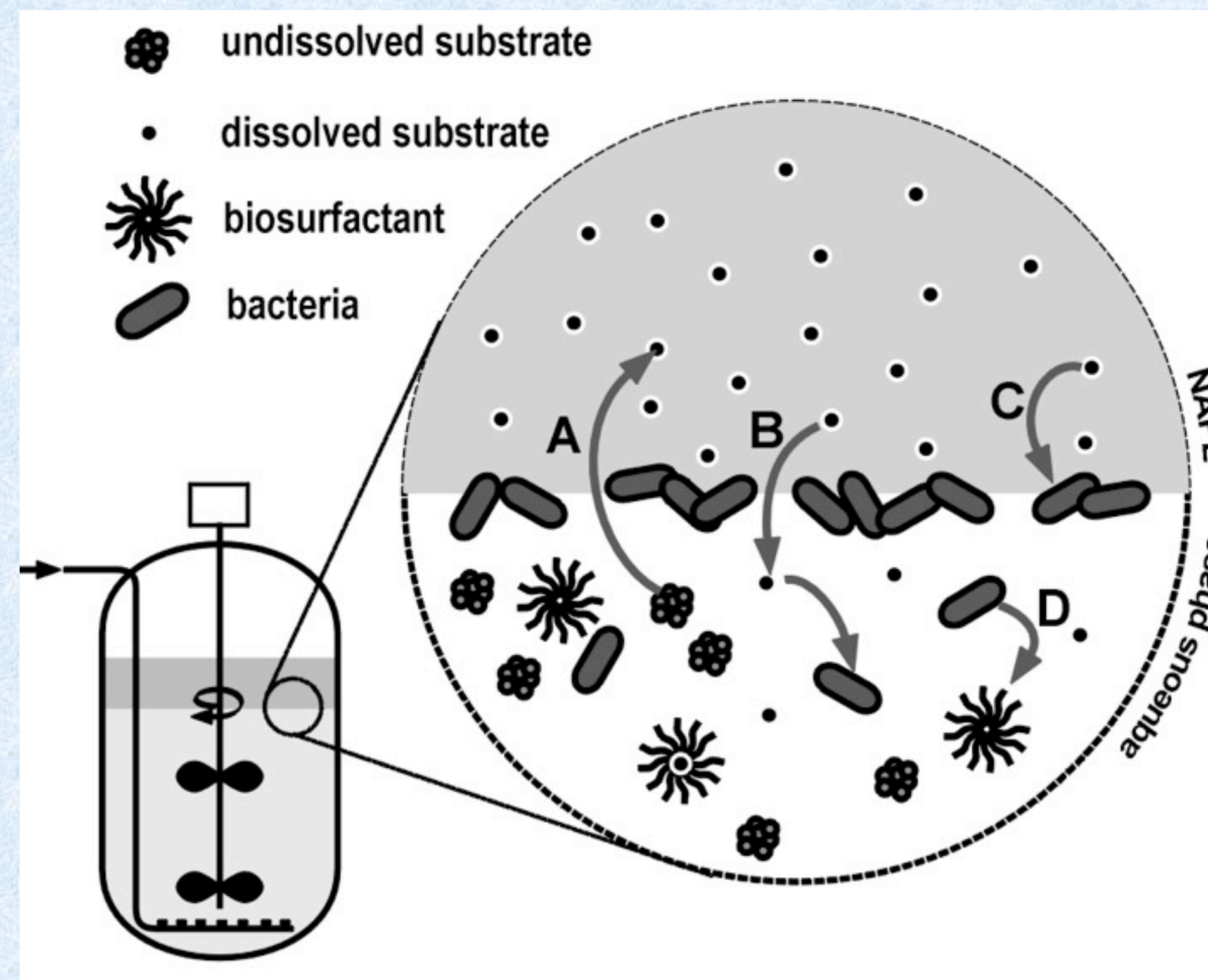
- Se retrouvent dans les eaux
 - Induire la féminisation des poissons
 - Dysfonction des systèmes de reproduction
- Pourrait expliquer le déclin de la qualité du sperme depuis 50 ans.
- Accumulation dans la chaîne alimentaire

Problématique

- Molécules faiblement solubles dans l'eau.
- Une explication possible de la persistance des estrogènes malgré leur biodégradabilité est leur très faible concentration dans les eaux usées, soit entre 1 et 70 ng/l.
- Procédés biologiques : concentrations trop faibles pour permettre la croissance de microorganismes.
- Besoin d'améliorer le traitement des eaux usées pour l'élimination de ces substances
- => Système à deux phases immiscibles

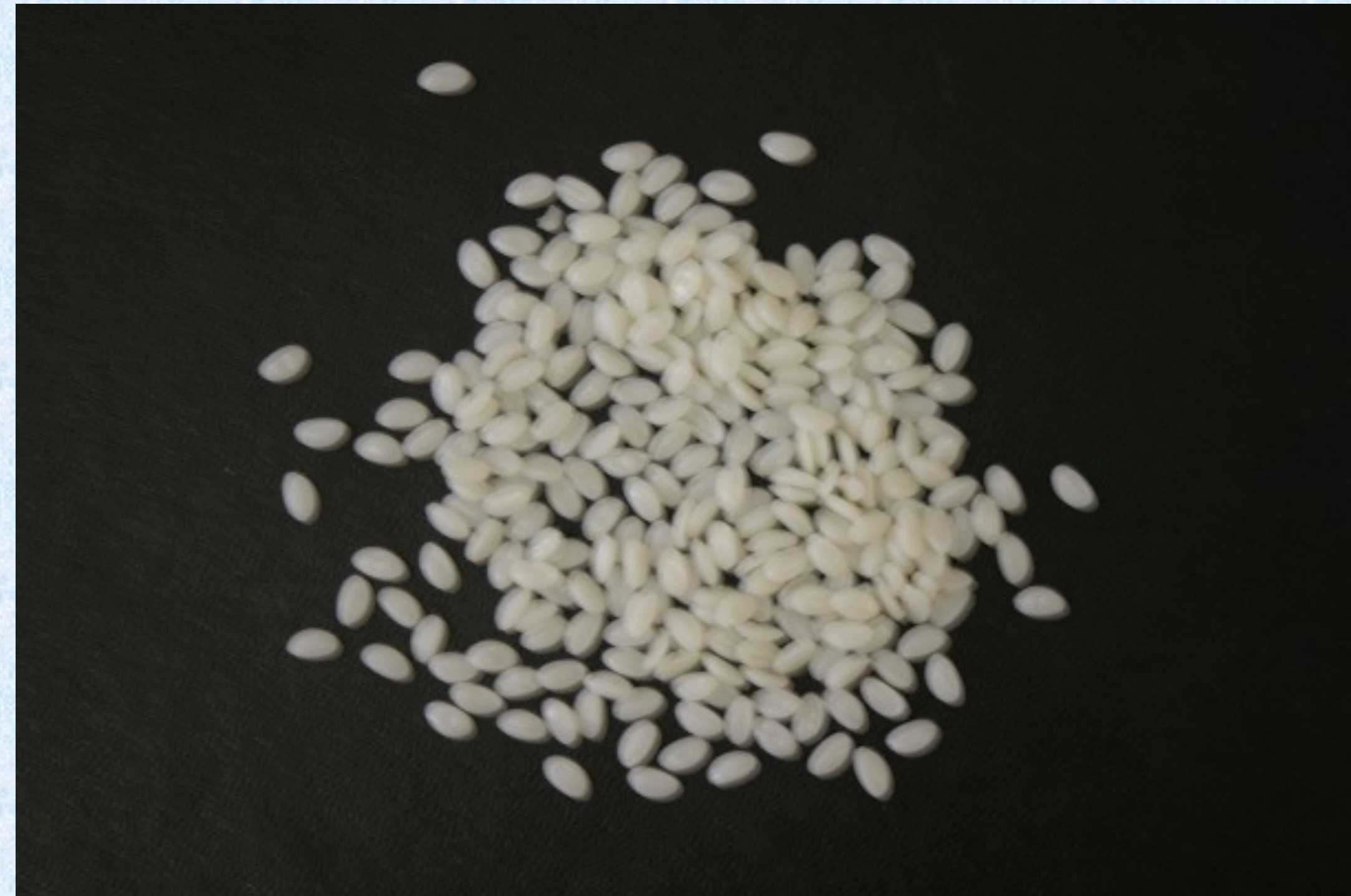
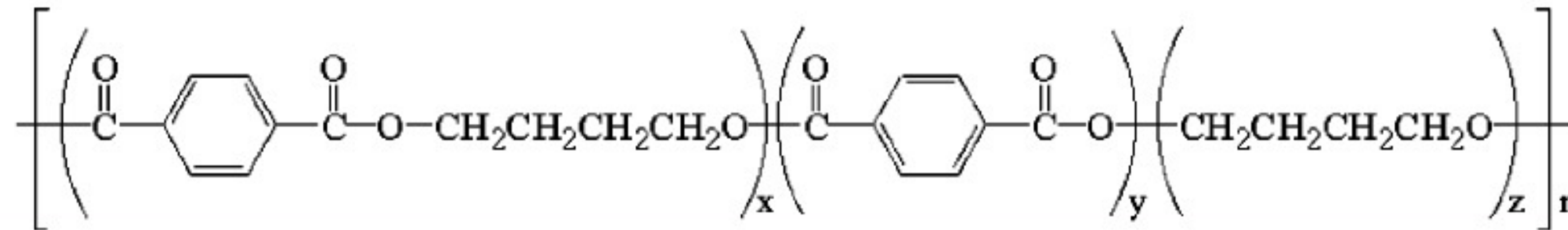
Systeme à deux phases immiscibles

- Une phase immiscible à l'eau peut extraire des eaux usées les MEs et les concentrer.
- La phase immiscible est ensuite combinée à une phase aqueuse contenant une flore microbienne adaptée pour la dégradation des MEs.

