

# Étude des *Bifidobacterium* comme indicateur des sources diffuses de pollution

Par

ALEXANDRE ABELLA

Mémoire

Présenté à l'INRS-Institut Armand-Frappier

Comme exigence partielle du programme de maîtrise en microbiologie appliquée

Avril 2006

Direction : Pierre Payment

Codirection : Richard Villemur

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	II
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	IX
LISTES DES GRAPHIQUES.....	X
LISTES DES ABRÉVIATIONS .....	XI
RÉSUMÉ .....	1
INTRODUCTION .....	3
REVUE DE LITTÉRATURE.....	6
1 L'EAU.....	6
1.1 La contamination de l'eau au Québec.....	6
1.2 La contamination des eaux par de la matière fécale .....	6
1.2.1 La contamination fécale en zone urbaine.....	7
1.2.2 La contamination fécale en zone agricole.....	7
1.2.3 Pollution fécale diffuse et ponctuelle des cours d'eaux .....	8
1.2.3.1 Microorganismes retrouvés dans la matière fécale .....	8
1.2.3.2 Les paramètres faisant varier la concentration des pathogènes dans l'eau ...	10
1.2.3.3 Les risques pour la santé associés à une contamination fécale de l'eau .....	11
1.3 Le rôle de l'eau dans la transmission de maladies .....	11
1.4 Politique nationale de l'eau (PNE) du Québec .....	14
1.5 Les microorganismes indicateurs d'une contamination fécale de l'eau.....	16
1.5.1 Les caractéristiques et utilités d'un indicateur microbien d'une contamination fécale de l'eau .....	16
1.5.2 Les indicateurs microbiens d'une contamination fécale de l'eau .....	17
1.5.2.1 Les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHAA) ....	17
1.5.2.2 Les bactéries coliformes.....	17
1.5.2.3 Les coliformes totaux.....	18
1.5.2.4 Les coliformes fécaux (thermotolérants) .....	18
1.5.2.5 <i>Escherichia coli</i> .....	19
1.5.2.6 Streptocoques ou enterocoques fécaux .....	19
1.5.2.7 <i>Clostridium perfringens</i> .....	20

1.5.2.8 Les phages utilisés comme indicateurs d'une pollution fécale de l'eau .....	20
1.6 Le suivi des sources microbiennes et pathogènes dans les écosystèmes aquatiques .....	21
1.6.1 Méthodes moléculaires de suivi .....	24
1.6.1.1 Le ribotypage .....	25
1.6.1.2 Électrophorèse en champ pulsé (PFGE) .....	25
1.6.1.3 L'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) .....	26
1.6.1.4 L'amplification en chaîne par polymérase de certaines régions répétitives (Rep-PCR).....	26
1.6.1.5 PCR-RFLP (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) .....	27
1.6.2 Méthodes non-moléculaires (phénotype).....	27
1.6.2.1 L'analyse de la résistance bactérienne («Antibiotic resistance analysis»; ARA).....	27
1.6.3 Le constat des différentes méthodes de suivi des sources microbiennes et pathogènes dans les écosystèmes aquatiques.....	27
1.6.4 Le choix d'une méthode de suivi .....	28
2 LA FLORE INTESTINALE.....	30
2.1 <i>Bifidobacterium</i> .....	30
2.1.1 Description générale de <i>Bifidobacterium</i> .....	30
2.1.2 Les sources de carbone, d'énergie et les voies métaboliques chez <i>Bifidobacterium</i>	31
2.1.3 Les méthodes classiques de culture.....	32
2.1.3.1 Les besoins nutritionnels.....	32
2.1.3.2 Les facteurs de croissance .....	32
2.1.3.3 La sensibilité aux antibiotiques.....	32
2.1.3.4 Les milieux de croissance .....	33
2.1.4 Le pouvoir pathogène de <i>Bifidobacterium</i> .....	35
2.2 Le devenir de <i>Bifidobacterium</i> dans l'eau .....	35
2.3 Utilisation de <i>Bifidobacterium</i> comme un indicateur d'une pollution fécale et permettant l'identification de la source contaminante .....	36
2.3.1 Historique.....	36
2.3.2 Critères d'un indicateur utilisé dans le suivi des sources microbiennes et pathogènes dans les écosystèmes aquatiques.....	37

2.3.3	Utilisation de <i>Bifidobacterium</i> permettant l'identification la source de contamination fécale .....	37
2.3.4	L'état des connaissances sur l'utilisation de <i>Bifidobacterium</i> dans le suivi des sources microbiennes et pathogènes de contamination dans les écosystèmes aquatiques.....	38
2.3.5	Identification de <i>Bifidobacterium</i> .....	38
2.3.5.1	Identification biochimique du genre <i>Bifidobacterium</i> .....	39
2.3.5.2	Identification moléculaire du genre <i>Bifidobacterium</i> .....	39
2.3.5.3	Identification des espèces de <i>Bifidobacterium</i> .....	41
3	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	42
3.1	Microorganismes utilisés.....	42
3.2	Le milieu de culture utilisé pour la lyophilisation .....	42
3.2.1	Lyophilisation des souches pures de <i>Bifidobacterium</i> .....	42
3.2.2	Préparation des cultures pures pour la lyophilisation .....	43
3.2.3	Lyophilisation des cultures pures.....	43
3.2.4	Tests de pureté.....	43
3.2.5	Congélation des souches pures de <i>Bifidobacterium</i> provenant de l'ATCC.....	44
3.2.6	Le milieu de culture utilisé pour la congélation et pour les manipulations de routine .....	44
3.3	Les milieux de croissance évalués pour <i>Bifidobacterium</i> .....	44
3.3.1	Préparation des milieux solides (gélés) .....	44
3.3.1.1	Le milieu commercial RCM.....	45
3.3.1.2	Les milieux ayant pour base le mélange commercial MRS .....	45
3.3.1.3	Le milieu BFM.....	45
3.3.2	Culture des milieux gélosés en anaérobiose.....	46
3.3.3	Préparation des milieux liquides de culture .....	46
3.3.4	Préparation de tubes anaérobies de MRS et RCM .....	46
3.3.5	Préparation de bouteilles de sérum anaérobies contenant le milieu MRS .....	46
3.3.6	Évaluation des milieux face à la croissance de <i>Bifidobacterium</i> .....	47
3.4	Évaluation de l'effet d'une filtration sur la survie de <i>Bifidobacterium</i> .....	48
3.5	Sélectivité des milieux de culture .....	48

3.6 Vérification de la sélectivité reliée à la température d'incubation.....	48
3.7 Mesure de la décroissance de <i>B. adolescentis</i> et de <i>B. animalis</i> .....	49
3.7.1 Décroissance en conditions aérobies .....	49
3.7.2 Décroissance en conditions anaérobies.....	50
3.8 Biologie moléculaire .....	50
3.8.1 Lieux d'échantillonnage.....	50
3.8.1.1 Bassin versant de la rivière l'Assomption.....	51
3.8.1.2 La rivière des Prairies.....	52
3.8.2 Méthode d'échantillonnage.....	52
3.8.3 Dates d'échantillonnage.....	52
3.8.4 Transport des échantillons d'eau.....	53
3.8.5 Méthodes de filtration .....	53
3.8.6 Culture des souches bactériennes isolées de cours d'eau.....	53
3.8.7 Culture différentielle basée sur la température visant les espèces animales.....	53
3.9 Extraction de l'ADN génomique des isolats de rivières .....	54
3.9.1 Le broyage des cellules bactériennes .....	54
3.9.2 L'enlèvement des impuretés .....	54
3.9.3 La précipitation de l'ADN .....	55
3.9.4 Dosage de l'ADN et dilution de l'ADN génomique.....	55
3.10 Réaction en chaîne par polymérase sur les isolats de rivière.....	56
3.10.1 Les amorces utilisées .....	56
3.10.2 Les réactifs utilisés.....	56
3.10.3 Les programmes d'amplification .....	56
3.10.4 Migration sur gel des produits de PCR et de digestion enzymatique .....	56
3.10.4.1 Préparation du gel d'agarose.....	56
3.10.4.2 Volume déposé sur gel d'agarose .....	56
3.10.4.3 Conditions d'électrophorèse.....	57
3.11 PCR-RFLP «Random fragment length polymorphism» .....	57
3.11.1 Séquençage des isolats inconnus provenant des rivières .....	57

4	RÉSULTATS .....	58
4.1	L'évaluation de la croissance de <i>Bifidobacterium</i> sur divers milieux .....	58
4.2	La sélectivité des milieux.....	60
4.3	L'effet d'une filtration sur le nombre de <i>Bifidobacterium</i> .....	61
4.4	Le taux de survie de <i>Bifidobacterium</i> .....	62
4.4.1	Mesure du taux de survie <i>B. adolescentis</i> en aérobiose.....	62
4.4.2	Mesure du taux de survie <i>B. animalis</i> en aérobiose.....	63
4.4.3	Mesure du taux de survie <i>B. animalis</i> en anaérobiose .....	63
4.5	L'identification de bactéries provenant des rivières L'Assomption, des Prairies et Achigan .....	64
4.6	Recherche de bifidobactéries cultivables de type animal dans les rivières .....	66
4.6.1	Utilisation de la température d'incubation pour la sélection des espèces de bifidobactéries de type animal sur des colonies provenant des rivières Achigan, l'Assomption et du ruisseau St-Jean .....	67
5	DISCUSSION .....	68
5.1	La sélectivité des milieux .....	69
5.2	Extraction de l'ADN génomique des colonies isolées.....	71
5.3	Les espèces retrouvées sur BFM à partir d'échantillons de rivières.....	72
5.3.1	Les espèces appartenant au genre <i>Bifidobacterium</i> .....	72
5.3.2	Les autres espèces isolées sur le milieu BFM.....	73
5.4	La survie de <i>Bifidobacterium</i> dans l'eau.....	74
5.4.1	Survie de <i>B. adolescentis</i> en présence d'oxygène.....	75
5.4.2	Survie de <i>B. animalis</i> en présence et en absence d'oxygène .....	75
5.4.2.1	Les faiblesses du milieu BFM.....	76
5.4.2.2	La faible concentration de bifidobactéries provenant de fèces animales.....	77
	CONCLUSION .....	78
	REMERCIEMENTS .....	80

ANNEXES .....	81
Annexe A : Composition et conditions de stérilisation des milieux utilisés .....	82
Annexe B : Marqueurs de poids moléculaires utilisés .....	83
Annexe C : Listes des amorces utilisées dans la confirmation du genre et des espèces de <i>Bifidobacterium</i> .....	84
Annexe D : Extraction d'ADN et Réaction PCR .....	85
Annexe E : Programmes d'amplification utilisés.....	86
Annexe F : Séquences des bactéries isolées des cours d'eau (seules les bifidobactéries ont été traitées par le logiciel CHROMAS, Technelysium version 2.3) et comparées à la banque de données du NCBI.....	87
Annexe G : Résumé de l'identification des 141 colonies de cette étude.....	141
Annexe H : Liste d'amorces utilisées dans l'identification moléculaire de <i>Bifidobacterium</i> .....	146
Annexe I : Liste de sondes utilisées dans l'identification moléculaire de de de <i>Bifidobacterium</i> .....	148
Annexe J : Patron de digestion avec Sau 3AI des colonies isolées des différents sites d'échantillonnage non-identifiées par PCR multiplexe .....	150
Annexe K : Photo des différents sites d'échantillonnage .....	153
Annexe L : Croissance de <i>Bifidobacterium</i> sur divers milieux. ....	157
Annexe M : Effet du milieu de culture et de la filtration sur <i>Bifidobacterium</i> .....	158
 BIBLIOGRAPHIE.....	 159

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Principaux microorganismes pathogènes à l'origine de maladies d'origine hydrique (WHO, 2003).....	10
Tableau 2 :	Maladies d'origine hydrique les plus communes.....	13
Tableau 3 :	Avantages et désavantages des principales méthodes de suivi des sources microbiennes de pollution fécale .....	29
Tableau 4:	Milieus utilisés dans la culture de <i>Bifidobacterium</i> .....	34
Tableau 5 :	Test biochimique permettant l'identification des espèces de <i>Bifidobacterium</i> .....	41
Tableau 6 :	Les souches de bactéries de la microbiote gastro-intestinale étudiées ainsi que leur provenance .....	42
Tableau 7 :	Localisation des sites d'échantillonnage.....	51
Tableau 8 :	Caractéristiques des moments d'échantillonnage .....	52
Tableau 9 :	Comportement des milieux de culture face à un échantillon environnemental d'eau .....	60
Tableau 10 :	Répartition des espèces selon le site d'échantillonnage .....	65
Tableau 11 :	Test de croissance à une température d'incubation de .....	66
	37°C, 45°C et 46°C chez les espèces de <i>Bifidobacterium</i>	



## **LISTES DES FIGURES**

Figure 1 : Incidence des principales maladies d'origine hydrique au Canada .....22

Figure 2 : Effets des antibiotiques sur *Bifidobacterium*.....33

## LISTES DES GRAPHIQUES

Graphique 1 : Effet du milieu de culture sur <i>Bifidobacterium</i> .....	59
Graphique 2 : Perte d'UFC chez <i>Bifidobacterium</i> suite à une filtration.....	61
Graphique 3 : Survie de <i>B. adolescentis</i> en présence d'oxygène .....	62
Graphique 4 : Survie de <i>B. animalis</i> en présence d'oxygène .....	63
Graphique 5 : Survie de <i>B. animalis</i> en absence d'oxygène.....	64

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	: acide désoxyribonucléotidique
ARA	: analyse de la résistance bactérienne
ARN	: acide ribonucléique
ATCC	: american type culture collection
BHAA	: bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives
BST	: bacterial source tracking
CST	: chemical source tracking
DGGE	: denaturing gradient gel electrophoresis
DP	: drop plate method
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EPA	: environmental protection agency
FM	: filtration sur membrane
FOS	: fructo-oligo-saccharides
MRS	: De Man-Rogosa-Sharpe
NCBI	: national center for biotechnology information
OMS (WHO)	: organisation mondiale de la santé
P-A	: présence-absence
PCR	: polymerase chain reaction
PFGE	: pulsed field gel electrophoresis
RAPD	: random amplification of polymorphic DNA
RCA	: reinforced Clostridial agar
REP	: repetitive extragenic palindromic
REP-PCR	: amplification en chaine par polymérase de certaines régions répétitives
RPM	: rotations par minute
TGI	: tractus gastro-intestinal
TMDL	: total maximum daily load
UFC	: unités formants des colonies

## RÉSUMÉ

Le risque que représentent les maladies microbiennes associées à l'eau est, à l'heure actuelle, une priorité pour les autorités responsables de la gestion de cette ressource. Un grand nombre de ces maladies sont causées par la présence de pathogènes (bactéries, virus, protozoaires) d'origine fécale dans l'eau. Ces pathogènes menacent les approvisionnements en eau potable, les eaux récréatives, les eaux servant à l'agriculture et à l'aquaculture ainsi que les écosystèmes aquatiques.

Historiquement, la qualité microbiologique de l'eau a été évaluée à l'aide d'un groupe restreint de microorganismes indicateurs. L'utilisation de ces microbes a notamment permis d'éradiquer plusieurs maladies. L'émergence d'épisodes tragiques de contamination hydrique ces dernières années remet en question l'utilisation seule des indicateurs microbiologiques afin d'assurer la qualité de l'eau. L'évolution des connaissances montre l'importance d'assurer un approvisionnement de qualité, ce qui constitue une manière préventive de contrer l'entrée massive de contaminants dans les réseaux d'eau potable. La possibilité d'identifier la provenance des contaminants fécaux souvent porteurs de pathogènes devrait améliorer, au point de vue microbiologique, la qualité de la ressource. Pour ce faire, de nouveaux indicateurs sont développés afin de mieux déterminer l'origine de la contamination fécale de l'eau.

À cette fin, le genre *Bifidobacterium* a été proposé comme un indicateur permettant la différenciation des sources de contamination fécale de l'eau. Cette capacité de différenciation se base sur le cloisonnement des espèces de bifidobactéries selon l'hôte colonisé. Ainsi, l'origine de la contamination fécale peut être retracée à partir des espèces retrouvées dans le cours d'eau.

Ce projet de maîtrise a permis de montrer la présence de bifidobactéries à l'état cultivable dans quatre cours d'eau québécois situés en zone urbaine et en zone agricole. L'isolement des bifidobactéries à partir des cours d'eau a été fait par filtration suivie d'une croissance en anaérobiose sur le milieu BFM. L'utilisation de réactions en chaîne par polymérase (PCR multiplexe) et du séquençage a permis d'identifier 5 espèces de *Bifidobacterium* présentes à l'état cultivable dans les cours d'eau soit : *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. angulatum* et *B. pseudocatenulatum*.

Ce projet a aussi mesuré l'impact de certains facteurs abiotiques sur la survie de *Bifidobacterium*. Ceci avait pour but d'expliquer l'absence de bifidobactéries généralement associées aux animaux dans les cours d'eau situés en zone agricole. À ce sujet, la présence de matière organique (surnageant de lisier) et l'absence de mouvement de brassage de l'eau, conditions souvent rencontrées dans les cours d'eau en zone agricole, font varier la longévité, à l'état cultivable, des bifidobactéries. La poursuite d'études plus approfondies sur le devenir des bifidobactéries une fois excrétées et sur la distribution des espèces selon l'hôte paraît essentielle afin de déterminer l'avenir de *Bifidobacterium* comme un indicateur des différentes sources de contamination fécale des cours d'eau.