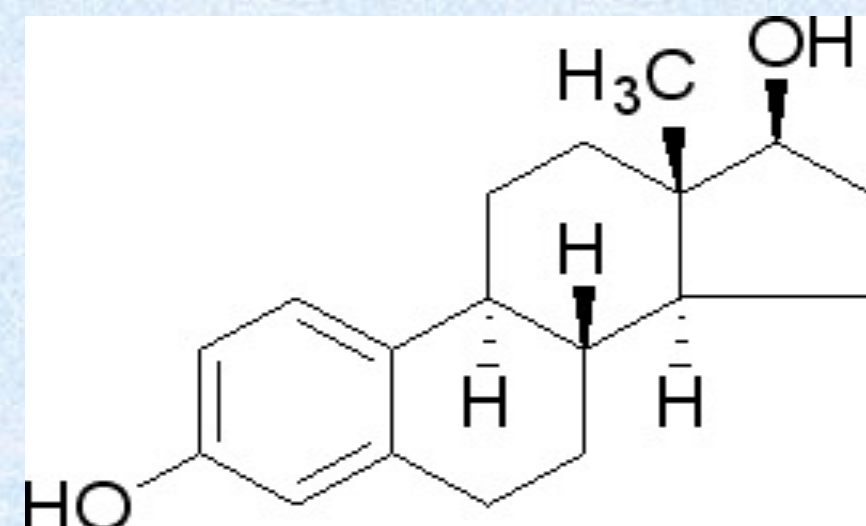


Hytrel 8206Tm

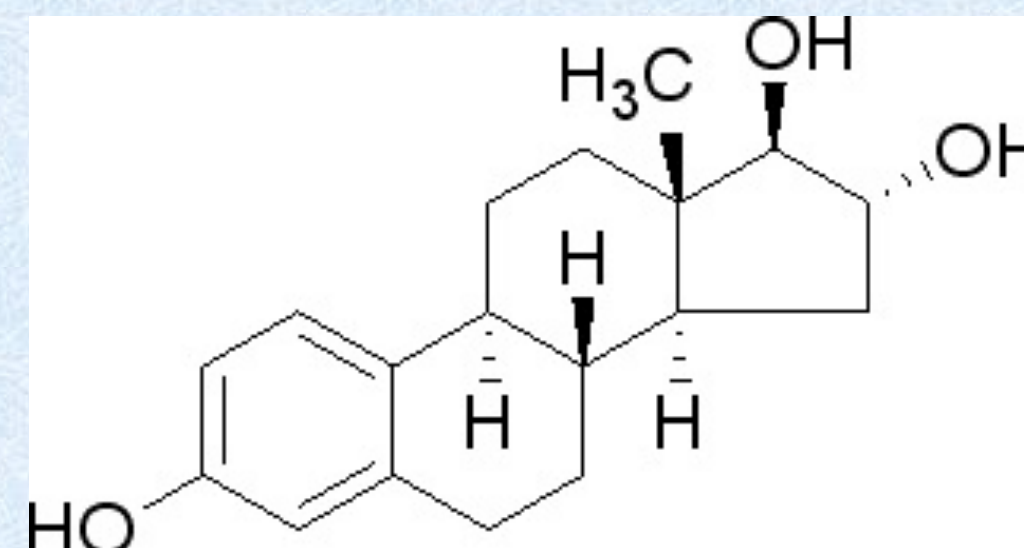
% Poly(butylene terephthalate))^a



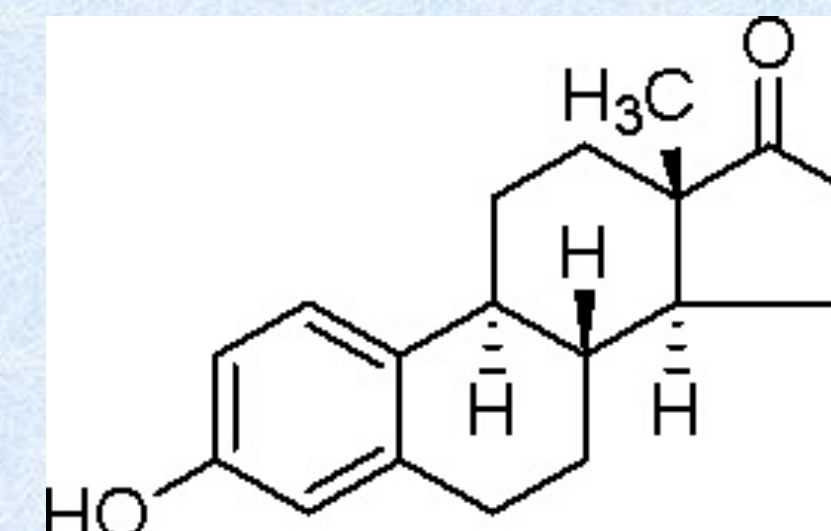
Modulateurs endocriniens à l'étude



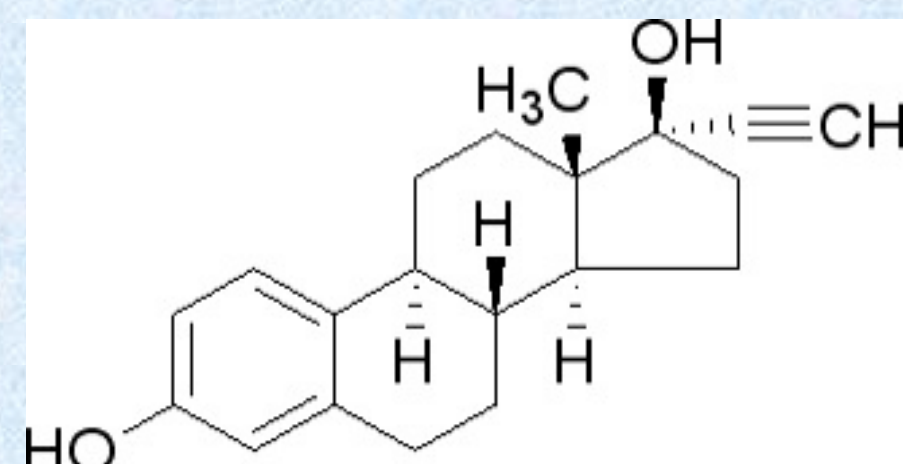
17-β-Estradiol (E2)



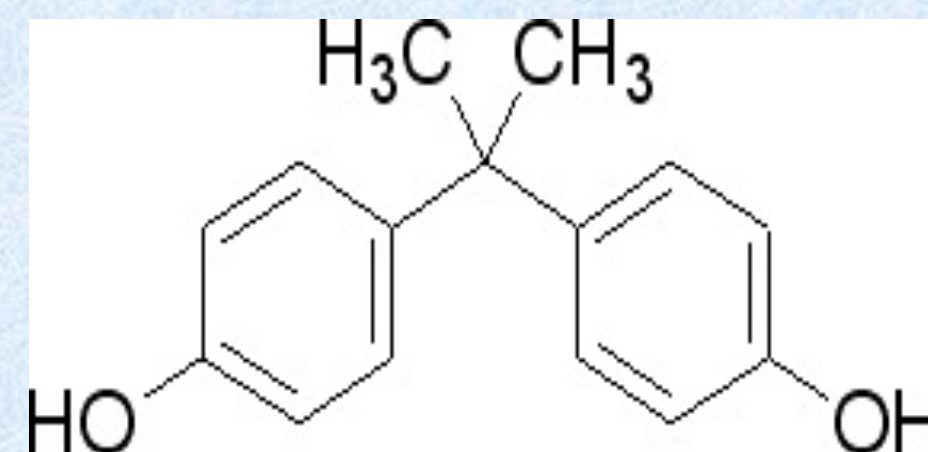
Estriol (E3)



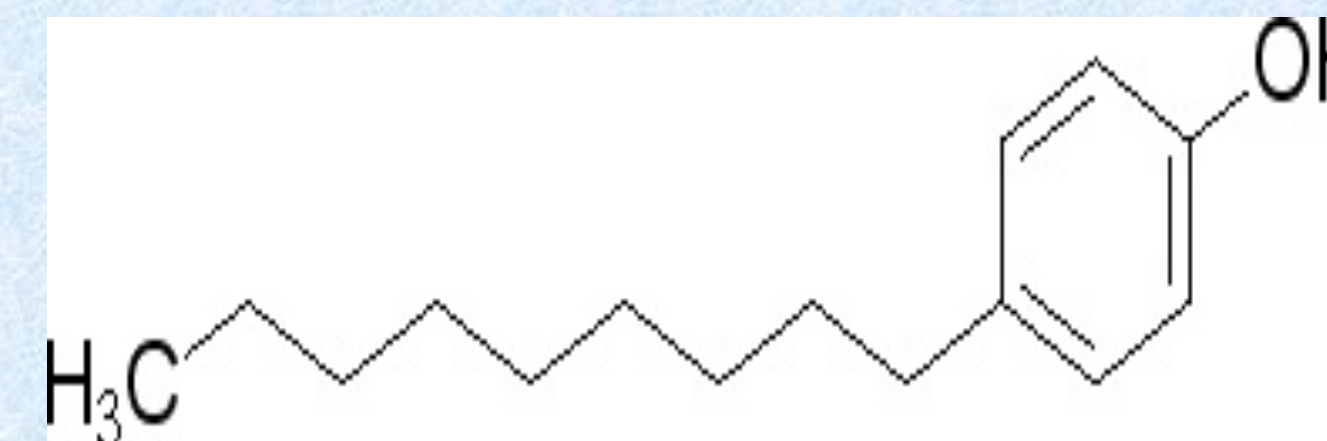
Estrone (E1)



17-α-Éthinylestradiol (EE2)



Bisphénol A (BPA)



Nonylphénol (NP)

Objectif du projet

- Établir des enrichissements microbiens pour la dégradation des MEs dans un système à deux phases immiscibles, avec l'Hytrel comme phase immiscible à l'eau.
- => Perspective de développer un bioréacteur à deux phases immiscibles pour la dégradation de MEs.

Solubilité des MEs dans l'Hytrel

Endocrine disruptor	Solubility in water ^a 25°C (µg/g)	Absorption by Hytrel (µg/g)	
		Individual	Combined
E1	12.42	590 ± 35	577 ± 18
E2	12.96	661 ± 30	611 ± 44
E3	13.25	514 ± 33	452 ± 20
EE2	4.83	666 ± 48	571 ± 30
NP	5.43	438 ± 4	549 ± 31
BPA	120	621 ± 16	705 ± 42

Objectifs spécifiques

- Enrichissement des flores microbiennes
- Déterminer leur capacité de dégradation des MEs
- Déterminer la composition des flores bactériennes
- Isoler des souches capables de dégrader des MEs

Enrichissements

- Inoculum de départ
 - Boue d'eaux usées
 - Biomasse d'un réacteur traitant le lisier
 - Biomasse d'un réacteur à deux phases immiscibles pour la dégradation d'hydrocarbures aromatiques
- Phase immiscible
 - Hytrel
- Milieu minimal (60 ml)
 - Les MEs dissous préalablement dans l'Hytrel comme seules sources de carbone
- Repiquage chaque 4 semaines avec milieu frais
- Fait en triplicats

Enrichissements 2008-2011

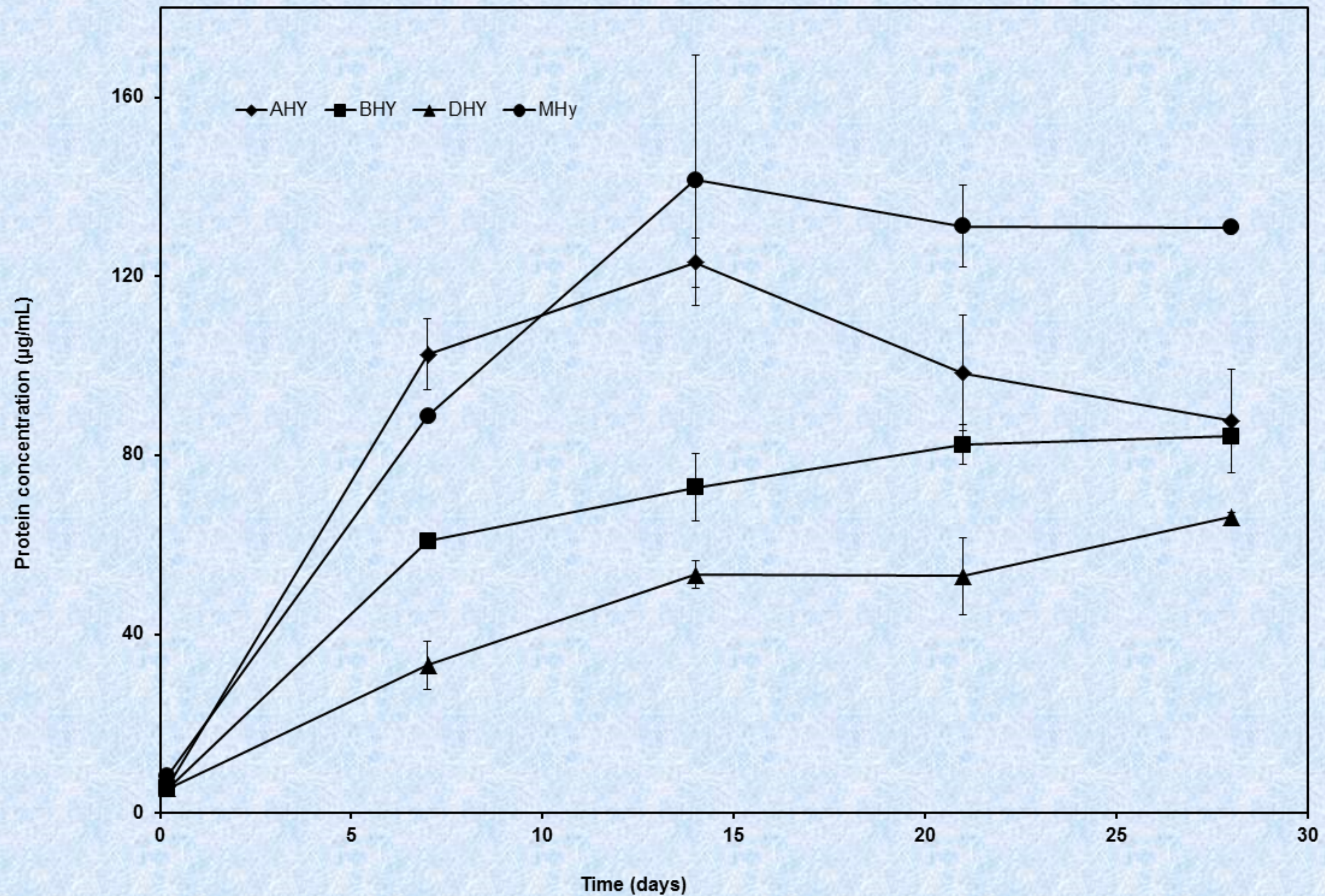
Nom de l'enrichissement	MEs presents
AHy	E1, E2, E3, EE2
BHy	BPA, NP
DHy	E1, E2, E3, EE2, BPA, NP
MHy	aucun

E1: Estrone. E2: 17 β est radi ϕ . E3: Estradiol.