---

Alexandre Abella  
Étudiant

---

Pierre Payment  
Directeur de recherche

## INTRODUCTION

L'augmentation des populations, l'intensification de l'agriculture et les changements climatiques (Rose et al., 2001) viennent compromettre l'intégrité naturelle des écosystèmes. L'eau, essentielle à la vie, est une ressource très touchée par ces changements. La présence anormale de pathogènes fécaux dans la plupart des cours d'eau sous influence humaine représente un risque important pour la santé des populations. Les récents épisodes tragiques de maladies hydriques (*E. coli* : Walkerton, Canada 2000; *Cryptosporidium*: Milwaukee, É-U; virus entérique : Uggelose, Danemark) montrent à quel point les pratiques actuelles de gestion possèdent des lacunes quand il s'agit d'assurer la distribution en quantité suffisante d'une eau sûre, propre et fiable.

Il aura fallu attendre le début du 20<sup>e</sup> siècle pour voir les premières études épidémiologiques mettre en évidence la corrélation entre des épidémies d'origine hydrique et la consommation d'eau potable. De ce fait, la mise en place de systèmes de filtration et de chloration de l'eau a permis d'enrayer la plupart des maladies bactériennes d'origine hydrique qui provoquaient des épidémies telles que le choléra, la fièvre typhoïde, la shigellose, la salmonellose et la dysenterie (Hairston et al., 1997; Leclerc, 2003).

Le développement et l'usage de marqueurs ou indicateurs microbiens se sont vite révélés indispensables et complémentaires afin de garantir la salubrité de l'eau et l'efficacité des traitements. En ce sens, la microbiologie, via la mesure de certains microorganismes (coliformes), a permis d'établir les normes minimales de qualité que devrait avoir une eau selon son usage.

La qualité de l'eau et son traitement en vue de la rendre potable varient d'un pays à l'autre selon l'application des politiques environnementales en vigueur et les moyens financiers disponibles de ce pays. La protection et le maintien de la qualité (physique, chimique et microbienne) des approvisionnements (eau de surface, eau souterraine) deviennent alors une nécessité.

Afin de garantir la qualité des approvisionnements, plusieurs pays ont adopté des mesures législatives et ont mis en place des installations (raccordement des résidences et des entreprises à un réseau d'égout, assainissement des eaux usées) et des programmes de surveillance garantissant la salubrité des eaux rejetées en milieu naturel.

À l'heure actuelle, le suivi de la qualité de l'eau est fait sur une base chimique (nitrate, phosphore, etc.), physique (turbidité) et microbiologique (*Escherichia coli*, coliformes thermotolérants). Les tests microbiologiques mesurent la présence de certains microorganismes intestinaux considérés comme des indicateurs d'une possible contamination fécale de l'eau et d'une probabilité élevée d'y retrouver des pathogènes. L'utilisation de ces indicateurs possède par contre ses limites, notamment sur le plan de la différenciation des sources de contamination fécale. Les recherches portent désormais sur de nouveaux indicateurs en mesure de différencier les sources de contamination de l'eau.

Ces dernières années, l'évolution des connaissances a permis de démontrer qu'il existe des spécificités chez les espèces bactériennes qui colonisent la flore intestinale des organismes et que certains dérivés métaboliques ainsi que plusieurs molécules chimiques sont souvent associés étroitement aux organismes (Shell et al., 2002) ou à leurs activités. De nouvelles approches inspirées de ces informations permettent d'espérer qu'un jour les sources de contamination fécale des eaux pourront être différenciées.

Des études confirment la présence de fortes concentrations de microorganismes fécaux dans les grandes rivières québécoises. Ce phénomène est particulièrement préoccupant dans les cours d'eau à proximité de grandes villes ou en territoires agricoles. Il existe plusieurs sources de contamination fécale des eaux possibles pour ces différentes localisations.

Au Québec, la qualité des eaux est principalement compromise par l'effluent des usines d'épuration et le débordement des réseaux unitaires lorsque l'entrée d'eau surpasse la

capacité d'assainissement des installations. Le lessivage des surfaces urbaines et des terres agricoles fertilisées avec des engrais organiques (fumiers, lisiers, boues), les fortes densités d'élevages d'animaux, les décharges municipales et les fosses septiques inadéquates ou inopérantes peuvent aussi contribuer à la contamination fécale des eaux.

La présence de microorganismes entériques dans l'eau suggère la possibilité d'y retrouver des pathogènes fécaux (bactéries, protozoaires, virus). Ces microorganismes pathogènes représentent un danger direct et important pour la santé humaine. Actuellement, seuls *Escherichia coli* et le groupe des bactéries coliformes totaux sont utilisés comme indicateurs de la qualité microbienne de l'eau. Ces indicateurs ne peuvent par contre pas révéler si l'origine de la pollution est humaine ou animale.

La détection de *Bifidobacterium* dans les cours d'eau a pour but de déterminer l'origine de la contamination fécale de l'eau. La littérature actuelle témoigne d'une distribution organisée des espèces de bifidobactéries selon l'organisme colonisé. Ce projet de recherche vise donc à développer une technique innovatrice d'investigation des sources de pollution fécale dans les eaux en utilisant un type de bactéries étroitement lié à la matière fécale, soit *Bifidobacterium*, afin de pallier aux autres indicateurs limités jusqu'ici à déterminer s'il existe ou non une possible contamination fécale de l'eau.

Ce projet de maîtrise visait deux objectifs principaux soit de vérifier la présence de *Bifidobacterium* dans les cours d'eau québécois puis d'identifier par la suite les espèces de *Bifidobacterium* en présence.



## REVUE DE LITTÉRATURE

### 1 L'EAU

L'eau comme l'air est source de vie, de bien-être et de santé. Un contrôle adéquat de la qualité de cette eau permet d'assurer la bonne santé des populations et des écosystèmes. De toutes les utilisations de l'eau, l'eau potable reste celle ayant l'incidence la plus directe sur les populations. La place essentielle que prend l'eau dans l'ensemble des activités humaines la rend sujette à plusieurs types de pollution. Suite à la baisse de l'intégrité de la ressource, l'état des divers écosystèmes et la santé des populations sont remis en questions. En 2003, alors qu'au Québec on se permet d'utiliser d'énormes quantités d'eau potable afin d'évacuer nos déchets fécaux, un habitant de la planète sur cinq (1,2 milliards) n'y a pas encore accès. De plus, 3 milliards d'individus ne bénéficient toujours pas d'un système sanitaire pour l'évacuation de leurs eaux usées. Conséquence fatale: 3,4 millions d'êtres humains, dont la moitié sont des enfants, meurent chaque année de maladies liées à l'eau. Parmi ces maladies, les plus meurtrières sont la diarrhée (2,21 millions de victimes), la malaria (1,11 million), la trypanosomiase, les infections par vers intestinaux, la dengue et la bilharziose (WHO, 2003a).

#### 1.1 La contamination de l'eau au Québec

Au Québec, la contamination de l'eau provient essentiellement des centres urbains, des secteurs d'activités agricoles et industrielles et, dans certains cas, de la faune indigène. Cette contamination peut être de nature physique (température, pH), chimique (métaux, produits de synthèse, matière organique) et microbienne (bactéries, virus et protozoaires fécaux).

#### 1.2 La contamination des eaux par de la matière fécale

L'ensemble des eaux de surface, des eaux souterraines (Atherholt et *al.*, 2003) et des puits d'alimentation en eau potable (Centers for Disease Control and Prevention National Center for Environmental Health, 2002) est vulnérable à l'introduction de contaminants fécaux. L'introduction de matière fécale dans l'eau occasionne une dégradation indirecte de l'eau potable et augmente les risques pour la santé humaine. Ce

type de pollution entraîne aussi des dommages aux écosystèmes aquatiques, provoque la perte de revenus commerciaux provenant de l'industrie de la pêche, afflige certaines nations s'alimentant en grande partie des produits de la pêche, diminue les sites de baignade causant un impact considérable sur l'industrie touristique, affecte la qualité esthétique des lacs et des cours d'eau, augmente les dépenses allouées à l'environnement et, finalement, dévalue la valeur des territoires avoisinant les sites contaminés (Government of British Columbia, 2001).

Au Québec, la contamination fécale des cours d'eau varie selon la densité et les activités humaine et animale (domestique ou sauvage), la géographie et l'hydrogéologie du territoire. Les concentrations de coliformes (témoin d'une contamination fécale) sont surtout retrouvées près de l'exutoire des grandes rivières ou à proximité des grands centres urbains. L'origine de cette pollution semble surtout être d'origine urbaine (Atlas sur l'état de l'environnement au Québec, 2005a) et est souvent liée aux rejets d'eaux usées non désinfectées ou aux débordements des réseaux d'égout en temps de pluie.

### **1.2.1 La contamination fécale en zone urbaine**

Le lessivage des zones urbaines durant les épisodes de grande pluie constitue l'évènement le plus problématique de contamination fécale des cours d'eau en zones urbaines. Dans ce genre de situations, les systèmes de traitement des eaux usées ne peuvent parvenir à traiter les quantités massives d'eau provenant des réseaux d'égout unitaire. La portion non-traitée est alors rejetée directement dans les cours d'eau (Atlas sur l'état de l'environnement au Québec, 2005b). Cette eau rejetée transporte une quantité importante de pathogènes entériques (Lechevallier et *al.*, 1991).

### **1.2.2 La contamination fécale en zone agricole**

En milieu agricole, le lessivage et la percolation des terres fertilisées par des engrais organiques (lisiers, fumiers liquides, fumiers solides) faits dans de mauvaises conditions (temps pluvieux, terrain en pente, surdose, proximité de puits d'eau potable) et la forte densité d'animaux d'élevage représentent les principales sources de contamination fécale des eaux (Mawdsley et *al.*, 1995).

### **1.2.3 Pollution fécale diffuse et ponctuelle des cours d'eaux**

Il existe deux types de pollution fécale des cours d'eau soit celle diffuse et celle ponctuelle. Une pollution diffuse se définit comme étant une pollution due non pas à des rejets ponctuels et identifiables, mais à des rejets issus de toute la surface d'un territoire et transmis aux milieux aquatiques de façon indirecte, par ou à travers le sol, sous l'influence de la force d'entraînement des eaux en provenance des précipitations ou des pratiques d'irrigation. Elle ne vient donc pas d'un endroit précis, mais plutôt de plusieurs sources différentes. À titre d'exemple, la fertilisation organique sur de grandes surfaces cultivées peut être à l'origine d'une pollution diffuse, soit par entraînement des particules (fumier), soit par drainage (lisier) des matières fertilisantes dans les cours d'eaux (Réseau des données sur l'Eau du Bassin Rhône Méditerranée Corse, 2005; St-Laurent Vision 2000, 1997). La pollution diffuse est facilement mesurable, mais plus difficilement contrôlable, étant donné les sources variées de contamination.

Une pollution ponctuelle est communément définie comme étant une pollution émanant d'un lieu précis pouvant être facilement identifié. Par exemple, ce lieu peut être une installation agroalimentaire industrielle (abattoirs, usines d'équarrissage), une station municipale d'épuration des eaux usées, une sortie d'égout, une structure d'entreposage de fumier ayant un bris ou encore un endroit où a eu lieu un accident d'épandage. (South Dakota Department of Environment & Natural Resources, 2004).

#### **1.2.3.1 Microorganismes retrouvés dans la matière fécale**

L'apport de matière fécale dans l'eau augmente le risque d'y introduire des pathogènes de façon concomitante. Un microorganisme pathogène est un organisme capable de causer une maladie chez l'être humain. Trois types d'agents pathogènes peuvent être présents dans l'eau naturellement ou à la suite d'une contamination fécale. Ces trois types sont les bactéries, les virus et les protozoaires.

Des centaines d'espèces de bactéries sont excrétées par l'entremise des fèces. La flore bactérienne entérique est divisée en deux groupes : les bactéries anaérobies et les bactéries aérobies. Voici les genres et les espèces intestinales les plus courants chez l'humain : *Bifidobacterium*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Lactobacillus*,

*Actinomyces bifidus*, *Bacteroides fragilis*, *Borrelia refringens*, *Treponema dentium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes faecalis* et *Proteus mirabilis*. Seulement quelques espèces excrétées par des individus infectés sont pathogènes, en voici des exemples : *Aeromonas*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Leptospira*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholera*, *Vibrio parahemolyticus* et *Yersinia enterocolitica*.

Les virus entériques sont retrouvés en grande quantité dans les eaux usées contaminées par de la matière fécale humaine ou animale (Hurst et *al.*, 2002). Le nombre de virus retrouvé dans les fèces oscillerait entre  $10^3$  et  $10^7$  par gramme de fèces (Melnick et *al.*, 1980) et dans l'eau à moins de 10 particules virales par litre (Biovir Laboratories, 2004) (selon la sensibilité de la technique de dénombrement). Dû à leur faible dose infectieuse et leur virulence élevée, les virus représentent un risque élevé pour la santé. La transmission de la plupart des virus se fait par contact de personne à personne et par voie fécale-orale (Hurst et *al.*, 2002). Les symptômes observés chez les personnes infectées ne sont pas limités aux gastro-entérites. Des cas de maladie respiratoire, de myocardite et de poliomyélite peuvent être aussi associés aux infections de virus entériques. Les virus sont généralement plus persistants dans l'environnement et plus résistants aux traitements de désinfection que la majorité des bactéries. Cette persistance et cette résistance varient entre les différentes espèces de virus et selon les caractéristiques physiques et chimiques de l'eau. Le rôle que joue l'eau comme vecteur de particules virales n'est pas encore clair pour plusieurs espèces de virus excepté pour les virus suivants : Hépatite A et E, Coxsackievirus B5, Norwalk et rotavirus. Ces virus ont été directement impliqués dans certains événements récents d'éclosion de maladies d'origine hydrique (Payment, 1991a). Beaucoup d'entérovirus causent des infections non apparentes et demeurent donc non détectés. Même si les virus ont toujours fait partie du groupe des microorganismes pathogènes d'origine hydrique, on n'en a pas reconnu entièrement l'importance. L'amélioration des méthodes de détection ainsi que la surveillance épidémiologique effectuée au sein des populations permettront de mieux apprécier les risques pour la santé que posent les virus dans l'eau (Santé Canada, 2003a).

Les protozoaires entériques présents dans l'eau ont été récemment associés à un très grand nombre d'épisodes d'infection d'origine hydrique. Dans ce groupe de microorganismes l'on retrouve : *Giardia*, *Cryptosporidium parvum* et *Entamoeba histolyca*. Le nombre de protozoaires excrétés dans les fèces de personnes infectées (Payment, 1991b) peut s'élever jusqu'à  $10^6$  par gramme de fèces. Dans les eaux usées, *Giardia* peut être retrouvé à des concentrations de  $10^6$  kystes par 100 litres. Comparativement aux bactéries et aux virus, certains protozoaires présentent une viabilité élevée, sous forme de kystes ou d'oocystes, lorsqu'ils sont exposés à des conditions environnementales difficiles ou soumis à des traitements de désinfection en usine (chloration, ozonation et ultraviolet). Le tableau 1 résume les principaux pathogènes retrouvés dans l'eau.

Tableau 1 : Principaux microorganismes pathogènes à l'origine de maladies d'origine hydrique (WHO, 2003)

Bactéries	Virus	Protozoaires et helminthes
<i>Campylobacter spp.</i>	Adenovirus	<i>Acanthamoeba spp.</i>
<i>E. coli</i>	Astrovirus	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Legionella spp.</i>	Enterovirus	<i>Dracunculus medinensis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hépatique	<i>Entamoeba histolyca</i>
<i>Salmonella spp.</i>	Norovirus	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Shigella spp.</i>	Rotavirus	<i>Naegleria fowleri</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	Sapovirus	<i>Schistosoma spp.</i>
<i>Yersinia spp.</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>

### 1.2.3.2 Les paramètres faisant varier la concentration des pathogènes dans l'eau

La concentration des microorganismes pathogènes d'origine fécale dans les bassins d'eau douce peut varier selon les paramètres suivants (Hurst et al., 2002) :

- le nombre de personnes et d'animaux infectés alimentant un bassin hydrologique;

- la rapidité et les types de trajets par lesquels la matière fécale provenant de personnes ou d'animaux infectées peut atteindre les eaux ;
- les traitements de désinfection utilisés par les autorités sanitaires afin de réduire la présence de pathogènes dans les effluents d'usines de traitement.

### **1.2.3.3 Les risques pour la santé associés à une contamination fécale de l'eau**

Les maladies d'origine hydrique sont des maladies «de l'eau sale» causées par une eau qui a été contaminée par des déchets humains, animaux ou chimiques. Ces maladies (tableau 2) affectent l'humain par un contact physique direct, par l'ingestion d'eau ou d'un aliment contaminé (irrigation, manipulations), par la pratique de certaines activités récréatives ou par la respiration d'aérosols (Hurst et *al.*, 2002). La présence de matière fécale humaine dans l'eau représente le risque le plus élevé pour la santé humaine (Scott et *al.*, 2002; Sinton et *al.*, 1998).

Plusieurs microorganismes pathogènes (bactéries, virus et protozoaires) sont véhiculés par l'eau. Voici des exemples de maladies d'origine hydrique causées par une contamination fécale : les gastro-entérites, les gastro-entérites virales (Norwalk, Rotavirus), les hépatites virales (HAV, HEV), la giardiase, la cryptosporidiose, la shigellose, la salmonellose et la fièvre typhoïde, le campylobacteriose, le cholera, l'amibiase, la yersiniose (WHO, 2003a; Pozio, 2003; Centers for Disease Control and Prevention, 2005). Annuellement, aux États-unis, on estime qu'environ 900 000 cas d'infection sont d'origine hydrique et, sur ce nombre, on peut compter 900 décès (ASM, 2005).

## **1.3 Le rôle de l'eau dans la transmission de maladies**

L'eau joue un rôle de vecteur pour certaines maladies affectant l'humain (tableau 2). À ce sujet, l'eau potable, les lieux de baignade et d'activités récréatives, la consommation de fruits de mer contaminés et le contact avec des aérosols représentent un risque d'exposition aux microorganismes pathogènes fécaux.