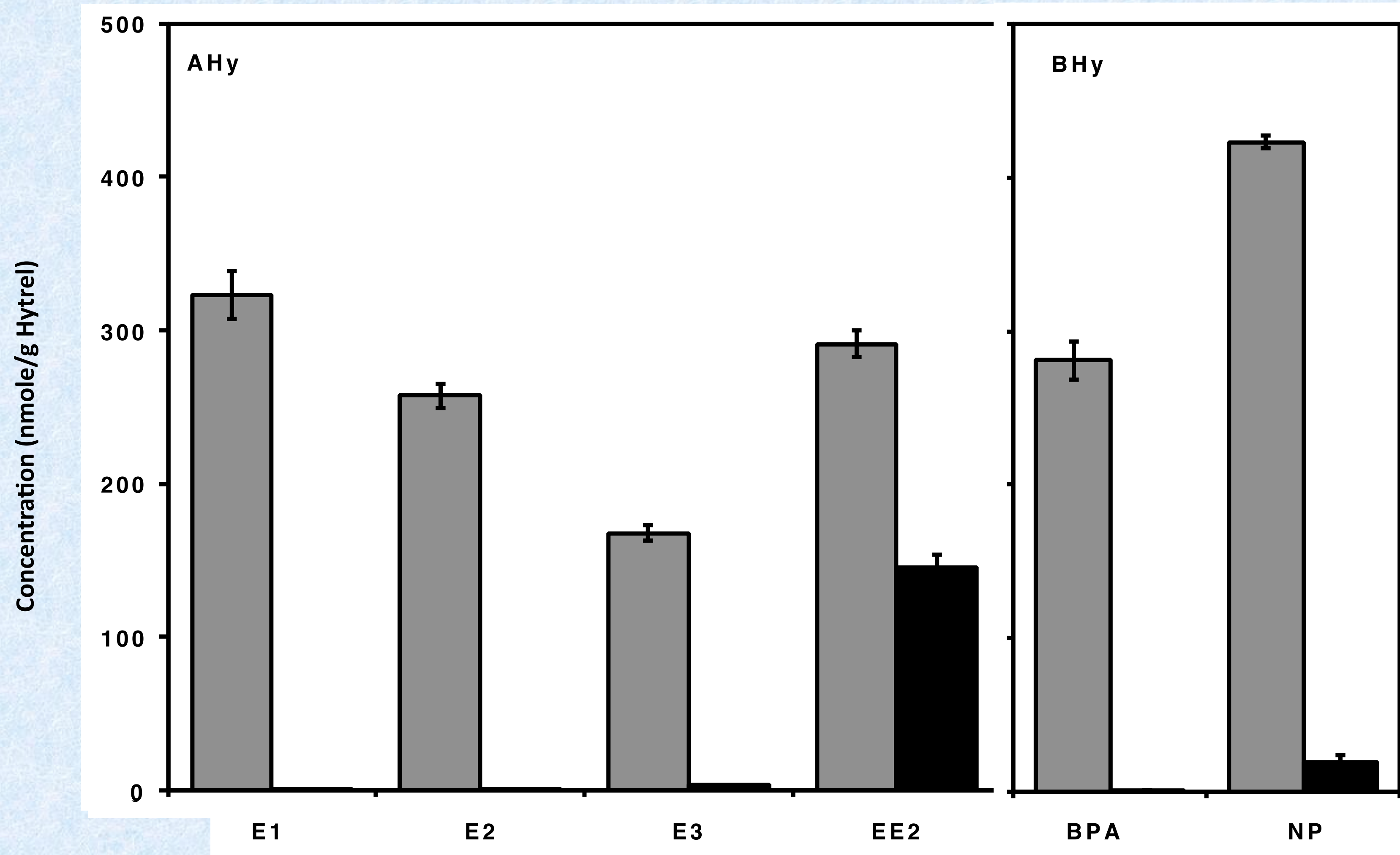
EE2: 17 α ethynyl est radi ol.

BPA: Bisphenol A. NP: 4m α nyl phenol .

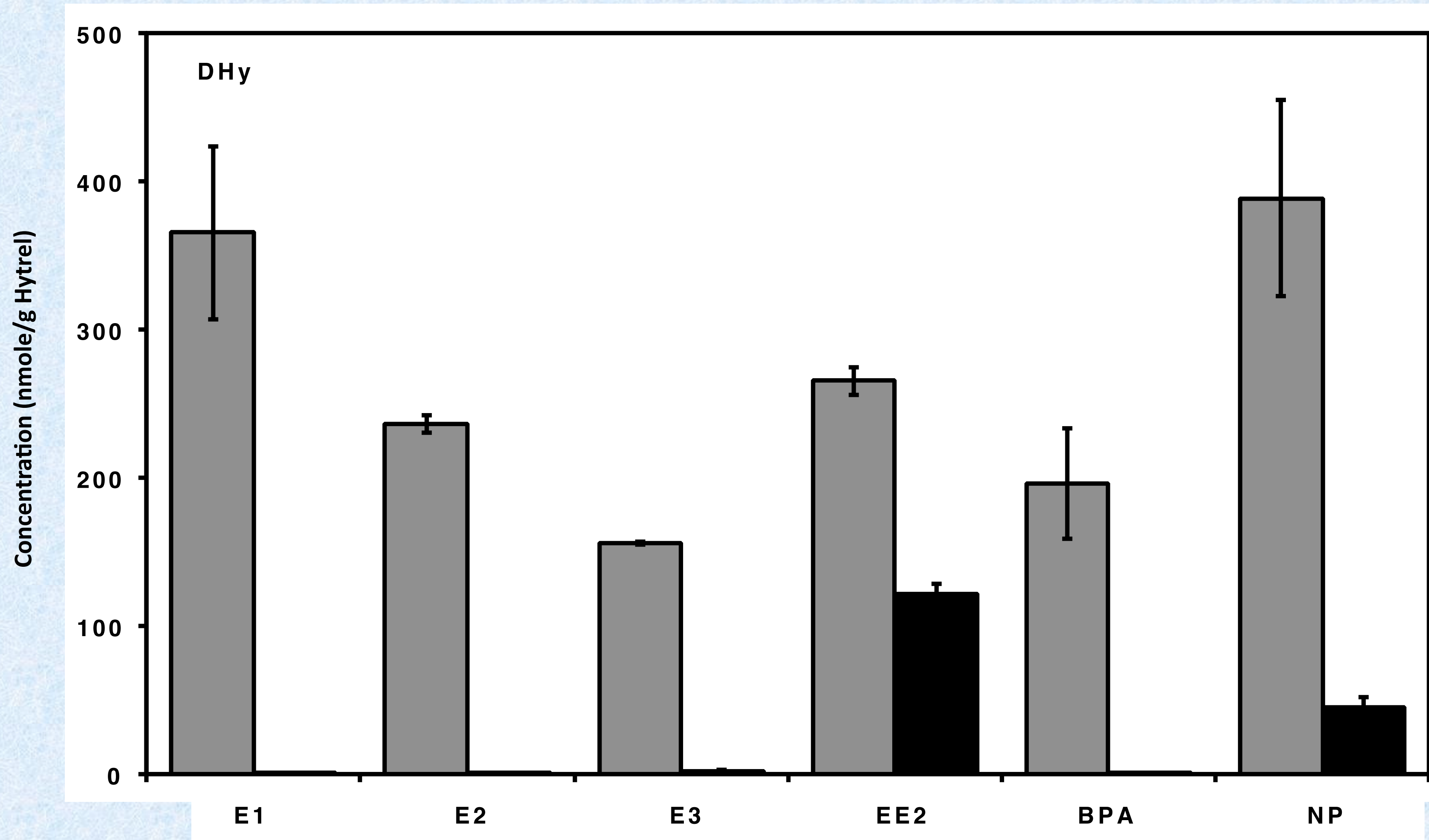
Croissance des enrichissements



Dégradation des MEs par les enrichissements



Dégradation des MEs par les enrichissements (suite)