La majorité des infections transmises par l'eau potable sont associées à une contamination de l'eau par des pathogènes fécaux. Une chloration insuffisante combinée à la contamination des sources d'approvisionnement des usines de filtration sont à l'origine de la plupart des épidémies et des cas d'infection d'origine hydrique (Pipes, 1982).

Les sources de contamination retrouvées dans les endroits de baignade tels les piscines et les pataugeoires proviennent essentiellement des baigneurs eux-mêmes. En plus de faire face aux pathogènes ayant un mode d'infection fécal-oral, les baigneurs sont sujets aux infections de contact causées par d'autres germes bactériens et viraux provenant de la peau, des voies respiratoires, des voies urinaires, des yeux et des oreilles. Le maintien d'une bonne chloration des eaux dans ces endroits publics permet de réduire le risque d'être infecté. Le risque de contracter des maladies d'origine hydrique telles l'hépatite, la dysenterie, la fièvre typhoïde, etc. suite à la pratique d'une activité récréative dans un lac ou une rivière est aussi possible. Ce risque est proportionnel au niveau de contamination fécale humaine ou animale mesuré par les indicateurs de qualité microbiologique de l'eau (coliformes) et inversement proportionnel à l'âge des individus. Par ailleurs, la plupart des cas d'infection liés aux activités décrites précédemment ne sont généralement pas rapportés aux institutions de santé publique et peuvent susciter certaines interrogations sur les relations basées sur les données disponibles (Pipes, 1982). Plusieurs maladies ou infections d'origine hydrique sont transmises par la consommation de fruits de mer ayant été récoltés dans des zones contaminées. Ces maladies peuvent être divisées en deux groupes. Le premier groupe comporte les maladies ayant comme agent étiologique une contamination fécale humaine ou animale. De nos jours, dans ce groupe, l'on compte trois principales maladies, soit l'hépatite, la salmonellose et les gastro-entérites. Dans le deuxième groupe, l'agent étiologique est présent naturellement dans l'environnement aquatique (algues rouges, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium botulinum*) de la zone de cueillette (Pipe, 1982).

Certains procédés de traitement utilisés dans les usines d'épuration des eaux usées (boues activées) et l'épandage de matières fertilisantes organiques (boues, fumiers, lisiers) engendrent la formation d'aérosols. Depuis plusieurs décennies, plusieurs spécialistes voient en ces aérosols un moyen aérien de dissémination des pathogènes représentant un risque direct pour la santé chez les travailleurs d'usines d'épuration, les agriculteurs, la population en général et pour les milieux naturels. Par rapport à ces groupes, de récentes études démontrent que le nombre de cancers et d'infections intestinales est similaire à celui retrouvé dans une population normale non-soumise à ce genre d'aérosols. Par contre, chez certains groupes, une augmentation de la stimulation du système immunitaire (leucocyte, Ig-A, Ig-M, Ig-G) a été remarquée. La littérature ne fait mention jusqu'ici d'aucun cas de contamination de l'eau par le transport de pathogènes via les aérosols provenant d'usines d'épuration ou faisant suite à un épandage.

**Tableau 2 : Maladies d'origine hydrique les plus communes**

Maladies	Agents infectieux	Description des agents infectieux
Gastro-entérite	Virus ou Bactéries	Groupe mixte de bactéries et de virus.
Hépatite	Virus	Maladie pouvant être provoquée par une série de virus tels les virus de l'hépatite A,C, ou E.
Giardiase	<i>Giardia intestinalis</i>	La giardiase est causée par le protozoaire, <i>Giardia lamblia</i> , <i>G. intestinalis</i> et <i>G. duodenalis</i> .
Cryptosporidiose	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Protozoaire appartenant à l'ordre des <i>Coccidies</i> et <i>Sporozaires</i> .
Shigellose	<i>Shigella</i>	Bacille appartenant au genre <i>Shigella</i> . Sous-types fréquents : <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. dysenteriae</i> 1 ( <i>shigae</i> ), <i>S. dysenteriae</i> ( <i>schmitzii</i> ).
Salmonellose	<i>Salmonella</i> spp.	Bâtonnets Gram négatif; mobiles, aérobies et anaérobies facultatifs faisant partie de la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> .
Amibiase	<i>Entamoeba</i>	Parasite existant sous deux formes : celle



(dysenterie amibienne)	<i>histolytica</i>	d'un kyste infectieux résistant et celle d'un organisme mobile actif.
Campylobacteriose	<i>Campylobacter jejuni</i> et <i>Campylobacter coli</i> .	La campylobactériose est causée par les bactéries <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>Campylobacter coli</i> .
Cholera	<i>Vibrio cholerae</i>	Le choléra sous forme d'épidémie est causé par la bactérie <i>Vibrio cholerae</i> . Il existe deux biotypes de la bactérie cholerae : la souche classique et la souche Le Tor. La souche Le Tor cause une maladie moins grave que la souche classique du choléra.
Yersiniose	<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Bâtonnet à Gram négatif, aspect bacillaire ou ovoïde, production d'une entérotoxine thermolabile (ST) par certaines souches, identification sérologique des antigènes somatiques ( <i>Y. pseudotuberculosis</i> - les souches pourvues de l'antigène O de type 1 sont les plus fréquentes, > 90 %).

Tiré du site internet de l'Agence de santé publique du Canada, 2005 : [http://www.phac-aspc.gc.ca/new\\_f.html](http://www.phac-aspc.gc.ca/new_f.html)

#### 1.4 Politique nationale de l'eau (PNE) du Québec

À l'automne 2002, le Québec a adopté une politique de l'eau afin d'assurer la protection de la ressource. Cette politique a pour mission de mieux protéger la santé publique et l'intégrité des écosystèmes. La Politique nationale de l'eau suit la tendance internationale adoptée par l'Organisation des Nations Unies, soit d'assurer une gestion plus rigoureuse de l'eau (Annan, 2002). Ce nouvel encadrement garantit que l'utilisation de la ressource s'articulera sur le principe du développement durable, celui-ci visant le respect de l'intégrité des écosystèmes. Le développement durable doit être compris comme une vision élargie du bien-être humain et une perspective à long terme des conséquences des activités actuelles où une coopération globale est nécessaire pour

parvenir à des solutions viables (OCDE, 2004). La protection de la santé publique et des écosystèmes aquatiques est assurée par la prise de mesures visant à maintenir une bonne qualité de l'eau servant tant à la consommation humaine qu'aux activités de contact avec l'eau (baignade, sports nautiques).

Au Québec, plusieurs paliers de gouvernement (fédéral, provincial, municipal) sont actifs dans la gestion des eaux. Le fait qu'il y ait plusieurs intervenants conduit à des désaccords majeurs quant aux objectifs et aux usages des eaux à prioriser. La gestion sectorielle jusqu'ici pratiquée au Québec rend difficile une vision systémique de la ressource. L'approche par bassin versant décrite dans la Politique nationale de l'eau et adoptée d'ailleurs par de nombreux pays (MDDEP, 2002c) ouvre la voie à une véritable gestion intégrée et concertée des différents intervenants impliqués dans la ressource, ce qui assure le maintien et l'amélioration de la qualité de la ressource (MDDEP, 2002a). L'approche retenue dans ce contexte est celle de gestion par bassin versant.

Le bassin versant est l'ensemble d'un territoire drainé par un cours d'eau principal et ses tributaires (MENV, 2002d). L'amont d'un bassin versant est constitué de ruisseaux jusqu'à son aval, où l'on retrouve de grandes rivières. Les propriétés de l'eau d'un bassin versant sont influencées tant par les caractéristiques naturelles du bassin que par les diverses activités humaines qui s'y déroulent (agriculture, urbanisation). L'interconnectivité des cours d'eau complexifie l'identification des sources de pollution pour les rivières situées en aval qui, généralement, au Québec, alimentent les plus grandes agglomérations de population. L'analyse de la qualité de l'eau à l'échelle du bassin versant devient alors un outil d'information et permet la gestion de la ressource.

En lien avec l'approche par bassin versant, les États-Unis et le Canada se dirigent vers un nouveau mode de gestion de l'eau à des fins de consommation, celui de barrières multiples. L'approche par barrières multiples se définit comme étant un système intégré de procédures, de processus et d'outils qui, ensemble, empêchent ou réduisent le risque de contamination (chimique, microbiologique et physique). Cette approche comporte trois éléments majeurs, soit la protection des sources d'eau brute, l'efficacité des traitements en usine et l'innocuité de l'eau distribuée dans les réseaux d'eau potable

(CCME, 2002). La protection des sources d'eau (eaux souterraines et de surface) constitue un facteur important, car elle influe sur les usages primaires de l'eau (vie aquatique, agriculture, sports nautiques), sur la conception des solutions de traitements et sur les coûts des traitements qui seront nécessaires afin de rendre l'eau potable. Le rapport d'enquête sur l'évènement de North Battleford fait d'ailleurs état de ce fait: "*What the experts and the industry recommend with respect to the treatment of all surface water is a multi-barrier approach. The first barrier is watershed protection to ensure the best possible raw water source...*"(Laing, 2002). L'assurance d'une protection adéquate des sources d'eau exige une surveillance de la qualité de celle-ci et requiert des outils adéquats de gestion. L'utilisation d'indicateurs microbiens de contamination fécale à cette fin constitue une méthode éprouvée et utilisée à l'échelle internationale (WHO, 2003a).

### **1.5 Les microorganismes indicateurs d'une contamination fécale de l'eau**

L'analyse microbiologique de l'eau permet d'évaluer la qualité de cette dernière en faisant ressortir la pollution fécale de l'eau. Elle représente également un moyen pour contrôler l'efficacité des mesures de protection ou de traitement dans les usines de traitement de l'eau. Ce suivi de la qualité de l'eau se base sur l'identification de quelques espèces bactériennes (coliformes fécaux, *Escherichia coli*) d'origine entérique (Leclerc et al., 2003). La forte relation qui existe entre ces microorganismes indicateurs utilisés et la présence présumée de pathogènes fécaux soustrait le besoin de faire un suivi sur l'ensemble des pathogènes. Ces pathogènes sont généralement nombreux en variété d'espèces, mais peu en quantité, donc difficiles à isoler et à identifier. Il est donc préférable de porter plus d'attention sur les germes (indicateurs microbiens) qui sont présents en forte quantité dans les fèces humaines et animales à sang chaud. L'identification et la quantification de ces indicateurs sont devenues possibles par des méthodes scientifiques simples et standardisées.

#### **1.5.1 Les caractéristiques et utilités d'un indicateur microbien d'une contamination fécale de l'eau**

Essentiellement, un microorganisme utilisé comme indicateur doit être non-pathogène, être fortement associé à la présence de microorganismes pathogènes provenant de

matière fécale, être rapidement détectable, être facilement dénombrable et posséder des caractéristiques de cinétique similaires aux microorganismes pathogènes (Scott et *al.*, 2002).

- L'organisation mondiale de la santé divise les indicateurs microbiens en trois groupes (Ashbolt et *al.*, 2001):
- les indicateurs liés à l'efficacité des traitements : bactéries hétérotrophes totales, coliformes totaux ;
- les indicateurs d'une contamination fécale : coliformes fécaux, *E. coli* ;
- les indicateurs modèles de pathogènes : *E. coli*, *Salmonella*, F-RNA coliphage, les virus entériques humains.

## **1.5.2 Les indicateurs microbiens d'une contamination fécale de l'eau**

### **1.5.2.1 Les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHAA)**

Les BHAA comprennent plusieurs genres bactériens capables de croître en présence ou en absence d'oxygène (anaérobies facultatives), sur des milieux simples contenant une source de carbone. La majorité des BHAA retrouvées dans l'eau potable sont non-pathogènes. Certaines par contre peuvent l'être et affecter les individus ayant un système immunitaire affaibli. Les BHAA sont constituées en général des genres suivants : *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Xantomonas*. Le dénombrement des BHAA vise principalement à estimer la charge bactérienne dans l'eau potable et se fait essentiellement sur un échantillonnage en bout de réseau et parfois dans des secteurs du réseau qui pourraient être jugés à risque pour diverses raisons (faible débit, résiduel de chlore libre inadéquat, etc.) Il offre une appréciation globale de la salubrité générale d'une eau potable sans toutefois préciser les sources de contamination. Un nombre élevé de BHAA peut indiquer une difficulté de traitement (ex : concentration de chlore résiduel inadéquate) ou d'entretien du réseau de distribution (ex : présence de matière organique).

### **1.5.2.2 Les bactéries coliformes**

Les bactéries coliformes sont d'une grande diversité. Plusieurs sont d'origine fécale, tandis que d'autres peuvent être retrouvées dans l'environnement. L'utilisation des coliformes est associée à l'évaluation de la qualité de l'eau (potable, récréative,

irrigation) (WHO, 2003b). On retrouve normalement ces bactéries dans les eaux usées et polluées. Au Canada, trois techniques différentes sont utilisées afin de détecter la présence de coliformes dans l'eau : la méthode de présence-absence (P-A), la technique de filtration sur membrane (FM) et la technique de fermentation en tube multiples.

### **1.5.2.3 Les coliformes totaux**

Les coliformes totaux sont utilisés depuis la fin du 19<sup>e</sup> siècle comme indicateurs de la pollution et de la qualité microbienne de l'eau parce qu'ils sont associés indirectement à une pollution d'origine fécale. Par ailleurs, seuls certains genres peuvent provenir exclusivement de la matière fécale. En effet, la plupart des espèces de ce groupe se retrouvent naturellement dans le sol ou la végétation (Edberg et *al.*, 2000). Certaines espèces de coliformes peuvent se multiplier dans l'eau de consommation. C'est le cas de *Serratia fonticola* (WHO, 2000).

Les coliformes sont des bactéries en forme de bâtonnets, aérobies ou anaérobies facultatives, possédant l'enzyme beta-galactosidase. Les groupes des coliformes totaux comprennent diverses espèces des genres suivants : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia*. La majorité des coliformes ne sont pas pathogènes et ne représentent aucun danger pour la santé publique à l'exception du genre *Escherichia coli* (*E. coli*) dont certains sérotypes sont pathogènes.

De façon générale, la présence de coliformes totaux dans l'eau potable est indicateur d'un risque très imprécis. Ces bactéries peuvent croître à l'intérieur de réseaux d'aqueduc en parfaite condition. La croissance de certains coliformes se produit habituellement à partir du biofilm présent sur les parois internes des canalisations, particulièrement dans les endroits où l'on retrouve une faible concentration résiduelle de chlore (Camper et *al.*, 1991, LeChevallier et *al.*, 1996).

### **1.5.2.4 Les coliformes fécaux (thermotolérants)**

Le sous-groupe de coliformes fécaux comporte des espèces pouvant avoir une activité métabolique à des températures supérieures aux autres coliformes que l'on nomme communément les coliformes fécaux thermotolérants (fermentation du lactose à une

température de 44,5°C). *Escherichia coli* (*E. coli*) représente l'espèce la plus fréquente associée à ce groupe (80-90%). D'autres genres peuvent aussi faire partie, à plus faible mesure, de ce sous-groupe, tel est le cas de *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*. Avec le temps, la plupart de ces genres ont été retrouvés dans divers environnements.

L'intérêt de faire le suivi des coliformes fécaux, à titre d'organismes indicateurs, réside dans le fait que leur survie dans l'environnement est généralement similaire à celle des bactéries pathogènes et que leur densité est généralement proportionnelle au degré de pollution produite par la matière fécale (CEAEQ, 2000). Suite aux traitements appliqués à l'eau avant son envoi dans le système de distribution, aucun organisme pathogène ou organisme indicateur d'une contamination fécale, tel que les bactéries coliformes fécales, ne devrait se trouver dans l'eau. L'analyse de l'eau à l'intérieur du réseau de distribution devient utile afin de vérifier l'étanchéité de celui-ci.

#### **1.5.2.5 *Escherichia coli***

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des entérobactéries et comprend cinq espèces dont une seule, *Escherichia coli*, est exclusivement d'origine fécale. De ce fait, il constitue l'indicateur le plus spécifique d'une contamination fécale de l'eau (Edberg et al., 2000) et est utilisé à titre d'indicateur de la qualité des eaux. La presque totalité des souches d'*E. coli* ne sont pas pathogènes puisque cette bactérie est présente normalement dans l'intestin des mammifères (Rice et al., 1999). La détection d'*E. coli* dans une eau traitée est une indication claire d'une contamination d'origine fécale et doit faire sérieusement soupçonner la présence d'autres microorganismes pathogènes (Elmund al., 1999).

#### **1.5.2.6 Streptocoques ou enterocoques fécaux**

La plus récente classification des streptocoques fécaux date des années 80 par la création d'un nouveau genre, *Enterococcus*. Lors de cette reclassification des streptocoques, plusieurs espèces correspondant aux streptocoques du groupe sérologique D de la classification de Lancefield ont été transférées vers le genre *Enterococcus*. Le genre *Enterococcus* regroupe une vingtaine d'espèces retrouvées dans les tractus gastro-intestinaux humain et animal. Deux espèces par contre semblent plus souvent identifiées

chez l'humain, soit *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Les streptocoques du groupe D provenant du bassin animal semblent être plus susceptibles de contaminer les sources d'alimentation en eau potable. Les espèces typiques retrouvées chez les animaux sont *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus* et *S. alactolyticus*. La persistance des entérocoques dans l'eau peut, dans certains cas, être supérieure à celle des autres organismes indicateurs dû à leur faible sensibilité aux agents désinfectants, ce qui fait d'eux d'excellents indicateurs pour évaluer l'efficacité du traitement de l'eau (WHO, 2003a). Par ailleurs, puisqu'il n'y a généralement pas de croissance des entérocoques dans un réseau de distribution, leur détection témoigne généralement d'une pollution fécale récente (WHO, 2003a). En 2000, l'EPA a proposé d'inclure le suivi des entérocoques à titre d'indicateurs d'une contamination fécale de l'eau souterraine, au même titre qu'*Escherichia coli* et que des virus coliphages. Selon cette agence, afin de protéger la santé publique, un seul échantillon positif devrait entraîner une notification aux autorités sanitaires et l'application de mesures adéquates comme la désinfection (US EPA, 2000a).

#### **1.5.2.7 *Clostridium perfringens***

La bactérie *Clostridium perfringens* est de type Gram positif, en forme de bâtonnet, anaérobie et elle forme des structures de survie (spores). Les spores sont résistantes aux fortes températures, aux grandes variations de pH, aux ultraviolets et aux traitements de désinfection utilisés dans les usines de filtration. Les spores de *Clostridium perfringens* se retrouvent principalement dans les fèces humaines et dans celles de quelques animaux, particulièrement celles du chien. Les spores de ce microorganisme qui sont retrouvées dans l'eau potable indiquent potentiellement une déficience des traitements de désinfection ou une recontamination des eaux traitées (WHO, 2003a).

#### **1.5.2.8 Les phages utilisés comme indicateurs d'une pollution fécale de l'eau**

Les bactériophages sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries par des sites récepteurs situés à la surface de la cellule hôte. Les coliphages utilisés comme indicateurs infectent essentiellement la bactérie *Escherichia coli* et certaines espèces rapprochées. L'étude des bactériophages dans l'eau est particulièrement intéressante car ceux-ci possèdent des caractéristiques biochimiques et de survie similaires aux virus

entériques lorsqu'ils se retrouvent dans l'eau (WHO, 2003a). Leur détection dans l'eau traitée devient alors synonyme d'une présence possible de virus entériques. Trois types de bactériophages ont été avancés comme indicateurs de la présence de virus entériques dans l'eau : les coliphages somatiques, les bactériophages à ARN-F spécifiques au mâle (coliphage MS2 T-spécifique ou coliphage F-spécifique) et les phages *Bacteroides* (c'est-à-dire phages qui infectent *Bacteroides fragilis*). De nombreuses questions de normalisation et de contrôle de qualité restent à régler avant qu'un de ces trois types de phages soient utilisés pour la détection des entérovirus (Santé Canada, 2003b).

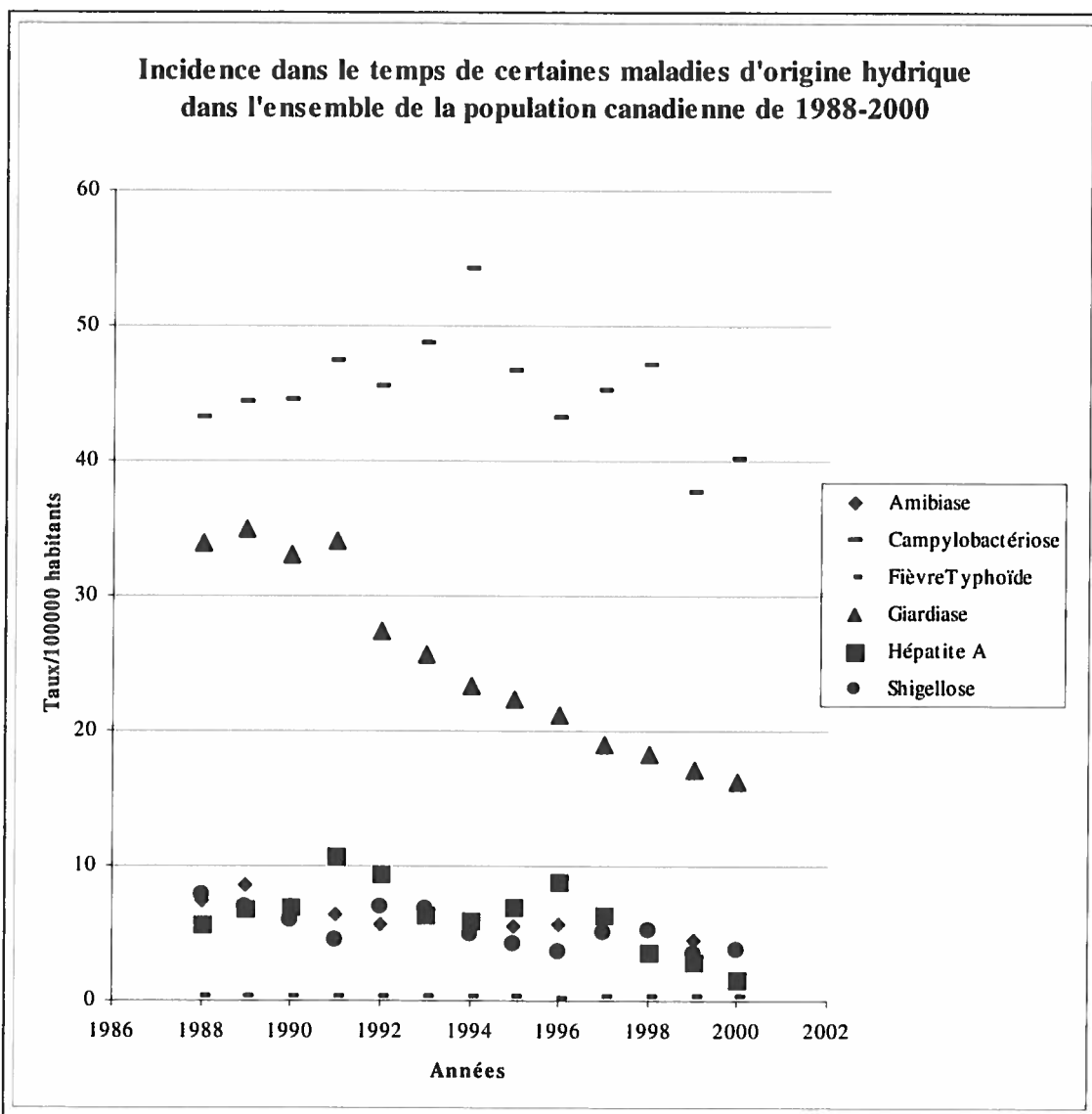
#### **1.6 Le suivi des sources microbiennes et pathogènes dans les écosystèmes aquatiques**

La pollution fécale des cours d'eau affecte la qualité de la ressource et représente un danger important pour la santé humaine. La plupart des pathogènes fécaux (*Shigella*, *Salmonella*, virus hépatiques et virus du groupe Norwalk) se transmettent par l'eau et ne peuvent être détectés directement par les méthodes de suivi présentement disponibles (Scott et al., 2003). Des indicateurs microbiens (bactéries entérocoques, virus coliphages mâles spécifiques, coliformes totaux, coliformes fécaux et *E. coli*) sont alors utilisés afin de prédire la présence de ces pathogènes. Leur omniprésence dans les matières fécales pour certains ainsi que la recroissance possible en milieux aquatiques chez certains autres limitent leur utilisation à grande échelle dans l'identification de l'origine de la pollution fécale des eaux (APHA, 1995).

Ces dernières années, le nombre de cas d'infection pour certains pathogènes d'origine hydrique est demeuré stable au Canada (Office of the Auditor General of British Columbia, 1998) (voir figure 1) et ce, malgré l'utilisation des indicateurs de qualité classiques, de l'amélioration des traitements et des efforts politiques mis de l'avant afin d'abaisser la quantité de polluants fécaux rejetés dans les cours d'eau.



**Figure 1 : Incidence des principales maladies d'origine hydrique au Canada**



Adapté de l'Agence de santé publique du Canada, 2005 : [http://www.phac-spc.gc.ca/new\\_f.html](http://www.phac-spc.gc.ca/new_f.html)

Pour cette raison, un nombre croissant d'études sont axées sur de nouveaux indicateurs pouvant hausser le niveau de connaissances sur l'état d'un cours d'eau notamment au niveau de ses sources de contamination fécale. L'enrichissement des connaissances devrait permettre :

- de mieux prévenir les risques pour la santé humaine ;
- de mieux cerner l'amplitude et la variation dans le temps de la problématique et de ses impacts ponctuels et continus sur la santé, l'économie et l'environnement ;
- d'améliorer la gestion de la ressource au niveau du bassin versant ;
- de mieux cibler les actions pour remédier aux problèmes engendrés ;
- de réaliser des économies sur les traitements.

Il existe plusieurs méthodes expérimentales permettant de retracer l'origine de la contamination fécale d'un cours d'eau. Selon l'objet recherché dans l'eau, ces méthodes sont divisées en deux branches : chimique (chemical source tracking, CST) ou microbienne (bacterial source tracking, BST ou microbial source tracking, MST).

Les méthodes basées sur le type de molécules chimiques retrouvées dans l'eau sont présentement associées exclusivement à la pollution humaine. Ces molécules sont des sous-produits du métabolisme ou de l'activité humaine. Parmi les molécules recherchées, notons les détergents, les agents de blanchiment (Fletcher et *al.*, 1999), la caféine (Buerge et *al.*, 2003; Burkhardt, 1999), les coprostanols et les stéroles (Leeming et *al.*, 1996, Chan et *al.*, 1998), le ratio des isotopes d'azote et de carbone (Bachtar et *al.*, 1996), les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les résidus de fibres optiques et les fragrances (Standley et *al.*, 2000). L'utilisation de ces méthodes chimiques se limite aux abords des centres urbains où leur concentration peut être suffisante pour y être détectée.

À l'heure actuelle, la recherche de certains microorganismes spécifiques dans l'eau reste la méthode la plus utilisée dans le suivi des sources microbiennes et pathogènes dans les écosystèmes aquatiques (Scott et *al.*, 2002; Sinton et *al.*, 1998). Les germes qui sont principalement à l'étude sont *E. coli*, *Bacteroides* spp., *Enterobacteriaceae*,

*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Rhodococcus coprophilus*, phage de *Bacteroides fragilis*, F-RNA coliphage, adénovirus et *Bifidobacterium*. Les méthodes développées afin d'utiliser ces indicateurs de la source de contamination fécale dans l'eau peuvent être classées selon qu'elles font appel ou non à la biologie moléculaire et sous-divisées en deux groupes selon leur besoin ou non d'une banque de données.

### **1.6.1 Méthodes moléculaires de suivi**

Les méthodes moléculaires font appel au génotype des microorganismes. Elles sont répertoriées selon qu'elles nécessitent une banque de données (bibliothèque) ou non. Les banques de données repertorient les microorganismes selon leur origine. Le lien entre les espèces bactériennes répertoriées comparativement à celles retrouvées dans les eaux peut être ainsi fait.

D'autres méthodes nécessitent la mise sur pied d'une banque de données communément appelée bibliothèque. Dans ce groupe, on retrouve le rybotypage, l'électrophorèse en champs pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE) et sur gradient dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; DGGE), l'amplification en chaîne par polymérase de certaines régions répétitives (Rep-PCR) et l'amplification aléatoire de l'ADN (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD).

Parmi les méthodes moléculaires ne nécessitant pas la mise sur pied d'une banque de données, il y a l'utilisation de phages indicateurs (bactériophage de *Bacteroides fragilis* HSP40, coliphage F-RNA). Ces virus ciblent des bactéries adaptées spécifiquement à la flore intestinale d'un organisme hôte. L'identification moléculaire de virus entériques humains, de microorganismes ayant un lien spécifique avec la flore bactérienne de l'organisme qu'ils colonisent et l'utilisation de marqueurs génétiques spécifiques à un type d'hôtes (t-RFLP, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) constitue les principales méthodes utilisées aujourd'hui.

### **1.6.1.1 Le ribotypage**

Le ribotypage est une méthode moléculaire permettant d'observer certaines variations au niveau du génome. Ces variations apparaissent semblables à un code-barre. L'analyse du code permet de faire correspondre chaque souche à un hôte. Concrètement, suite à la lyse des cellules d'une colonie isolée à partir d'un hôte connu pouvant potentiellement contaminer un cours d'eau, l'ADN (acide désoxyribonucléique) est coupé par une ou plusieurs enzymes (endonucléase de restriction). Cette digestion dépend du niveau de discrimination choisi. La série de fragments obtenue (nombre et taille) est caractéristique de l'isolat analysé. Ces fragments sont alors séparés en fonction de leur taille par migration sur gel (électrophorèse), transférés sur une membrane de nylon et mis en évidence à l'aide d'une sonde nucléique marquée. Il existe deux types de sonde soit les sondes radioactives ("dites chaudes", exemple Phosphore 32) et les sondes non radioactives ("dites froides", exemple digoxigénine ou biotine-streptavidine). Après la détection du marqueur couplé à la sonde, seuls les fragments hybridant à la sonde sont visualisés, générant ainsi une empreinte visible sous forme d'un code-barre (Institut Pasteur, 2005). Ces codes-barres sont ensuite répertoriés selon leur origine dans une banque de données où d'autres codes-barres provenant de bactéries isolées d'un cours d'eau pollué pourront y être comparés. L'origine de la contamination pourra alors être identifiée. Cette méthode demande de nombreuses manipulations et la construction d'une grande bibliothèque afin que cette dernière puisse être représentative du plus grand nombre de sources contaminantes possible. Cette méthode a souvent été utilisée avec *E. coli* (Parveen et al., 1999).

### **1.6.1.2 Électrophorèse en champ pulsé (PFGE)**

L'électrophorèse en champ pulsé permet de séparer des segments d'ADN génomique provenant d'une souche bactérienne selon la dimension de ceux-ci, permettant la différenciation des échantillons. Suite à une digestion enzymatique (endonucléase de restriction), l'ADN génomique se retrouve fragmenté. La taille et le nombre de fragments sont caractéristiques de la souche bactérienne. Ces fragments sont par la suite déposés dans un gel d'agarose soumis à un courant électrophorétique bidirectionnel alterné. L'ensemble des fragments sont alors séparés selon leur taille et peuvent être visualisés par coloration au bromure d'éthidium. Comme le ribotypage, le PFGE génère un code-barre ayant les mêmes usages. Cette méthodologie est utilisée généralement afin de différencier des bactéries ayant une forte similitude génétique (McLellan et al., 2003).

### **1.6.1.3 L'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)**

La méthode appelée DGGE permet de séparer de petits fragments d'ADN (200-700 bp) selon la séquence génétique d'un échantillon mixte tel la flore microbienne. Le principe consiste à faire migrer par électrophorèse l'ADN préamplifié par PCR au travers d'un gel (acrylamide) possédant un caractère dénaturant (température, formamide/urée) croissant. Avec l'augmentation des conditions dénaturantes, les fragments d'ADN s'ouvrent à l'image d'une fermeture éclair. En changeant de conformation spatiale vers une linéarisation, l'ADN se trouve retenu davantage par les pores du gel. Cette variation dans l'avancée des brins d'ADN permet d'obtenir un patron de migration caractéristique d'un isolat ou d'une situation environnementale précise. Des suivis sur la diversité microbienne, l'analyse de mutations génétiques et la différenciation d'espèces d'un même genre sont des exemples d'application en BST de cette technique moléculaire. Cette technique doit par contre être améliorée afin d'être adaptée aux conditions réelles de terrain (Buchan et *al.*, 2001).

La technique a été utilisée afin de différencier la population de *E. coli* présente dans un cours d'eau polluée par de la matière fécale à partir des variations présentes sur des fragment de gènes de la bêta-D-glucuronidase (Farnleither et *al.*, 2000). L'utilisation de PCR-DGGE a aussi été utilisée afin de faire ressortir la diversité de l'espèce *E. coli* dans une eau contaminée par de la matière fécale humaine et la variation de la communauté microbienne dans le lisier de porcelets (Leung et *al.*, 2001).

### **1.6.1.4 L'amplification en chaîne par polymérase de certaines régions répétitives (Rep-PCR)**

Cette technique fait appel aux mêmes séquences retrouvées à plusieurs reprises dans l'ensemble du génome bactérien (repetitive extragenic palindromic (REP), enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC, BOX) (Johnson et *al.*, 2004). Les régions se retrouvant entre ces séquences sont amplifiées et génèrent une série de fragments de différentes longueurs pouvant être visualisés sur gel. Un patron de bandes (code-barre) est ainsi généré et devient l'emprunte spécifique d'un isolat bactérien. Ce patron est référencié à l'intérieur d'une banque et constitue une base de données pour la comparaison subséquente avec d'autres isolats bactériens. Cette technique en BST a déjà été appliquée à *E. coli* afin de différencier l'origine de la contamination fécale (Dombeck et *al.*, 2000).

#### **1.6.1.5 PCR-RFLP (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Cette méthode permet de visualiser la diversité d'un genre microbien provenant d'un échantillon mixte en utilisant le gène codant pour la sous-unité ribosomale 16S. Ce type d'ADN est hautement conservé chez les bactéries et diffère d'une espèce à l'autre. Les différences peuvent être visualisées sur gel suite à une digestion enzymatique des produits ayant été amplifiés à l'aide d'un PCR. Les modifications intra-genre peuvent avoir été causées par des insertions et des délétions aléatoirement avec le temps. Cette méthode qui ne nécessite aucune culture *in vitro* est surtout utilisée pour des bactéries anaérobies ayant été introduites dans un cours d'eau (Berhardt et *al.*, 2000).

#### **1.6.2 Méthodes non-moléculaires (phénotype)**

##### **1.6.2.1 L'analyse de la résistance bactérienne («Antibiotic resistance analysis»; ARA)**

Cette méthode compare la résistance aux antibiotiques de certains genres bactériens (*Enterococcus*, *E. coli*) dont l'origine fécale est connue face au même genre retrouvé dans l'eau. Depuis 1950, les antibiotiques sont utilisés tant chez les humains que chez les animaux afin de traiter certaines infections bactériennes et d'optimiser la conversion alimentaire. Avec le temps, une sélection s'est effectuée au niveau de la flore intestinale exposée aux antibiotiques (Cooke, 1976, Parveen et *al.*, 1997). Ceci explique le patron de résistance unique observé chez certains groupes d'organismes (humains, ruminants, volaille, faune sauvage).