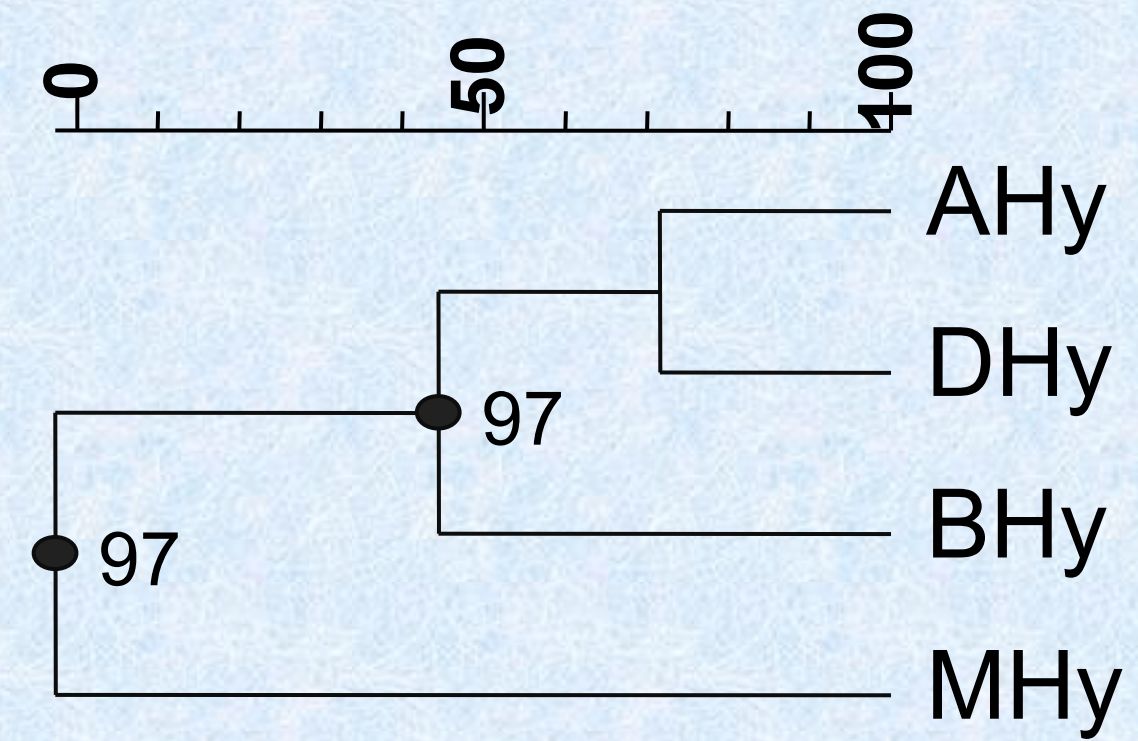
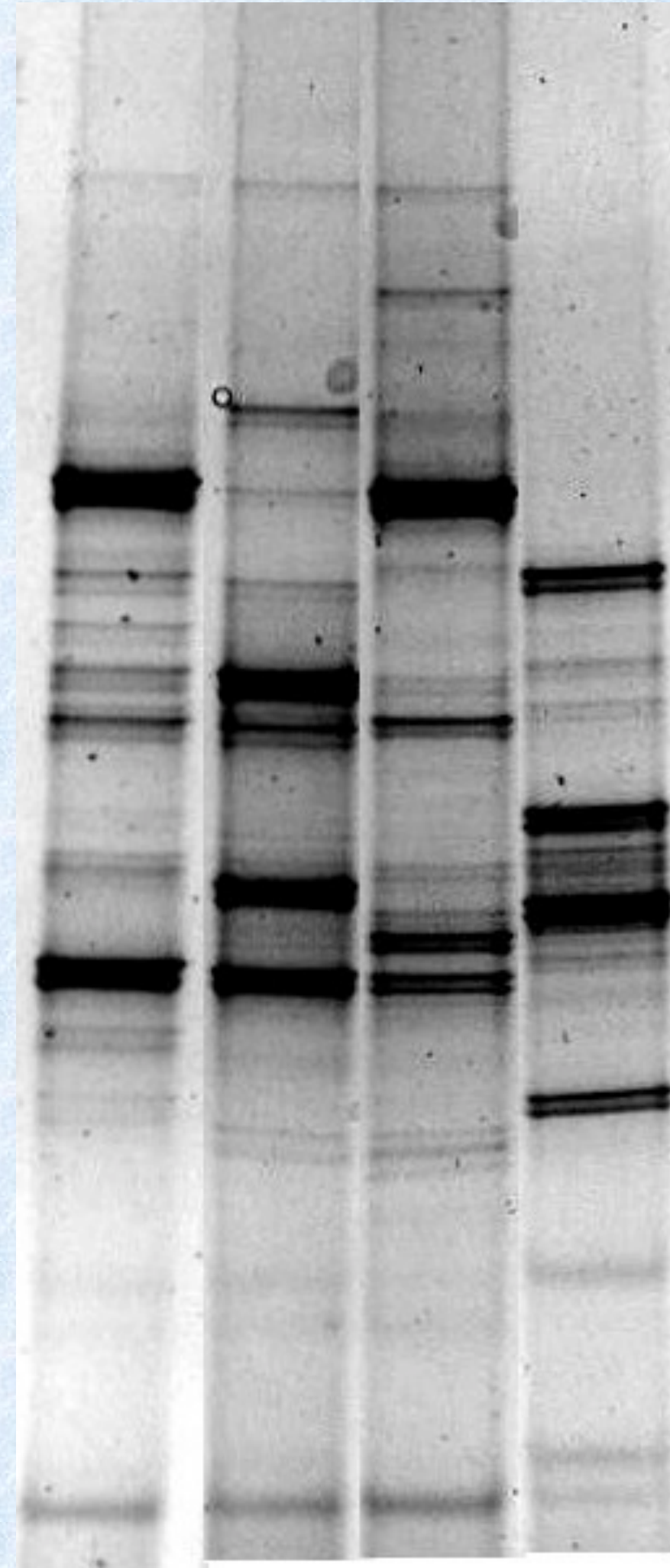


Diversité bactérienne

- Extraction de l'ADN total des enrichissements
- Amplification PCR des gènes de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S
- Multitude de séquences de même longueur séparées sur Gel Électrophorèse à Gradient dénaturant (DGGE)
- Séquençage à haut débit (technologie 454, pyroséquençage)
- Affiliation des séquences pour identification des bactéries en présence

Profil migratoire DGGE

AHy BHy DHy MHy

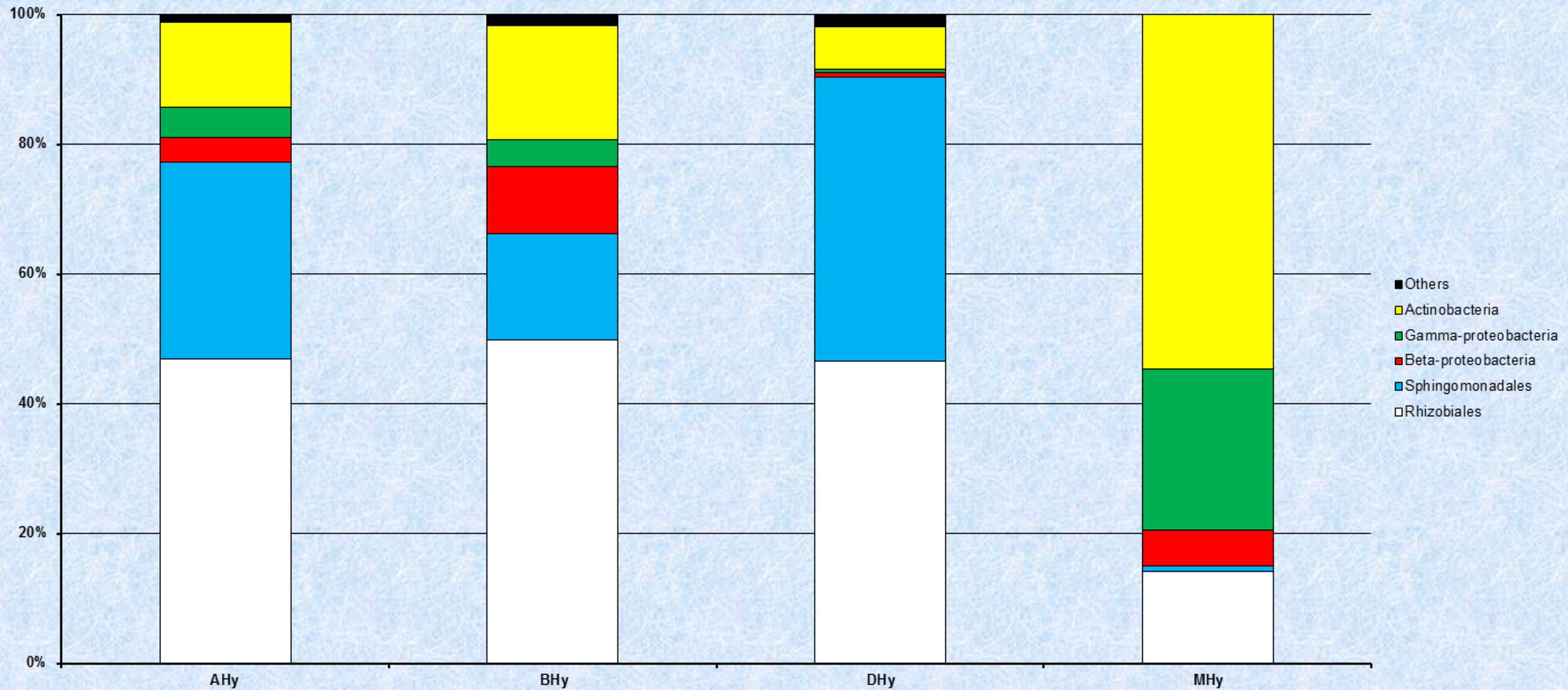


« Pyrosequencing reads » de chaque enrichissement

- Gènes de l'ARNr 16S
–Amorce 28f

TPP culture	Reads	Trimmed >300 nt; Q >20 (50%)	Average read length nt
Hyt-A:	5262	4340	410 (300-495)
Hyt-B:	8480	7057	399 (300-503)
Hyt-D:	6881	5519	414 (300-504)
Hyt-M:	54077	42906	389 (300-506)

Proportion des bactéries les plus abondantes dans les enrichissements



Affiliation des séquences de l'ARNr 16S

Affiliation	Proportion (%)			
	Enrichissements			
	AHy	BHy	DHy	MHy
Alpha-proteobacteria				
Rhizobiales				
<i>Hyphomicrobium</i>	38.2	27.1	34.5	6.0
<i>Bosea</i>	2.8	0.74	1.0	0.00
<i>Nitrobacter</i>	2.7	3.3	3.4	5.8
<i>Mesorhizobium</i>	0.05	0.44	3.8	0.84
<i>Pseudaminobacter</i>	1.4	1.3	1.6	0.14
<i>Aminobacter</i>	1.2	0.23	0.00	0.08
<i>Ochrobactrum</i>	0.00	15.7	0.05	0.92
Sphingomonadales				
<i>Sphingomonas</i>	3.1	13.3	6.9	0.73
<i>Porphyrobacter</i>	26.8	0.00	34.1	0.00
<i>Novosphingobium</i>	0.02	2.6	2.1	0.07
Beta-proteobacteria; Burkholderiales				
<i>Pigmentiphaga</i>	0.81	1.1	0.69	5.1
<i>Pandoraea</i>	2.80	9.0	0.13	0.43
Gamma-proteobacteria; Xanthomonadales				
<i>Rhodanobacter</i>	4.0	3.6	0.02	22.4
<i>Dokdonella</i>	0.35	0.52	0.33	2.4
Actinobacteria; Actinomycetales				
<i>Leifsonia</i>	10.6	14.4	0.53	0.55
<i>Microbacterium</i>	1.7	2.7	5.1	53.3
Others	3.1	3.9	5.6	1.3

Isolement de souches dégradant les MEs

- Enrichissement AHy seulement
- Mis sur différents milieux solides
 - Milieu minimal (ESM) avec et sans vitamine
 - TSA, R2A
 - Mes : E1, E2, E3 et EE2
- Isolats cultivés sur milieu riche (TSB) avec E1, E2, E3 et EE2 pour 4 jours.

Affiliation des souches isolées de l'enrichissement AHy

Nom	Affiliation		Identity (%)
EMS-1, ESM-V3	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobacteria	97-99
ESM-V1A	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes	99
R2A-4	<i>Microbacterium schleiferi</i>	Actinobacteria	98
R2A-5	<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	γ -proteobacteria	93
TSA-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Firmicutes	99
TSA-7	<i>Pusillimonas noertemannii</i>	β -proteobacteria	96

Affiliation basée sur leur séquence 16S ARNr.

Seule la souche EMS-1 a montré une dégradation significative des E1, E2 et E3 (EE2 non dégradé) en 4 jours

Discussion

- Le polymère Hytrel est un bon matériel dans le développement d'un système à deux phases immiscibles pour la concentration et la dégradation des MEs.
- Hytrel fournit une source de carbone inconnue => *Hyphomicrobium*, *Rhodanobacter*, *Microbacterium*
 - Hytrel n'a pas semblé être affecté
 - Étude à long terme requise
- MEs trappés dans l'Hytrel sont dégradés dans les enrichissements
 - Tous sauf le EE2. Pouvoir estrogénique.

Discussion

- *Novosphingobium* et *Sphingomonas*
 - Dégradation des MEs
- Essais sur eaux usées a permis l'extraction de MEs
- Potentiel de développer un bioprocédé à deux phases immiscibles comme traitement secondaire ou tertiaire à des usines de traitement des eaux usées.

Biotraitement d'un effluent minier aurifère pour la dégradation du thiocyanate

- Richard Villemur, Julie Ménard, Véronique Bougie, Pierre Juteau, Eric Déziel

Problématique

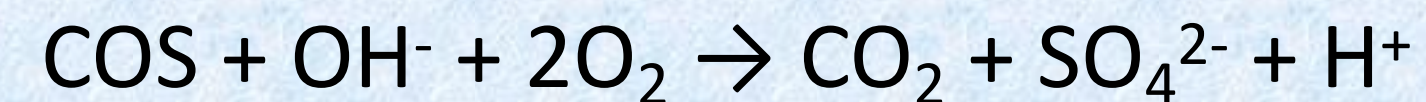
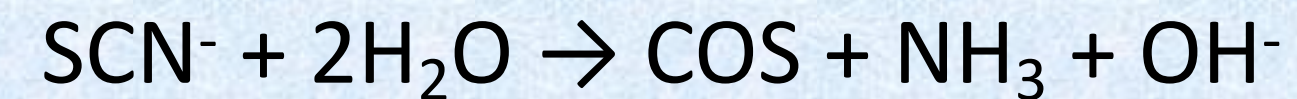
- Cyanuration est un procédé dans lequel l'or est dissous par des solutions aqueuses de cyanure (CN^-).
 - Il reste l'approche la plus rentable d'extraction de l'or.
- Le thiocyanate (SCN^-) est formé en tant que sous-produit de ce processus grâce à l'interaction du CN et du soufre présent dans les minerais, résultant en un grand volume d'eaux usées fortement contaminées par le SCN^- .
- Les procédés d'oxydation chimiques sont généralement utilisés pour transformer CN^- en cyanate (OCN^-), ce qui est moins toxique que le cyanure, mais à forte concentration est toxique.

Problématique

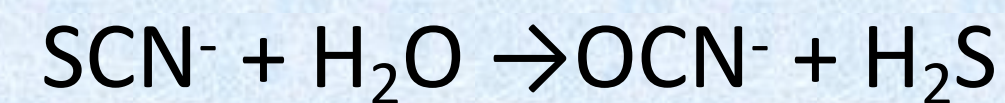
- Des traitements supplémentaires pour l'élimination de ces molécules sont nécessaires.
- Le traitement biologique est une option valable.
- De nombreuses souches bactériennes ont été isolées pour leur utilisation du SCN et OCN comme seule source de carbone et/ou d'azote et/ou d'énergie.

Voies métaboliques de biodégradation du thiocyanate et cyanate

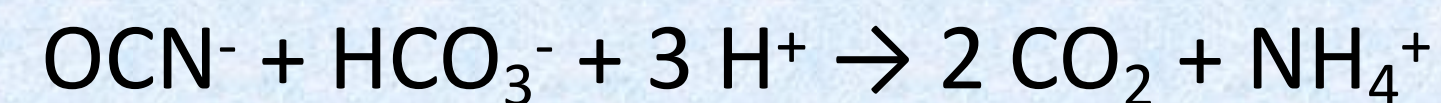
La voie du sulfure de carbone (COS) est catalysée par l'enzyme hydrolase qui transforme le SCN en sulfure de carbone, et ensuite en sulfate :