#### **1.6.3 Le constat des différentes méthodes de suivi des sources microbiennes et pathogènes dans les écosystèmes aquatiques**

L'utilisation indépendante des différentes techniques énoncées précédemment peut présenter certaines limites associées au contexte d'utilisation (Scott et *al.*, 2002). La meilleure approche de suivi des sources de contamination fécale des écosystèmes aquatiques devrait être celle d'une boîte à outils combinant plusieurs méthodes. De cette façon, les inconvénients associés à une technique seront paliés par d'autres analyses (voir tableau 3). À l'heure actuelle, l'utilisation des méthodes CST/BST/MST est celle faite parallèlement aux tests microbiologiques de la qualité de l'eau (*E. coli*, coliforme totaux, etc.). La synthèse de ces deux approches présente un portrait exhaustif de la contamination fécale de l'eau en mesurant le niveau de la contamination fécale tout en identifiant l'origine de celle-ci.

#### **1.6.4 Le choix d'une méthode de suivi**

Le choix d'une méthode de suivi en particulier dépend de plusieurs facteurs. Quels types d'informations devra fournir l'étude? Y a-t-il des sources déjà connues de pollution? Dans quel type d'eau doivent être faites les analyses? Quel montant d'argent est disponible pour l'étude? Quelle sera la durée de l'étude? Quel est le niveau de discrimination désiré? Cherche-t-on une différenciation entre les sources humaines et animales de contamination fécale? Une différenciation entre les différentes sources animales serait-elle désirable? Toutes ces questions doivent être abordées avant le choix d'une stratégie de suivi.

**Tableau 3 : Avantages et désavantages des principales méthodes de suivi des sources microbiennes de pollution fécale (Scott et al., 2002)**

Méthodes	Avantages	Désavantages
Rapport Coliforme fécaux/ <i>Streptococcus</i>	Facile, utile dans les cas de contamination récente.	Taux de décroissance des espèces peut faire varier le ratio dans le temps.
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Ceux capables de fermenter le sorbitol peuvent être associés à l'humain.	Faible présence dans l'eau, taux de survie variable selon l'espèce, aucun milieu de culture défini.
<i>B. fragilis</i> HSP40 F+ RNA bactériophage	Facile, spécifique à l'humain, bonne association avec la source.	Absence dans certains environnements aquatiques causée par un taux de survie variable.
Virus entérique humain	Spécifique à l'être humain, mesure directe.	Faible nombre dans les environnements aquatiques, méthodologie exigeante, sensibilité.
MAR (résistance aux antibiotiques multiple)	Rapide, permet de différencier les sources de contamination animale.	Besoin d'une bibliothèque, variable géographiquement, absence des isolats n'ayant aucune résistance.
PFGE	Sensibles aux réarrangements chromosomiques des souches.	Sensibilité élevée.
BOX-PCR	Rapide, facile.	Demande une banque de données locale.
Ribotyping	Facile, permet le classement facile d'isolats.	Méthodologie exigeante, demande une banque de données locale, résultats parfois variables.
Marqueurs <i>Bacteroides-Prevotella</i>	Facile, méthode sans culture.	Manque d'informations sur le devenir dans l'eau, non applicable à l'ensemble des animaux.
Caféine	Spécifique à la pollution humaine.	Méthodes analytiques coûteuses, sensibilité.
Stanol et stérol fécaux	Permet de différencier entre une source de contamination humaine ou animale.	Méthodes analytiques coûteuses, sensibilité, présence naturelle dans les sédiments.



## 2 LA FLORE INTESTINALE

Le tractus gastro-intestinal (TGI) est constitué d'une flore complexe de plus de 500 différentes espèces de bactéries (Harsharnjit, 2003). À la naissance, le TGI est considéré comme stérile, mais devient vite colonisé dans les instants suivant l'accouchement. Plusieurs facteurs modulent la colonisation du TGI tels le mode d'accouchement, l'hygiène et l'utilisation d'antibiotiques lors de l'accouchement. Lorsque la flore est bien établie, celle-ci reste relativement stable tout au long de la vie. La plupart des bactéries retrouvées dans le TGI sont non-pathogènes. Chez un organisme en santé, il s'établit un équilibre optimal entre les populations de bactéries favorables et non favorables du TGI. L'utilisation d'antibiotiques, l'exposition à certaines radiations, le stress et les infections peuvent facilement compromettre ce fragile équilibre, favorisant une multiplication et une libération subséquente d'importantes quantités de microorganismes pathogènes via les fèces.

### 2.1 *Bifidobacterium*

Le premier bacille Gram positif anaérobie strict non-sporogène a été isolé par Tissier en 1899 à partir de selles de nourrissons allaités au sein. D'abord appelée "*Bacillus bifidus communis*", cette bactérie est maintenant nommée *Bifidobacterium bifidum* biovar b (Mitsuoka, 1984 ; Scardovi, 1986). L'utilisation comme probiotique et l'absence de pathogénicité de ce genre bactérien ainsi que ses rôles dans la dégradation de composés hautement toxiques (Federici et al., 2004), dans la prévention de certains cancers (Abd El-Gawad et al., 2004; Biffi et al., 1997) et de la diarrhée chez les enfants et les voyageurs (Harsharnjit, 2003) et dans la production de bactériocines (Yildirim et al., 1998) ont créé beaucoup d'intérêt pour la recherche sur cette bactérie.

#### 2.1.1 Description générale de *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est le genre type de la famille des *Bifidobacteriaceae* (ordre des *Bifidobacteriales*, sous-classe des *Actinobacteridae*, classe des *Actinobacteria*, division des *Firmicutes*, domaine des *Bacteria* ou des *Eubacteria* (Euzéby, 2005). *Bifidobacterium* est une bactérie entérique Gram positif, non-sporulante, non-motile et anaérobie stricte (certaines souches tolèrent la présence d'oxygène). Elle peut prendre

différentes formes (polymorphique). La morphologie en forme de "Y" et de "V" caractérise le mieux ce microorganisme, mais ne permet pas une bonne différenciation du genre ou de l'espèce. La température optimum de la croissance se situe entre 37 et 41°C (min : 25-28°C, max : 43-45°C) tandis que le pH optimum se trouve autour de 6.5-7.0 (aucune croissance : pH 4.5-5.0 et 8.0-8.5). Aucun dégagement de gaz n'est fait par cette bactérie lors de la fermentation des sucres (glucose) excepté dans le cas de la dégradation du gluconate où il y a un léger dégagement de CO<sub>2</sub> (Scardovi, 1986).

### **2.1.2 Les sources de carbone, d'énergie et les voies métaboliques chez *Bifidobacterium***

La dégradation des sucres débute par l'activité de la fructose-6-phosphoketolase (F6PPK-EC). Cette enzyme brise les fructoses-6-phosphate en acétylphosphate et en erythrose-4-phosphate. Par la suite, ces composés suivent la séquence enzymatique suivante : transaldolase, transketolase, xylulose-5-phosphate phosphoketolase et, finalement, ils subissent l'action des enzymes EMP (à action sur les glyceraldehyde-3-phosphate). Des composés secondaires sont aussi formés tout au long du processus tels de l'acide acétique, de l'acide lactique, de l'acide formique, de l'éthanol et de l'acide succinique.

Par ailleurs, la plupart des espèces de *Bifidobacterium* sont capables d'utiliser le sel d'ammonium comme seule source d'azote et des sucres simples comme source de carbone (2 hexoses → 3 acetates + 2 lactates). Plusieurs caractéristiques intéressantes peuvent être aussi relevées au niveau de l'activité de la fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK-EC) selon qu'elle vient d'un *Bifidobacterium* associé à l'humain ou aux animaux. Le type animal possède des propriétés similaires à celles retrouvées chez *Acetobacter xylinum*, elle est entre autres active envers le xylose-5-P. Le type humain, par contre, possède des activateurs, un pH optimum, une température d'inactivation unique qui provoque seulement un clivage au niveau du fructose-6-P. Comme on peut le voir, les espèces de *Bifidobacterium* peuvent être différenciées sur une base métabolique non seulement par l'activité de la F6PPK-EC, mais aussi sur une base immunologique via le patron de l'isozyme de la transaldolase et de la 6-phosphogluconate déhydrogénase (6PGD) obtenu par «starch gel electrophoresis».

## **2.1.3 Les méthodes classiques de culture**

### **2.1.3.1 Les besoins nutritionnels**

Le besoin des bifidobactéries en composés azotés (N-acétylglucosamine et N-acétyllactosamine) est généralement comblé par les produits laitiers et ces composés stimulent leur croissance. Le N-acétylglucosamine est d'ailleurs un précurseur essentiel à la synthèse de l'épaisse couche de muréine (peptidoglycane) spécifique aux bactéries Gram positif. Ces bactéries peuvent aussi utiliser l'azote inorganique (sels d'ammonium) comme seule source d'azote. Le fer (ferreux ou ferrique), le magnésium et le manganèse sont les sels minéraux nécessaires pour *Bifidobacterium*. Plusieurs souches synthétisent, accumulent et libèrent de manière variable certaines vitamines, notamment la thiamine, l'acide nicotinique et l'acide folique (Deguchi et *al.*, 1985).

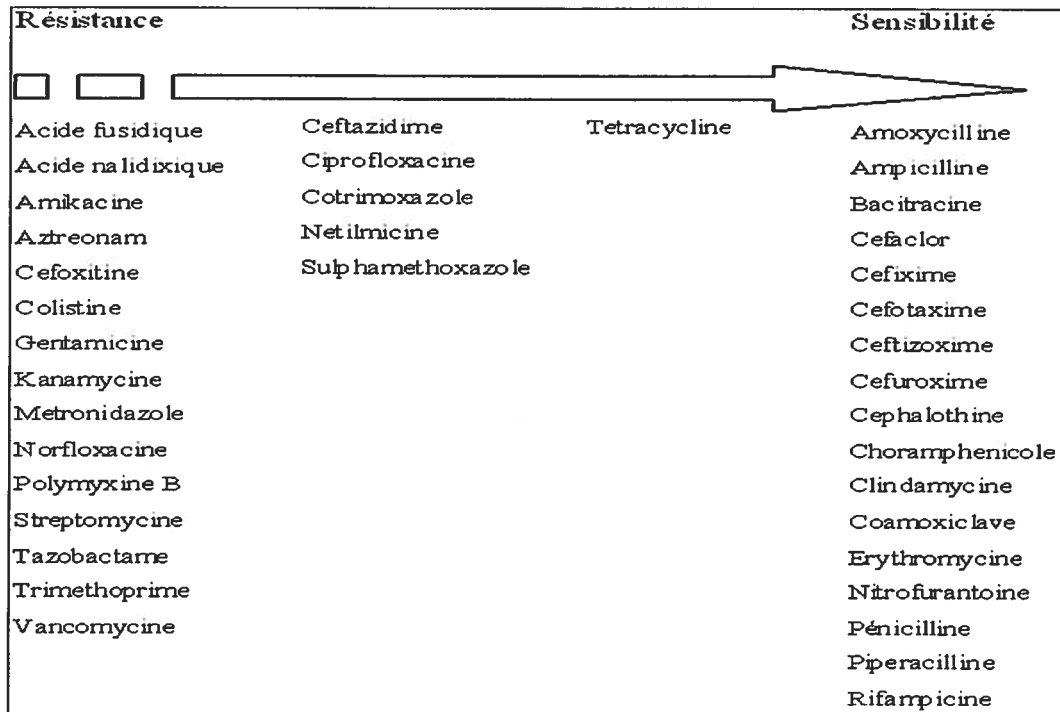
### **2.1.3.2 Les facteurs de croissance**

Il existe plusieurs substances qui favorisent la croissance des bifidobactéries dont le lactulose et les chaînes courtes de fructo-oligo-saccharides (FOS) aussi appelées «neosugars». Le lactulose permet d'abaisser le pH, de provoquer la morphologie en Y et en V typique de *Bifidobacterium* tout en fournissant une source de carbone. Les FOS favorisent aussi la croissance des bifidobactéries, mais limitent surtout le développement de *Clostridium* et de *E. coli*. D'autres substances peuvent aussi avantager la croissance des bifidobactéries comme le lactosucrose, le lactisol et les galact-oligosaccharides.

### **2.1.3.3 La sensibilité aux antibiotiques**

Comme tous les microorganismes, les bifidobactéries sont sensibles à différents antibiotiques (voir figure 2). La connaissance de la sensibilité de *Bifidobacterium* face aux antibiotiques permet notamment, en microbiologie appliquée, d'orienter le choix d'un antibiotique pour augmenter la sélectivité d'un milieu de culture. En général, les bifidobactéries sont sensibles à l'ampicilline (pénicilline G), aux céphalosporines de première génération, aux tétracyclines, aux macrolides (érythromycine), aux lincosamides (clindamycine) et aux chloramphénicoles. Les bifidobactéries sont par contre résistantes aux aminosides (néomycine, kanamycine, gentamycine, streptomycine) et de manière moins forte aux polymyxines. Une résistance a aussi été observée pour le thriméthoprime et pour le métronidazole (Rada et *al.*, 1998). La figure 1 (Charteris et al, 1998) résume l'effet de certains antibiotiques sur le développement de *Bifidobacterium*. Les mécanismes de résistance retrouvés chez *Bifidobacterium* sont encore peu connus (Lim et *al.*, 1993) et varient beaucoup entre les différentes espèces. (Charteris et *al.*, 1998).

**Figure 2 : Effets des antibiotiques sur *Bifidobacterium***



#### 2.1.3.4 Les milieux de croissance

Une grande variété de milieux de culture a été développée et essayée dans le but d'isoler et de faire croître adéquatement *Bifidobacterium* spp. (voir tableau 4). À l'origine, ces milieux étaient constitués de jus de tomate, de sang de mouton ou de cheval, de lait humain, d'extraits de foie ou de viande et d'une variété de différents peptones. Il existe un grand nombre de milieux de culture permettant la croissance de *Bifidobacterium*. Encore aujourd'hui, il n'existe pas de milieu capable d'isoler l'ensemble des espèces de bifidobactéries tout en limitant la croissance d'autres genres bactériens. La grande majorité des milieux de croissance disponibles pour *Bifidobacterium* ont une composition complexe d'ingrédients, demandent de longs intervalles d'incubation et montrent un faible rendement (Nebra et al., 1999). Des études récentes ont permis de découvrir de nouveaux milieux permettant d'isoler les bifidobactéries à partir d'échantillons d'eau ou de produits provenant de l'industrie de la transformation du lait.

**Tableau 4: Milieux utilisés dans la culture de *Bifidobacterium***

Milieux de culture	Bases	Agents ou conditions sélectifs
NPNL-based media	BL	Neomycine, paromycine, acide nalidixique, chlorure de lithium
MRS-NPNL	MRS	Neomycine, paromycine, acide nalidixique, chlorure de lithium
BL-OG	BL	Oxgall, gentamycine
RMS agar+PPNL	Rogos a	Propionate de sodium, paromycine, néomycine, chlorure de lithium
Wilkins-Chalgren (additionné)	WC	Néomycine, paromycine, acide nalidixique, chlorure de lithium, mupirocine
mCol	CAB	Acide propionique
Ecobion 2	CAB	Chlorure de lithium, néomycine
DP medium	CAB	Acide propionique, dicloxacilline
mCol	CAB	Cystéine-HCl, raffinose
LP agar	LCL	Chlorure de lithium, propionate de sodium
RAF 5.1 medium	mCol	Raffinose, chlorure de lithium, propionate de sodium
RB medium		Chlorure de lithium, propionate de sodium,
BFM		Bleu de méthylène, acide propionique, chlorure de lithium
Galactose agar		Galactose, chlorure de lithium
BS	BL	Chlorure de lithium, paromycine, néomycine, propionate de sodium
BIM-25	RCA	Acide nalidixique, polymixine B, kanamycine, acide iodoacétique, chlorure 2-3-5 triphenyltetrazolium
AMC	RCM	Acide nalidixique, polymixine B, kanamycine, acide iodoacétique, chlorure de 2-3-5 triphenyltetrazolium

#### **2.1.4 Le pouvoir pathogène de *Bifidobacterium***

Le genre *Bifidobacterium* ne possède aucune endotoxine ou exotoxine pouvant causer des infections. Par contre, *B. dentium* possède un fort pouvoir acidogène lié à son métabolisme, ce qui peut causer chez l'hôte des irritations locales (cystites hémorragiques) ou la destruction de composés organiques tels l'émail et la dentine des dents (caries dentaires) (Mitzi et al., 2002; Crociani et al., 1996). Une étude propose aussi *B. longum* comme responsable de certains cas de septicémie (Ha et al., 1999).

#### **2.2 Le devenir de *Bifidobacterium* dans l'eau**

Cette bactérie d'origine fécale (Mackie et al., 2002) représente le troisième groupe de bactéries en importance dans l'intestin humain (Charteris et al., 1997) et se retrouve en général en concentration supérieure par rapport aux autres bactéries ( $10^{10}$  cellules par gramme) (Nebra et al., 2001). Ainsi, elle devrait se retrouver dans les cours d'eau en quantité suffisante pour y être détectée (Resnick et al., 1981a; Lynch et al., 2001). Certains facteurs du milieu, énumérés ci-dessous, peuvent affecter l'état et la durée de vie de *Bifidobacterium* dans l'eau.

**Température:** Il a été démontré que la température de l'eau joue un rôle important dans les concentrations de *B. adolescentis* et *B. longum* retrouvées en fonction du temps dans l'eau salée ou fraîche (Resnick et al., 1981a).

**Chloration:** Il a aussi été démontré qu'une chloration de l'eau a un effet considérable à la baisse sur le degré de survie de *Bifidobacterium* dans l'eau dû à l'oxydation intense produite par le chlore (Resnick et al., 1981a).

**Eutrophisation:** L'anaérobiose du milieu aquatique (causée par un apport de matières organiques et de phosphore d'origine naturelle ou anthropique) permet une meilleure conservation à l'état cultivable de *Bifidobacterium* (Carrillo et al., 1985).

**Dureté de l'eau:** Il existe une corrélation positive entre la dureté de l'eau et la présence de *Bifidobacterium* spp. dans les cours d'eau (Carrillo et al., 1985).

**Prédation, substances antimicrobiennes et lumière:** L'effet des radiations lumineuses et de la prédation des autres organismes qui peuplent les cours doivent aussi être considérés comme des facteurs pouvant influencer la présence et la survie de *Bifidobacterium* dans les cours d'eau (Rhodes et al., 1999).

En bref, les bifidobactéries subissent un énorme stress oxydatif interdisant leur croissance lorsqu'elles sont rejetées dans l'environnement et lorsqu'elles entrent en contact avec l'eau (Mara et al., 1983). La survie de *Bifidobacterium* dans un environnement aquatique naturel varie beaucoup d'une étude à l'autre. Certains auteurs parlent d'ailleurs d'un maximum de neuf jours de survie dans une eau tempérée (10° Celsius) (Rhodes et al., 1999). Cette courte durée de vie dans l'eau permettrait d'associer *Bifidobacterium* à une pollution fécale récente (Lynch et al., 2001; Scott et al., 2002; Mara et al., 1983).

## **2.3 Utilisation de *Bifidobacterium* comme un indicateur d'une pollution fécale et permettant l'identification de la source contaminante**

### **2.3.1 Historique**

L'on doit à D.A.A. Mossel (Mossel, 1958) l'originalité d'utiliser des bifidobactéries comme indicateurs d'une contamination fécale. Ce genre bactérien est présent en grande concentration dans la matière fécale humaine et animale (Lynch et al., 2001; Bahaka et al., 2001; Munoa et al., 1988). Sa concentration est de 10 à 100 fois supérieure celle des coliformes. De ce fait, il représenterait un bon indicateur d'une contamination fécale dans les cours d'eau (Mara et al.; 1983; Lynch et al., 2001). L'association de *Bifidobacterium* avec une contamination fécale des cours d'eau a d'ailleurs permis de mettre en évidence le début de la présence humaine en Nouvelle-Zélande, via l'identification de certaines espèces de bifidobactéries dans les sédiments aquatiques (Welikala et al., 2001).

### **2.3.2 Critères d'un indicateur utilisé dans le suivi des sources microbiennes et pathogènes dans les écosystèmes aquatiques**

Pour porter le titre de microorganisme indicateur de la source de contamination fécale d'un cours d'eau, *Bifidobacterium* doit répondre aux critères énoncés précédemment à la section 1.5.1.

### **2.3.3 Utilisation de *Bifidobacterium* permettant l'identification la source de contamination fécale**

Plusieurs études indiquent une distribution unique des espèces de bifidobactéries chez les organismes à sang chaud (Scardovi et *al.*, 1974), ce qui permet leur utilisation comme bioindicateurs permettant de distinguer l'origine animale ou humaine de la pollution (Mara et *al.*, 1983).

Afin de pouvoir utiliser les bifidobactéries avec succès comme indicateurs, un bon classement des espèces selon l'hôte est primordial. Gavini propose une classification contenant sept groupes distincts d'espèces de bifidobactéries, divisés en vingt sous-groupes, sur une base phénotypique (Gavini et *al.*, 1991). Les principales bifidobactéries associées au genre humain sont : *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. angulatum*, *B. breve*, *B. longum* biovar *infantis*, *B. longum* *B. bifidum*, *B. denticolens*, *B. gallicum*, *B. inopinatum*. D'autres bifidobactéries sont plutôt associées au genre animal : *B. longum* biovar *suis*, *B. thermophilum*, *B. choerinum*, *B. boum*, *B. animalis*, *B. magnum*, *B. pseudolongum* (sous-espèces *pseudolongum* et *globosum*), *B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. merycicum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*. (Krzewinski, 1997). Les espèces *B. longum* biovar *lactis*, *B. minimum*, *B. subtile* et *B. thermacidophilum* ont été principalement isolées d'eaux usées.



#### **2.3.4 L'état des connaissances sur l'utilisation de *Bifidobacterium* dans le suivi des sources microbiennes et pathogènes de contamination dans les écosystèmes aquatiques**

L'isolement, l'identification et l'énumération des bifidobactéries demandent beaucoup de temps et de manipulations complexes (anaérobiose) nécessitant le développement de milieux de culture adaptés, électifs, sélectifs et différentiels, ce qui a grandement limité l'utilisation de ce genre bactérien comme indicateur. De plus, on a constaté avec le temps que l'identification classique des espèces basée sur le phénotype des bactéries donne des résultats douteux (Matsuki et *al.*, 1999).

Présentement, il n'existe aucune méthode standardisée pouvant isoler de manière fiable *Bifidobacterium* provenant d'échantillons environnementaux et alimentaires. De nombreux milieux ont été élaborés et proposés (décrits et résumés précédemment) afin de sélectionner cette bactérie pour ensuite l'enrichir. La recherche scientifique sur l'utilisation en environnement de *Bifidobacterium* est concentrée sur la conception de milieux de culture permettant la croissance optimale du plus grand nombre d'espèces de *Bifidobacterium* (Nebra et *al.*, 1999; Rhodes et *al.*, 1999) et sur l'application des techniques de biologie moléculaire soit de PCR (Wang et *al.*, 1996; Matsuki et *al.*, 1998; Roy et *al.*, 2001; Bernhard et *al.*, 2000), de PCR multiplexe (Ventura et *al.*, 2001; Mullié et *al.*, 2003), d'hybridation *in-situ* (Kaufmann et *al.*, 1997; Harmsen et *al.*, 1999), de PCR-ARDRA (Ventura et *al.*, 2001) ainsi que de PCR-DGGE (Temmerman et *al.*, 2003; Requena et *al.*, 2002) afin de confirmer rapidement le genre *Bifidobacterium* et l'espèce.

#### **2.3.5 Identification de *Bifidobacterium***

L'indication qu'une colonie isolée appartient au genre *Bifidobacterium* et l'identification de l'espèce nécessite généralement trois étapes (Delcenserie et *al.*, 2002): la détection, une confirmation du genre et la détermination de l'espèce. Ces trois étapes peuvent être faites par biochimie ou par biologie moléculaire.

### **2.3.5.1 Identification biochimique du genre *Bifidobacterium***

Le test de la fructose-6-phosphate-phospho-kétolase (F6PPK) est le moyen classique le plus efficace d'identifier le genre *Bifidobacterium* (Delcenserie et al., 2002). Dans le groupe des bactéries Gram positif anaérobies ayant une morphologie pseudobifide comme les *Arthrobacter*, les *Propionibacterium*, les *Corynebacterium* et le *Actinomyces*, cette enzyme est uniquement présente chez *Bifidobacterium*. La formation d'acetylphosphate à partir de fructose-6-phosphate est détectée par l'apparition d'une coloration rouge-violet due à la transformation du chélate ferrique en sa forme hydroxamate.

### **2.3.5.2 Identification moléculaire du genre *Bifidobacterium***

Chaque organisme vivant possède une séquence génomique qui lui est propre. À partir de cette séquence, une région ou un gène peut être identifié comme étant spécifique à l'organisme et ainsi déterminer le genre. Afin de vérifier la spécificité d'une séquence génétique pour un organisme, celle-ci est comparée avec les séquences d'autres organismes répertoriés dans différentes banques génomiques. La séquence est alors dérivée, soit en une amorce pour une amplification en chaîne par polymérase (PCR), soit en une sonde d'oligonucléotides permettant de cibler le genre *Bifidobacterium*.

La biologie moléculaire peut être utilisée à différents niveaux selon l'objectif visé. La technique moléculaire variera selon que l'on veuille identifier le genre (Matsuki et al., 2002), l'espèce (Mullié et al., 2003) ou les variations génétiques internes (Ventura et al., 2001; Roy et al., 2000; Requena et al., 2002; Temmerman et al., 2003) dans le temps d'une espèce bactérienne.

La détermination du genre *Bifidobacterium* peut-être fait par PCR en utilisant des amorces spécifiques à ce genre. La pratique d'un PCR demande préalablement l'isolation de l'ADN génomique bactérien bien conservé et en quantité suffisante. Il existe plusieurs protocoles pour *Bifidobacterium* permettant d'extraire et de purifier l'ADN de ce type de bactérie. L'extraction peut se faire par l'utilisation de hautes températures, par la sonication (ultrason), par la lyse cellulaire à l'aide d'enzymes (Kaufmann et al., 1997) (lysozyme protéinase K) ou encore par l'utilisation des billes de verre (Bernhard et al., 2000). Suite à l'extraction de l'ADN, une purification est faite par

une série de lavages avec des solutions de phénol-chloroforme et de chloroforme iso-amyle. Une précipitation de l'ADN dans l'éthanol termine le processus d'extraction. L'ADN précipité est alors amplifié par PCR en utilisant des amorces ciblant le genre (Roy et *al.*, 2000; Bernhard et *al.*, 2000; Ventura et *al.*, 2001). Une réaction PCR demande plusieurs cycles de températures variables permettant l'ouverture du brin d'ADN bicaténaire, l'hybridation des amorces et la polymérisation d'un brin complémentaire.

L'utilisation de sondes moléculaires pour l'identification du genre bactérien peut se faire de deux façons, soit à l'aide de sondes immobilisées sur un support physique appelé puce à ADN, soit par l'hybridation sur membrane de colonies par des sondes mobiles en solution (Lynch et *al.*, 2002). Les puces à ADN conçues pour détecter la présence de *Bifidobacterium* provenant d'échantillons environnementaux sont encore peu utilisées (Wang et *al.*, 2002). Ces puces sont généralement utilisées dans l'analyse transcriptomique, le transcriptome étant l'ensemble des ARN messagers transcrits à partir du génome.

L'approche la plus utilisée à ce jour dans l'identification du genre *Bifidobacterium* dans un contexte environnemental reste l'hybridation sur membrane des colonies. L'hybridation de colonies cultivées ou transférées à partir de membranes de filtration sur une membrane d'hybridation nécessite préalablement la dénaturation de la paroi cellulaire et l'enlèvement des constituants intra-cellulaires (à l'aide de lysozyme, protéinase K, solution NaOH). L'ADN contenu à l'intérieur des bactéries est ensuite fixé sur les membranes d'hybridation pré-chargées négativement à l'aide de rayons ultraviolets. Les membranes ayant leurs molécules d'ADN fixées et dénaturées (par la chaleur) sont trempées dans un bain de tampon contenant des sondes marquées libres. Les membranes sont ensuite incubées à température plus basse pour permettre la renaturation de l'ADN. Les sondes ayant une séquence complémentaire à celle d'une portion de l'ADN fixé s'hybrideront. On lave ensuite les membranes afin d'éliminer le surplus de sondes non-hybridées. Les sites sur les membranes où il y aura eu appariement "ADN-sondes" seront visualisées soit par autoradiographie, chimiluminescence ou par colorimétrie (Kaufmann et *al.*, 1997; Lynch et *al.*, 2002).

### 2.3.5.3 Identification des espèces de *Bifidobacterium*

Il existe plusieurs méthodes afin d'identifier l'espèce de *Bifidobacterium*. Mara, proposent un test biochimique permettant de différencier vingt espèces de *Bifidobacterium* selon la fermentation de différentes sources de carbone (voir tableau 5) (Mara et al, 1983).

Tableau 5 : Test biochimique permettant l'identification des espèces de *Bifidobacterium*.

Espèces	Bases du substrat									
	Arabinose	Cellobiose	Gluconate	Lactose	Mannitol	Melezitose	Ribose	Sorbitol	Amidon	Xylose
<i>B. bifidum</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	+	+	+	+	V	V	+	V	V	+
<i>B. catenulatum</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>B. angulatum</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>B. dentium</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>B. longum</i> biovar <i>infantis</i>	-	V	-	+	-	-	+	-	V	-
<i>B. breve</i>	-	+	-	+	+	V	+	+	V	-
<i>B. parvulorum</i>	-	V	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>B. longum</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	V	+
<i>B. pseudolongum</i>	+	V	-	V	-	-	+	-	+	+
<i>B. longum</i> biovar <i>suis</i>	+	V	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>B. asteroïdes</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>B. indicum</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. coryneforme</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>B. magnum</i>	+	-	-	+	-	-	+	Nt	-	+
<i>B. globosum</i>	V	V	-	+	V	-	+	-	Nt	V
<i>B. ruminale</i>	V	-	-	-	-	-	Nt	-	Nt	V
<i>B. thermophilum</i>	-	V	-	V	-	V	-	-	+	-

Adapté de Mara et al., 1983.

V : Variable                      Nt : Non-testé

Tout comme pour l'identification du genre *Bifidobacterium*, l'espèce peut être précisée à l'aide de la biologie moléculaire. Cette distinction peut être faite notamment par PCR (Wang et al., 1996; Matsuki et al., 1998; Mullié et al., 2003, Harmsen et al., 1999) ou par sondes moléculaires utilisant la digoxigénine ou le DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) comme révélateur. Une liste exhaustive des amorces ainsi que des sondes utilisées jusqu'ici est présentée en annexe.

### 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 3.1 Microorganismes utilisés

Les quatre espèces bactériennes étudiées et utilisées dans ce projet appartiennent au genre *Bifidobacterium* (voir tableau 6). Suite à la réception des souches pures, des cultures en laboratoire ont été faites afin de pouvoir augmenter la biomasse de ces souches. Une fois les cultures pures produites, celles-ci ont été conservées sous une forme lyophilisée et congelée. Le choix des souches s'est fait afin d'avoir deux modèles de bifidobactéries provenant de fèces humaines ainsi que deux modèles provenant de fèces animales.

Tableau 6 : Les souches de bactéries de la microbiote gastro-intestinale étudiées ainsi que leur provenance

Noms	Codes	Sources	Origines
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703	ATCC	Intestin humain adulte
<i>Bifidobacterium animalis</i>	ATCC 25527	ATCC	Fèces de rats
<i>Bifidobacterium globosum</i>	ATCC 25865	ATCC	Rumen de bovins
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 15707	ATCC	Intestin humain adulte

#### 3.2 Le milieu de culture utilisé pour la lyophilisation

Le milieu «Reinforced» *Clostridium Media* (RCM) (Difco Laboratory, Michigan, USA) a été utilisé pour le premier passage des souches pures destinées à la lyophilisation. Ce milieu est celui recommandé pour la croissance des bifidobactéries par l'ATCC.

##### 3.2.1 Lyophilisation des souches pures de *Bifidobacterium*.

La lyophilisation de cultures pures provenant de l'ATCC est basée sur le protocole du laboratoire de santé publique du Québec MT-02 entré en vigueur le 1 avril 1999.

### **3.2.2 Préparation des cultures pures pour la lyophilisation**

Afin d'être lyophilisées, les souches pures de *Bifidobacterium* provenant de l'ATCC ont subi une croissance en tube à l'abri de la lumière de 48 heures en absence d'oxygène à une température constante de 37°C. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 3000 rotations par minute (rpm) pendant 8 minutes à 4°C. Une fois le surnageant retiré, une solution stérile de lait écrémé à 20% (g/v) a été ajoutée au culot dans une proportion de 2 : 1. Cette solution a par la suite été légèrement agitée afin d'assurer l'homogénéité de la solution bactérienne avec le lait écrémé. Ces tubes ont été conservés au réfrigérateur dans un sac anaérobie (gaz pouch, Oxoid) jusqu'à ce que le lyophilisateur atteigne une pression équivalent à 15-20 µm de mercure (18 à 24 heures).

### **3.2.3 Lyophilisation des cultures pures**

Après avoir aliquoté la culture bactérienne (0.5 ml = 13 gouttes d'une pipette pasteur stérile par ampoule) dans des ampoules à lyophilisation, ces dernières ont été déposées dans une solution de glace sèche et d'éthyl cellosolve provoquant une congélation rapide de la culture. Les ampoules, enduites légèrement de silicone à leur ouverture, ont par la suite été connectées au lyophilisateur en s'assurant que le niveau de congélation soit maintenu dans les premiers instants. La lyophilisation s'est poursuivie pendant 24 heures en conservant un vide de 15-20 µm de mercure. Suite à la lyophilisation des ampoules, celles-ci ont été scellées à l'aide d'une torche à double embout, identifiées et conservées à -80 °C.

### **3.2.4 Tests de pureté**

L'inoculation sur gélose sang et l'incubation en conditions anaérobies et aérobies du contenu d'une ampoule de chacune des espèces de *Bifidobacterium* lyophilisées provenant de l'ATCC ont été faites afin de montrer la présence d'une possible contamination. Lors de ces tests, la vérification portait sur l'homogénéité des colonies capables de croître en conditions anaérobies (observations au microscope) et sur l'absence de croissance bactérienne en conditions aérobies.

### **3.2.5 Congélation des souches pures de *Bifidobacterium* provenant de l'ATCC**

Afin d'être congelées, les souches pures de *Bifidobacterium* provenant de l'ATCC ont subi une croissance en tube de 48 heures en conditions anaérobies à une température constante de 37°C. Les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 8 minutes à 4°C. Une fois le surnageant retiré, le culot bactérien a été aliquoté dans des ampoules de congélation. Un volume de 800 µl de culot bactérien et 200 µl de glycérol stérile étaient déposés dans chaque ampoule. Un léger brassage manuel a précédé l'identification et la mise au congélateur (-80°C).