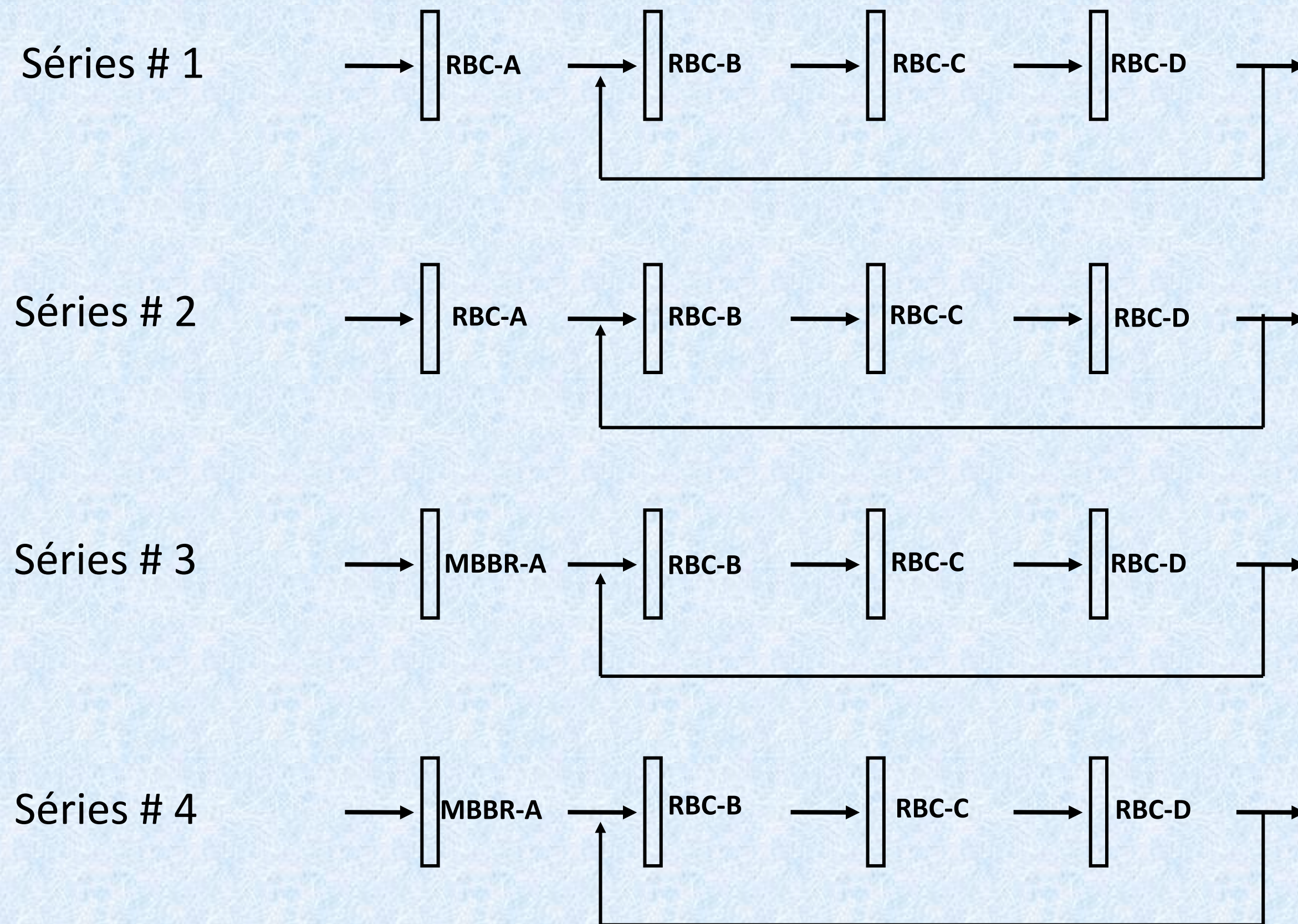
SCN⁻ peut également être hydrolysé par l'intermédiaire de la voie de cyanate :



Cyanate peut être dégradé en bicarbonate via carbamate au moyen d'une cyanase et l'anhydrase carbonique :



Traitement biologique des eaux cyanurées d'une mine aurifère



Réacteur A : $\text{SCN}^- \rightarrow \text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{SO}_4^{2-}$

Réacteurs B, C, D : $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_3$ (nitrification)

Bioréacteurs de type « Rotating Biological Contactors » (RBC)



Problématique

- Peu d'information sur la flore bactérienne impliquée dans les procédés à grande échelle.
- Problèmes mécaniques reliés à l'opération à long terme des RBCs.
- Inhibition de la nitrification par l'ammonium.

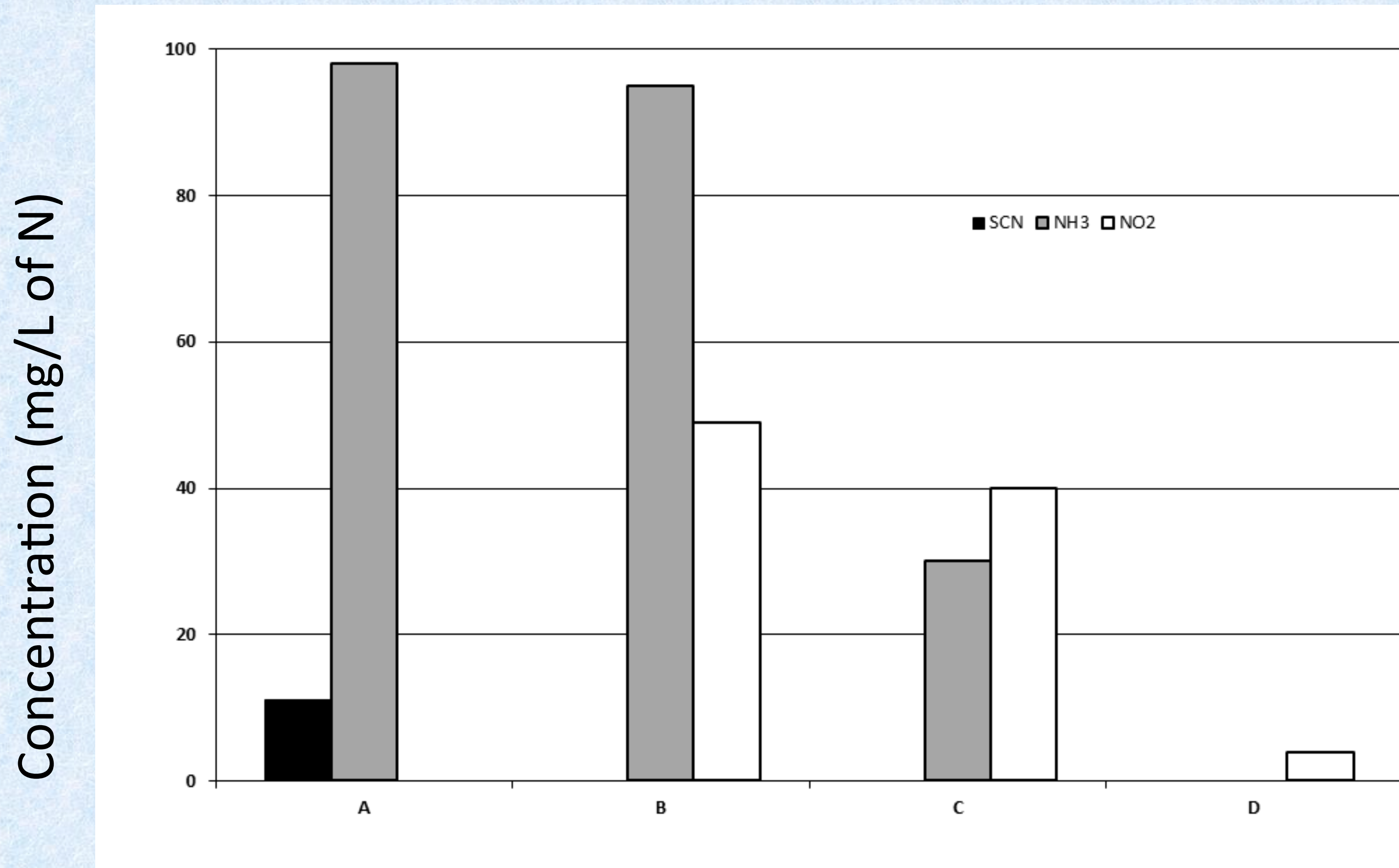
Objectifs généraux

- Déterminer la composition de flore bactérienne du procédé à grande échelle.
- Développer un procédé en laboratoire avec des réacteurs de type Moving Bed Biofilm Reactors (MBBRs).

Déterminer la composition de la flore bactérienne du procédé à grande échelle

- Échantillonnage des RBCs
- Extraction de l'ADN total
- Amplification PCR des gènes de l'ARNr 16S
- Profils bactériens des RBCs par DGGE
- Génothèques des gènes de l'ARNr 16S
- Affiliation des bactéries en présence
- Enrichissements microbiens pour la dégradation du SCN et OCN
- Isolement des souches utilisant le SCN et/ou le OCN comme seule source de carbone

Performance des RBCs lors de l'échantillonnage



Enrichissements microbiens pour la dégradation du SCN et OCN

- Biomasse du RBC A (dégradation du SCN/OCN)
- Milieu minimal avec SCN ou OCN comme seule source de carbone
- Repiquage sur plusieurs mois
- Analyses de la dégradation du SCN et OCN
- Composition bactérienne par génothèques des gènes de l'ARNr 16S