### **3.2.6 Le milieu de culture utilisé pour la congélation et pour les manipulations de routine**

Le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco Laboratory, Michigan, USA) est un milieu électif et riche pour *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Le polysorbate, l'acétate, le magnésium et le manganèse compris dans ce milieu sont considérés comme des facteurs de croissance favorisant la culture des bactéries lactiques. Le supplément d'hydrochloride monohydraté L-cystéine permet d'abaisser le potentiel d'oxydoréduction du milieu favorisant la culture des bifidobactéries et peut devenir une source essentielle d'azote (Roy et al., 2001).

### **3.3 Les milieux de croissance évalués pour *Bifidobacterium***

Quatre milieux de croissance ont été testés pour leur rendement de croissance par rapport aux espèces de *Bifidobacterium* et aussi pour leur potentiel de sélection vis-à-vis un échantillon environnemental. Ces milieux sont : MRS+++, MRS++++, MRSLC et BFM. L'annexe A présente les composantes et les conditions de stérilisation de ces milieux de culture.

#### **3.3.1 Préparation des milieux solides (gélés)**

Dans cette étude, les milieux de culture gélés ont servi au dénombrement, à l'isolement et à la purification de colonies bactériennes connues (ATCC) ou inconnues (rivières).

### **3.3.1.1 Le milieu commercial RCM**

Ce milieu a été préparé de la manière suivante. Tout d'abord, 58 grammes de RCA (Difco Laboratory, Michigan, USA) ont été déposés dans 1 litre d'eau milli-Q (ultra-pure). Le pH a ensuite été ajusté à 6.8 à l'aide de solutions acides ou basiques (HCl, NaOH). Après l'atteinte du pH désiré et l'ajout d'agar, le milieu a été chauffé sur une plaque chauffante et agitatrice jusqu'à ébullition. Le milieu a par la suite été autoclavé selon les conditions décrites à l'annexe A et coulé à chaud dans les boîtes de pétri sous une enceinte biologique stérile. Une fois tempérées, les boîtes de pétri ont été conservées au réfrigérateur (maximum 1 mois).

### **3.3.1.2 Les milieux ayant pour base le mélange commercial MRS**

La préparation des milieux ayant pour base le mélange commercial MRS (bouillon) était sensiblement identique d'un milieu à l'autre. Après l'addition du carbonate de sodium et du chlorure de calcium ou du thioglycolate de sodium et du chlorure de lithium selon le cas (MRS+++, MRS++++, MRSLC), un ajustement du pH a été fait. Le maintien continu des milieux sur des plaques agitatrices et chauffantes a été nécessaire afin de faciliter la dissolution des additifs et d'assurer l'homogénéité du pH et de la température. Après avoir ajouté l'agar, les milieux ont été portés à ébullition et autoclavés. Les milieux, une fois tiédifiés (50°C), ont été additionnés d'une solution concentrée et stérile (filtration à 0.45µm, millipore) de cystéine (0.5 g/litre de milieu) et coulés à chaud dans des boîtes de pétri. Une fois tempérés, les milieux ont été conservés au réfrigérateur (maximum 1 mois).

### **3.3.1.3 Le milieu BFM**

Ce milieu n'a aucune base commerciale. Tous les ingrédients (voir annexe A) ont été individuellement mesurés pour être par la suite ajoutés au volume d'eau milli-Q désiré. Pour ce milieu, la cystéine stérile (0.5 g/litre de milieu) et l'acide propionique ont été ajoutés de manière stérile après l'autoclavage du milieu. Le pH a été stabilisé à de 5.5 avec une solution concentrée de NaOH (conc. 6N). Le milieu BFM a par la suite été coulé à chaud, tempéré et conservé au réfrigérateur (maximum 1 mois).



### **3.3.2 Culture des milieux gélosés en anaérobiose**

Afin de faire croître *Bifidobacterium* dans des conditions anaérobies, les boîtes de Pétri ont été disposées à l'intérieur de jarres anaérobies cylindriques et/ou rectangulaires et/ou à l'intérieur de l'enceinte anaérobie (glove-box) pour y être incubées.

### **3.3.3 Préparation des milieux liquides de culture**

Les milieux liquides (voir annexe A) permettent la culture dans des tubes ou dans des bouteilles de sérum. Leur préparation est identique à celle des milieux gélosés mis à part l'ajout d'agar. Trois milieux ont été utilisés sous forme liquide, soit RCM, MRS+ et MRS+++ . Dans ce projet, l'utilisation des tubes de milieux liquides a surtout servi à l'augmentation de la biomasse des souches pures destinées à la lyophilisation et à la croissance de colonies bactériennes purifiées provenant des rivières. De plus, l'utilisation des milieux de culture dans des bouteilles de sérum a grandement facilité l'incubation des souches pures de l'ATCC congelées en permettant leur brassage continu dans un mélangeur incubateur (G24 environmental incubator shaker, New Brunswick scientific co.)

### **3.3.4 Préparation de tubes anaérobies de MRS et RCM**

Une fois les milieux liquides stérilisés et réduits (cystéine 0.5 g/litre de milieu), ceux-ci ont été aliquotés de manière stérile à raison de 5.5 ml de milieu par tube de 10 ml fermé avec des bouchons non étanches en plastique facilitant le transfert des gaz. Une fois inoculés, ces tubes ont été disposés dans un support et par la suite dans une jarre rectangulaire. L'anaérobiose dans ce type de jarres a été rendue possible par l'ajout de générateur de gaz anaérobies (BD GasPak™ EZ, ref : 260678) selon les conseils du fabricant. Un indicateur (Oxoid anaerobic indicator) a aussi été ajouté afin de s'assurer de l'anaérobiose de la jarre tout au long de l'incubation des tubes.

### **3.3.5 Préparation de bouteilles de sérum anaérobies contenant le milieu MRS**

La préparation du milieu MRS en bouteille de sérum est identique à celle en tube. Celle-ci s'est faite préalablement dans un flasque Erlenmeyer comprenant un barreau magnétique pouvant être inséré dans une jarre anaérobie cylindrique équipée de deux valves. Ces valves ont permis en alternance d'effectuer le vide et d'introduire un

mélange de gaz (10% de CO<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub> et 80% de N<sub>2</sub>) dans la jarre. Une fois le flasque placé dans la jarre scellée, celle-ci a alors été placée sur une plaque agitatrice pendant 20 minutes. Des lavages gazeux à toutes les 5 minutes ont permis d'obtenir le retrait de l'oxygène du milieu de culture. La jarre a par la suite été transférée dans une enceinte anaérobie (glove-box).

À l'intérieur de cette enceinte, le milieu a été aliquoté dans des bouteilles de sérum de volumes allant de 50 à 100 ml. Après avoir été bouchonnées et scellées, les bouteilles de sérum ont été autoclavées selon les mêmes conditions que les milieux gélosés (voir annexe A). Avant chaque utilisation (inoculation), du L-cystéine (concentration de 0.5 g/L.) a été ajouté à l'aide d'une seringue aux bouteilles de sérum afin d'assurer l'anaérobiose complète du milieu. La même procédure, sans ajout de cystéine, a été appliquée pour les bouteilles de sérum servant à la mesure du taux de décroissance de *B. animalis* en anaérobiose. Dans ce cas, l'eau de rivière ou le tampon remplaçait le milieu.

### **3.3.6 Évaluation des milieux face à la croissance de *Bifidobacterium***

Afin d'évaluer la croissance de *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. longum* et *B. globosum* sur les milieux RCA, BFM, MRS+++ , MRS++++ et MRSLC, une seule méthodologie a été suivie. Une première croissance a été réalisée en tube (MRS+++ ) pendant 36 heures en conditions anaérobies (bouteilles de sérum) à une température constante de 37°C à partir de cultures congelées. Un deuxième passage a été fait dans les mêmes conditions dans des bouteilles de sérum contenant 50 ml de MRS+++ afin d'obtenir une concentration suffisante de bactéries. Cinq cents microlitres de ce deuxième passage, prélevés de manière stérile à l'aide d'une seringue, a fait l'objet d'une série de dilutions (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup>) dans des tubes contenant 4.5 ml de tampon phosphate. Pour chacune des dilutions et pour chacune des quatre espèces, 750µl ont été étalés successivement, en triplicata, sur chacun des milieux à l'aide d'un hockey en verre stérile. Tout au long de ces manipulations, les tubes de dilution inoculés ont été conservés dans l'eau froide (environ 4°C) afin de limiter la perte de colonies. Une incubation de 48 heures à 37°C en conditions anaérobies a permis une croissance optimale des bactéries cultivables et par la suite le dénombrement visuel des unités formant des colonies (UFC).

### **3.4 Évaluation de l'effet d'une filtration sur la survie de *Bifidobacterium***

Afin d'évaluer l'effet d'une filtration sur les bifidobactéries provenant d'échantillons d'eau de rivières, des essais ont été faits préalablement sur des cultures pures de *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. longum* et *B. globosum*. Ces essais visaient la perte de cellules cultivables liée uniquement à la filtration et les pertes occasionnées par la combinaison d'une filtration et de l'utilisation d'un milieu sélectif (BFM). Suite à la croissance en bouteilles de sérum dans des conditions identiques de culture (24-48 heures, 37°C, noirceur, anaérobiose), 0.1 ml de chaque bouteille a alors été retranché pour être déposé dans un premier flasque Erlenmeyer contenant 99.9 ml de solution tampon stérile agité (barreau magnétique). Par la suite, 1 ml de solution tampon a été prélevé du flasque pour être dilué en série dans des tubes contenant 9 ml de solution tampon phosphate stérile. Suite aux dilutions, 1 ml de chaque tube a été ensemencé sur RCA selon la méthode DP (Drop plate method) (Herigstad et *al.*, 2001) ou filtré à l'aide d'une membrane de nitrocellulose HA (0.45 µm, Millipore) et déposé par la suite sur les milieux BFM et RCA. Le dénombrement s'est fait après une période de temps variant entre 48 et 72 heures d'incubation à partir d'une série de trois dilutions adéquates (100 colonies max.) consécutives chacune en duplicata.

### **3.5 Sélectivité des milieux de culture**

Un millilitre d'eau prélevé dans la rivière des Prairies a été filtré en quadruple exemplaire pour chacun des milieux RCA, MRS+++, MRSLC et BFM à l'aide de membranes en nitrocellulose HA (0.45 µm, Millipore). Suite à une incubation de 72 heures (conditions anaérobies, 37°C), le compte des unités formant des colonies (UFC) totales, une coloration Gram et une visualisation au microscope de 6 colonies choisies aléatoirement sur les milieux MRS +++, MRSLC et BFM ont été faits afin de déterminer rapidement les colonies appartenant au genre *Bifidobacterium*.

### **3.6 Vérification de la sélectivité reliée à la température d'incubation**

À partir des cultures pures de *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. longum* et *B. globosum*, trois températures d'incubation ont été expérimentées, ceci afin de déterminer la limite supérieure d'incubation permettant une différenciation possible entre les espèces liées généralement à l'humain (*B. adolescentis*, *B. longum*) et celles provenant des animaux

(*B. animalis*, *B. globosum*). L'utilisation d'une température élevée comme moyen possible de sélectionner des bifidobactéries généralement retrouvées chez les animaux tire son origine d'une étude effectuée par Gavini (Gavini et al., 1991). Dans cette étude, les espèces de bifidobactéries retrouvées généralement dans les fèces d'animaux ont pu être cultivées à une température de 45°C. Toujours dans cette étude, seule deux espèces humaines de collection, *B. catenulatum* ATCC 27539 et *B. pseudocatenulatum* DSM 20438, ont pu croître à une température de 45°C. Les cultures pures ont été inoculées sur BFM, RCA et MRS++++ en duplicata à raison de 3 ou 4 gouttes d'un volume de 10 µl de chaque espèce en culture pure. Aucun étalement sur chacun des duplicatas n'a été fait. Les boîtes de pétri ont ensuite été incubés à 37°C, 45°C et 46°C en aérobiose pendant 48 heures.

### **3.7 Mesure de la décroissance de *B. adolescentis* et de *B. animalis***

#### **3.7.1 Décroissance en conditions aérobies**

L'inoculation de trois bouteilles de sérum contenant 50 ml de MRS+ a été pratiquée à partir de cultures congelées. Après 48 heures d'incubation, à l'intérieur d'un agitateur maintenu à une température constante de 37°C, le contenu des bouteilles a été transvidé dans des tubes en polypropylène de 50 ml et ont été soumis à une centrifugation de 5 minutes à 4000 rpm (4°C). Les culots, une fois leur surnageant retiré, ont été combinés en une seule culture bactérienne. Cette culture a été divisée également en trois volumes identiques et ajoutée à trois bouteilles de 125 ml en verre (avec bouchons visseurs) contenant 50 ml de milieu liquide. Deux des trois bouteilles contenaient du tampon phosphate et l'autre de l'eau de la rivière l'Assomption filtrée stérilement (0.22 µm, Millipore). Seule une des deux bouteilles contenant du tampon et celle contenant de l'eau de rivière étaient équipées d'un barreau magnétique afin de reproduire l'agitation d'un cours d'eau naturel.

Une fois inoculées, les bouteilles fermées non hermétiquement étaient disposées sur des plaques agitatrices à l'intérieur d'une chambre à conditions contrôlées. Dans cette chambre, la noirceur, la température (20°C) et l'humidité (80%) étaient maintenues constantes. L'agitation des plaques était maintenue au minimum et un carton recouvrant

la surface des plaques agitatrices empêchait le contact direct bouteille-plaque pouvant augmenter la température du milieu liquide par friction. À chaque lecture, les bouteilles étaient transportées et conservées à l'intérieur d'une glacière en styromousse.

Pour chacune des mesures de décroissance, 1 ml était prélevé, à l'aide d'une pipette stérile, au contenu de chaque bouteille et subissait une série de dilution ( $10^0$ - $10^{-10}$ ) en tube. À partir de chaque tube, 250 µl étaient étalés à l'aide d'un hockey en verre stérile à la surface du milieu MRS+ gélosé. Les milieux étaient introduits par la suite à l'intérieur d'une enceinte anaérobie pour y être incubés à une température de 37°C pour une période allant de 48 à 96 heures dépendant de l'espèce de bifidobactéries.

### **3.7.2 Décroissance en conditions anaérobies**

La méthode suivie pour évaluer la décroissance en anaérobiose de *Bifidobacterium* diffère peu de celle utilisée pour mesurer la décroissance aérobie. Trois bouteilles de sérum ont été rendues anaérobies. Deux des trois bouteilles contenaient de l'eau stérile de la rivière l'Assomption et l'autre du tampon phosphate. Un volume de 500 µl d'un surnageant de lisier de porc (Laboratoire P. Juteau, lisier # 1N130204) stérile par double filtration à 0.22µm ont été ajoutés à l'une des deux bouteilles contenant de l'eau de rivière afin de simuler l'apport de contaminants agricoles dans un cours d'eau. L'inoculation de la culture bactérienne (*B. animalis*), tout comme l'ajout du lisier et le prélèvement de 1 ml servant au titrage, s'est faite de manière stérile (enceinte biologique) à l'aide de seringues stériles. Quotidiennement et tout au long de l'expérimentation, les bouteilles de sérum ont été agitées manuellement et de manière plus importante avant chaque titrage. Ce brassage a permis d'éviter la formation d'agrégats dans les volumes retirés pouvant fausser les données indiquant le nombre de colonies (UFC).

## **3.8 Biologie moléculaire**

### **3.8.1 Lieux d'échantillonnage**

Quatre sites d'échantillonnage ont été retenus pour vérifier la présence de *Bifidobacterium* dans des cours d'eau québécois (voir tableau 7). Les photos de chaque site sont disponibles à l'annexe H.

**Tableau 7 : Localisation des sites d'échantillonnage**

# des sites	Cours d'eau	Localisations	Zones d'activités
1	Achigan	St-Roch de l'Achigan	Agricole
2	L'Assomption	Repentigny	Agricole et urbaine
3	Des Prairies	Laval	Urbaine
4	St-Jean (ruis.)	St-Roch de l'Achigan	Agricole

### **3.8.1.1 Bassin versant de la rivière l'Assomption**

Les rivières l'Assomption et Achigan ainsi que le ruisseau St-Jean font tous partis du bassin versant de la rivière l'Assomption. Ce bassin est situé sur la rive nord du Saint-Laurent. Il draine une superficie de 4200 km<sup>2</sup> dont 3000 km<sup>2</sup> de territoire forestier et 1200 km<sup>2</sup> de territoire agricole. Il s'étend du nord au sud du massif du Mont-Tremblant jusqu'au Fleuve Saint-Laurent à la hauteur de Repentigny et de l'est à l'ouest de Joliette jusqu'à St-Jérôme (Corporation de l'aménagement de la rivière l'Assomption, 2005).

Les rejets urbains et industriels ont divers impacts dans le bassin de la rivière l'Assomption. Les rejets agricoles contribuent aussi à la contamination du milieu. Les productions animales dominantes dans le bassin de la rivière l'Assomption sont le porc, le bovin laitier et la volaille. À lui seul, le cheptel porcin représente plus de 50% des 73564 unités animales recensées dans le territoire. La production de matières fertilisantes d'origine animale atteint annuellement 5400 tonnes d'azote et de 1250 tonnes de phosphore dans ce bassin. Au niveau du sous-bassin de l'Achigan, le plus grand pôle d'élevage du bassin, plus de 2080 tonnes d'azote et de 500 tonnes de phosphore sont générées par année.

De façon générale, l'eau de la rivière l'Assomption et de ses tributaires se dégrade au fur et à mesure qu'elle descend vers l'embouchure du bassin. Au coeur de la zone plus forestière et naturelle du territoire, dans le secteur supérieur du bassin, la qualité de l'eau est bonne ou satisfaisante. Dans le secteur inférieur du bassin, là où se concentrent les

activités socioéconomiques, l'eau devient de mauvaise qualité. Les impacts sur l'environnement qu'ont les activités agricoles dans le bassin constituent une des causes de la dégradation visible de la qualité de l'eau à l'embouchure de la rivière l'Assomption (MDDEP, 2002a).