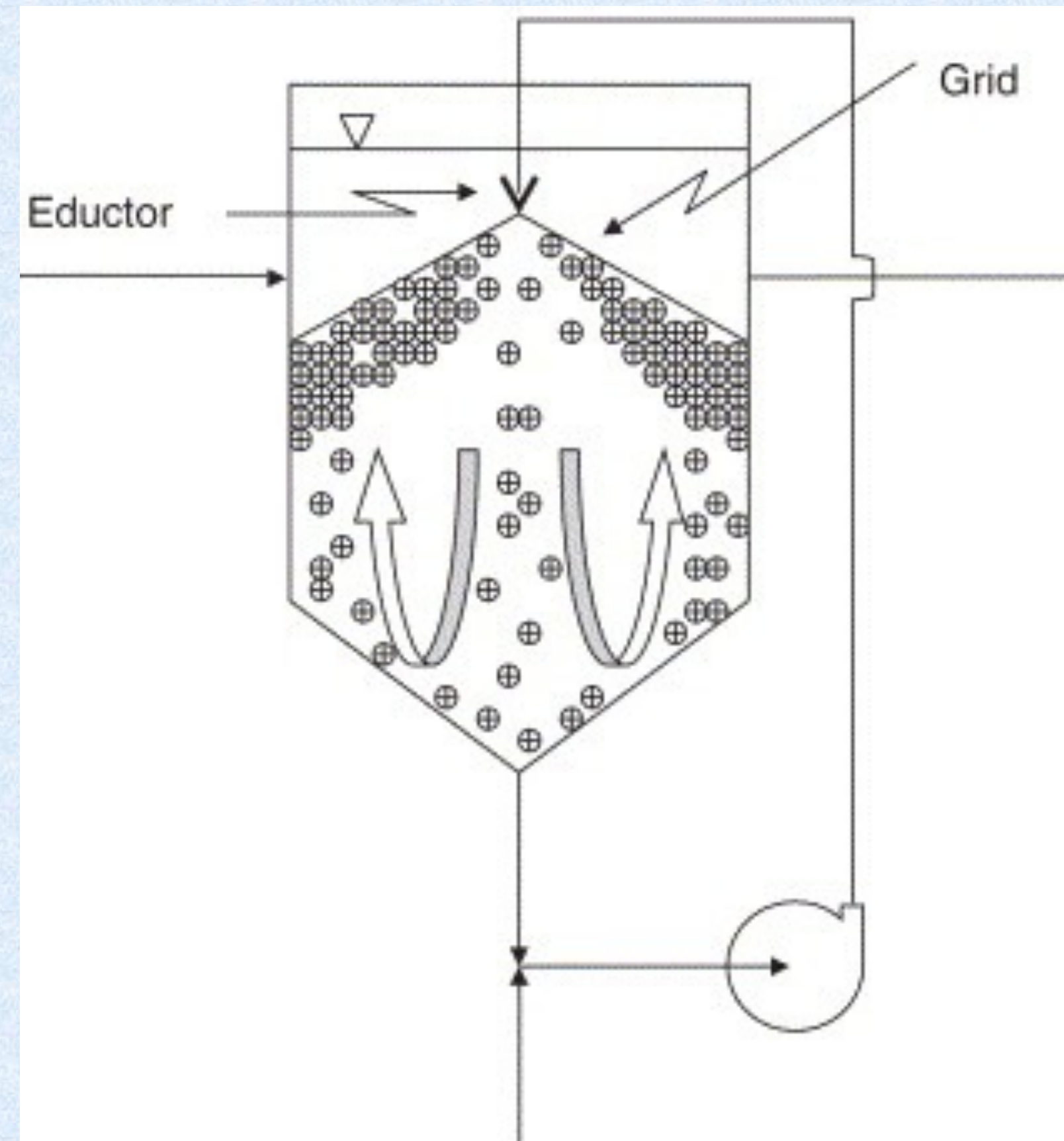
Isolement de souches dégradant le SCN et le OCN

- Dispersion de la biomasse sur divers milieux, riches ou minimaux, avec le SCN ou le OCN comme seule source de carbone
- Plus de 200 isolats examinés
- Seule la souche JM695 affiliée au genre *Sphingopyxis* a utilisé le OCN comme seule source de carbone

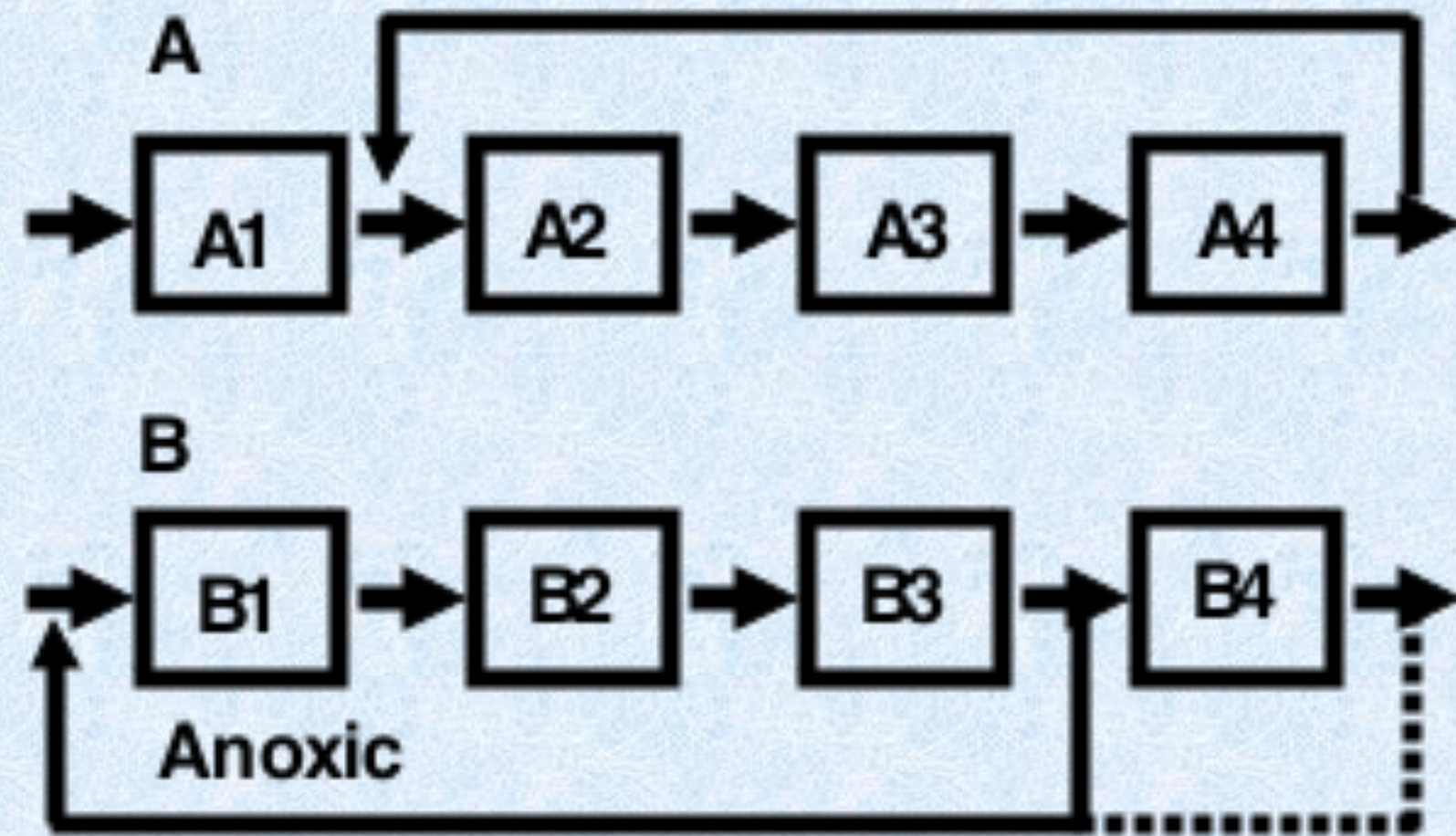
Développement d'un procédé en laboratoire avec des réacteurs de type Moving Bed Biofilm Reactors (MBBRs)

- Objectifs :
 - Explorer la faisabilité de remplacer les RBC par des réacteurs de type MBBRs.
 - Trouver un mode opératoire pour éviter l'inhibition de la nitrification par l'ammonium.
 - Développer une filière dénitrifiante pour éliminer l'azote total de l'effluent.

Moving Bed Biofilm Reactors (MBBRs)



Configuration



Discussion

- Composition des RBCs
 - Le premier réacteur dominé par des bactéries oxydantes du soufre telles les *Thiobacillus*
 - Évolution des 3 autres RBCs vers des proportions plus importantes de bactéries nitrifiantes telles *Nitrospira*

Discussion

- Les essais à l'échelle laboratoire laissent présager un remplacement des RBCs par des MBBRs.
- La performance doit toutefois être plus élevée.
- Le réacteur A opéré en conditions dénitrifiantes a permis l'élimination d'une plus grande quantité d'azote de l'effluent.
- La composition de la flore bactérienne a montré l'implication de bactéries de type anammox dans l'élimination du nitrite et de l'ammomium du système.

Potentiel pathogénique

- Aucun (ou très peu) pathogène retrouvé dans les procédés étudiés
- Important que les processus de dégradation soient complets
 - Nitrate => N_2 et non au N_2O
 - Ammonium n'inhibe pas la nitrification
 - Polluants organiques ne forment pas des intermédiaires plus toxiques