### 3.8.1.2 La rivière des Prairies

De l'autoroute 13 jusqu'au barrage de la centrale hydroélectrique Rivière-des-Prairies, les débordements des réseaux d'égout unitaire des municipalités de l'île de Montréal et de Laval viennent altérer la qualité de l'eau de la rivière des Prairies. La contamination par les coliformes fécaux et de manière moins importante par le phosphore total sont les deux causes principales de détérioration de la qualité de l'eau de cette rivière (MDDEP, 2002b).

### 3.8.2 Méthode d'échantillonnage

La collecte d'échantillons d'eau s'est toujours effectuée à plus de 3 mètres des berges et sous plus de 20 centimètres d'eau. En guise d'échantillonneur d'eau, une bouteille en plastique de 1 litre était insérée dans une demi-bouteille fixée à un bâton. L'heure et la prise de la température du cours d'eau ont été notées lors de chaque prélèvement.

### 3.8.3 Dates d'échantillonnage

Plusieurs campagnes d'échantillonnages ont permis d'obtenir des colonies présentes à l'état cultivable dans les cours d'eau. Ces campagnes sont résumées dans le tableau 8.

**Tableau 8 : Caractéristiques des moment d'échantillonnage**

Sites	Date	Température de l'eau (°C)	Informations complémentaires
3	08-04-04	2.5	Aucune pluie depuis 48 heures, eau trouble et jaunâtre
3	19-04-04	-	-
2	14-06-04	21.9	Pluie nuit et matin, eau trouble et brunâtre
1	14-06-04	21.8	Pluie nuit et matin, eau trouble et grisâtre
2	06-08-04	20.8	Aucune pluie depuis 24 heures, eau brunâtre
1	06-08-04	20.5	Aucune pluie depuis 24 heures, eau verdâtre
3	06-08-04	21.6	Aucune pluie depuis 24 heures, eau verdâtre
2	11-11-04	1.7	Aucune pluie depuis 24 heures, eau trouble
1	11-11-04	1.5	Aucune pluie depuis 24 heures, eau trouble
4	11-11-04	2.6	Aucune pluie depuis 24 heures, eau grisâtre

#### **3.8.4 Transport des échantillons d'eau**

Chaque bouteille d'eau d'un litre remplie jusqu'au goulot a été identifiée puis maintenue dans de la glace jusqu'à la filtration en laboratoire. Le traitement des échantillons en laboratoire s'est toujours effectué dans les trois heures suivant le prélèvement en rivière.

#### **3.8.5 Méthodes de filtration**

La filtration des échantillons a été faite à l'aide de membranes de nitrocellulose HA de 0.45  $\mu\text{m}$  sur un module de filtration de type manifolds. Des volumes d'eau de rivière de 1 ml, 10 ml, 100 ml ont été filtrés en duplicata et en triplicata afin d'obtenir des membranes ayant un nombre adéquat de colonies (25 à 100 UFC). Une fois le volume d'eau filtré, les membranes ont été déposées délicatement à l'aide de pinces stériles sur le milieu sélectif BFM gélosé. Les membranes ont été par la suite incubées selon diverses conditions dépendant des paramètres fixés pour chacune des expériences.

#### **3.8.6 Culture des souches bactériennes isolées de cours d'eau**

Les colonies isolées récupérées des membranes incubées sur BFM ont été purifiées par trois passages successifs sur MRS+ (anaérobiose, 37°C, 72h, noirceur). Une fois purifiées, les colonies ont été cultivées en tube afin d'obtenir une biomasse suffisante pour l'extraction de l'ADN génomique. De plus, un test de croissance en présence d'oxygène sur MRS+ a été effectué sur les colonies purifiées afin de déterminer les colonies anaérobies strictes.

#### **3.8.7 Culture différentielle basée sur la température visant les espèces animales**

Afin de voir le potentiel d'une incubation à haute température pour sélectionner les espèces de bifidobactéries ayant pour hôte un animal, des tests ont été faits à partir d'échantillons d'eau provenant des rivières l'Assomption, Achigan, et du ruisseau St-Jean. Des volumes d'eau allant de 0.1ml à 200ml ont été filtrés et incubés sur BFM. L'incubation en anaérobiose s'est faite dans un premier temps à une température de 45°C pendant 48 heures et ensuite à 37°C pendant 48 heures afin d'augmenter la biomasse des colonies ayant survécu à la première partie de l'incubation. Une coloration Gram et un test de croissance en présence d'oxygène sur MRS+ ont permis d'éliminer



plusieurs colonies pour ne conserver que celles répondant, en partie, à la définition du genre *Bifidobacterium*, soit anaérobie stricte et Gram positif. Les colonies sélectionnées ont subi une analyse moléculaire.

### **3.9 Extraction de l'ADN génomique des isolats de rivières**

L'extraction de l'ADN s'est faite à partir de culots obtenus en tube suite à la purification des colonies bactériennes isolées. Le protocole d'extraction suivi est tiré de Lévesque (Lévesque et *al.*, 1997). Trois modifications à ce protocole ont dû être apportées : il y a eu remplacement du tampon TEP de cette méthode par un tampon TEN (voir annexe D), ajout de sulfate de sodium dodecyle (SDS) lors de la lyse mécanique et omission de la colonne de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Les étapes d'extraction ont été séparées en trois : le broyage, l'enlèvement des impuretés et la précipitation de l'ADN. La méthode proposée ici permet d'obtenir une lyse de la paroi cellulaire sans altérer le matériel génétique intracellulaire.

#### **3.9.1 Le broyage des cellules bactériennes**

Afin d'obtenir une lyse de la paroi cellulaire, 250 mg de billes de verre stériles, 250 µl de tampon TEN autoclavé et 20 µl d'une solution de SDS à 20% ont été ajoutés aux culots des vials (A). Les tubes ont ensuite été placés dans un appareil de lyse cellulaire (FastPrep FP120 Bio 101, Thermo savant). Deux séquences de deux broyages (vitesse : 4, 40 secondes) ont été nécessaires pour obtenir une quantité suffisante d'ADN. Entre chaque broyage, les tubes d'extraction ont été maintenus sur glace afin d'abaisser la température accumulée lors du broyage. À la fin de chaque séquence, les tubes ont été centrifugés pendant 15 minutes à une vitesse de 13 000 rpm. Suite à ces centrifugations, le surnageant a été récupéré.

#### **3.9.2 L'enlèvement des impuretés**

L'enlèvement des protéines et autres résidus cellulaires a été effectué en deux étapes. Tout d'abord, il y a eu l'ajout de 500 µl d'un mélange de phénol : chloroforme : alcool isoamyle (25 :24 :1) au surnageant. Un brassage manuel modéré et une centrifugation (7 minutes, 13 000 rpm) suivie par la récupération de la phase. La seconde étape est identique à la précédente à l'exception qu'une solution de chloroforme : alcool isoamyle

(24 : 1) remplace celle de phénol : chloroforme : alcool isoamyle, et que le brassage des eppendorfs s'est fait par inversions lentes (10 fois). La centrifugation des tubes pendant 5 minutes à 13 000 rpm est venue terminer l'enlèvement des impuretés.

### **3.9.3 La précipitation de l'ADN**

La phase aqueuse récupérée déposée dans de nouveaux tubes . À ces derniers ont été ajoutés 500 µl d'alcool à 95% glacé afin de précipiter l'ADN. Suite à l'ajout de l'alcool, les échantillons ont été conservés au congélateur (-20°C) sur une période allant de 24 à 48 heures. Après cette période, ceux-ci ont été centrifugés pendant 15 minutes à 13 000 rpm afin d'obtenir des culots de couleur blanchâtre. Le retrait de l'alcool a dû être fait à l'aide de tips stériles afin d'éviter le décollement accidentel du culot. À cette étape, les culots devaient être débarrassés des sels provenant des solutions utilisées dans les étapes précédentes. Pour cette raison, 500 µl d'alcool à 70% a été ajouté (les tubes contenant les culots étaient maintenus sur glace). La centrifugation (3 minutes, 13 000 rpm), le retrait du surnageant, le séchage des culots et la suspension des culots secs dans 50 µl d'eau ultra-pure sont venus terminer le processus d'extraction de l'ADN génomique des colonies isolées des sites #1, 2, 3 et 4.

### **3.9.4 Dosage de l'ADN et dilution de l'ADN génomique**

Deux méthodes ont permis d'estimer la concentration d'ADN, soit celle de la mesure de l'absorbance à 260, 280 nm et celle de la comparaison de l'intensité des bandes d'ADN génomique des isolats de rivières sur gel d'agarose à celui d'un standard λ Sty (voir annexe B).

#### **Équation 1: Estimation de la concentration d'ADN génomique**

$$((DO_{260} - DO_{280}) \times 100) \times \text{facteur de dilution} = \text{ADN } \mu\text{g/ml}$$

L'ADN génomique était par la suite dilué dans de l'eau ultra-pure afin d'avoir une concentration approximative de 100 µg/µl.

### **3.10 Réaction en chaîne par polymérase sur les isolats de rivière**

#### **3.10.1 Les amorces utilisées**

Afin de pouvoir identifier le genre *Bifidobacterium* et certaines espèces de *Bifidobacterium*, plusieurs paires d'amorces ont été utilisées (voir annexe C).

#### **3.10.2 Les réactifs utilisés**

Un mélange identique de réactifs a été utilisé pour chaque réaction de PCR (voir annexe D).

#### **3.10.3 Les programmes d'amplification**

Une combinaison de 4 programmes d'amplification (décrits à l'annexe E) a été utilisée sur deux appareils disponibles à l'Institut Armand-Frappier. Ces deux appareils sont le Robocycler gradient 96 (Stratagene) et le Gene AMP® PCR System 2700 (Applied Biosystems). Pour les projets menés dans cette étude, les résultats obtenus sur ces deux appareils sont identiques dans les mêmes conditions.

#### **3.10.4 Migration sur gel des produits de PCR et de digestion enzymatique**

##### **3.10.4.1 Préparation du gel d'agarose**

Le type de gel d'agarose pouvait varier selon la résolution désirée et la longueur des fragments attendus. Un gel de routine de 1% d'agarose était constitué de 1 g d'agarose pour 100 ml d'eau ultra-pure (Milli-Q). Le mélange était chauffé dans un micro-onde (puissance maximum) pendant 1 minute et 20 secondes pour ensuite être tempéré et versé dans un moule en plastique muni d'un peigne formant des puits.

##### **3.10.4.2 Volume déposé sur gel d'agarose**

Afin de visualiser sur gel avec des enzymes de restriction les résultats provenant de l'amplification ou de la digestion enzymatique, 2 µl de produits de réaction étaient additionnés de 5 µl d'un tampon de chargement (3 ml de glycérol, 7 ml d'eau ultra-pure stérile, 0.025 g de xylène cyanol FF, 0.025 g bromophénol bleu) avant d'être déposés dans les puits du gel d'agarose.

### **3.10.4.3 Conditions d'électrophorèse**

Le courant électrique appliqué au gel était de 80 milliampères durant environ 1,5 heures, dépendant de la grandeur et du pourcentage d'agarose du gel.

### **3.11 PCR-RFLP «Random fragment length polymorphism»**

Dans cette étude, la technique "PCR-RFLP" a été appliquée aux colonies n'ayant pu être identifiées par PCR. Elle comporte deux étapes permettant de mettre en évidence les différences génétiques entre les espèces inconnues. La première consiste à amplifier ou «photocopier» le gène fait par PCR à l'aide d'une amorce ciblant l'ADN ribosomal de la sous-unité 16S (ADNr 16S). Cette étape a été faite à l'aide des amorces P0-P6 (Ventura *et al.*, 2001). La seconde étape permet de différencier les ADN amplifiés en utilisant des enzymes de restriction. Chaque réaction de digestion était composée d'une solution de 12 µl d'ADN (100 nanogramme/µl) provenant d'une colonie, de 1 µl de tampon 10XH, de 1 µl d'enzymes Sau 3AI et de 6 µl d'eau ultra-pure. La digestion était faite sur une période de 18 heures au bain-marie (37°C). Par la suite, 20 µl du produit de la digestion combinés à 5 µl de tampon de chargement ont été déposés dans un gel d'agarose (1%) creusé de puits. L'électrophorèse a permis de visualiser des fragments d'ADN caractéristiques pour chaque colonie et ainsi offrir la possibilité de regrouper les isolats ayant la même signature. Un représentant de chaque regroupement a ensuite été envoyé au séquençage après avoir été amplifié (élongation seulement) par l'amorce P0.

#### **3.11.1 Séquençage des isolats inconnus provenant des rivières**

Le séquençage de l'ADN de certains isolats s'est fait au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill (Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, 2005). La préparation du matériel génétique s'est faite selon les recommandations de ce centre et en utilisant P0 comme amorce d'élongation.

## 4 RÉSULTATS

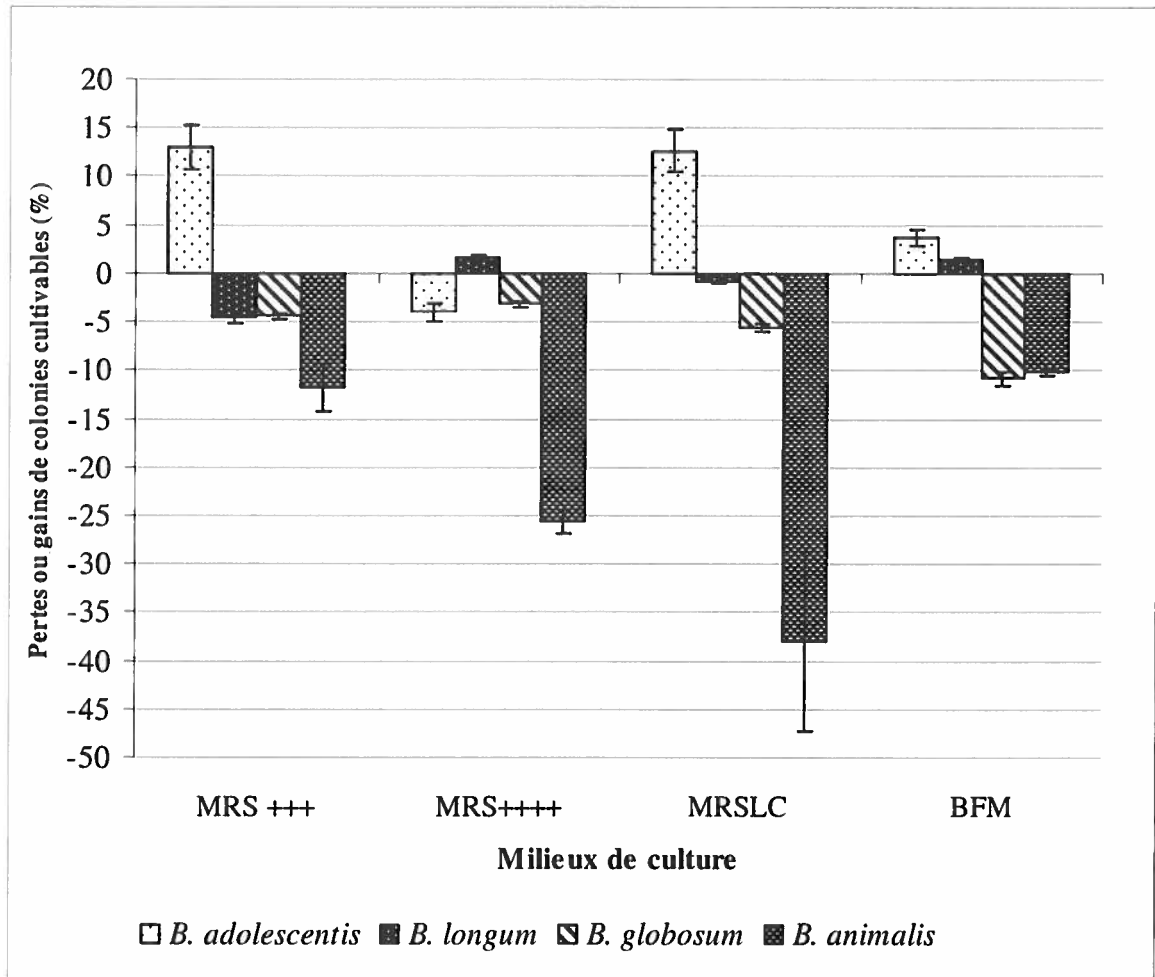
L'objet de ce projet visait à vérifier la possibilité d'utiliser *Bifidobacterium* comme un moyen efficace de différencier les sources de pollution fécale dans les eaux de surface. Pour ce faire, ce projet devait élaborer initialement une méthode de croissance des bifidobactéries inspirée de la littérature et de l'expertise développée à l'Institut Armand-Frappier. Par la suite, le choix d'une stratégie de biologie moléculaire simple devait permettre l'identification du genre et ensuite des espèces de bifidobactéries. Afin de permettre une meilleure compréhension des résultats obtenus à partir des prélèvements en rivière, la survie de *Bifidobacterium* devait aussi être évaluée sous différentes conditions abiotiques.

### 4.1 L'évaluation de la croissance de *Bifidobacterium* sur divers milieux

La croissance de bactéries en laboratoire se fait généralement par l'utilisation de milieux de culture. Le choix des composantes d'un milieu de culture et les conditions d'incubation permettent une sélection des microorganismes. Plusieurs milieux décrits dans la littérature assurent la croissance des bifidobactéries. Par contre, il n'existe encore aucun milieu de culture suffisamment sélectif pour isoler les bifidobactéries provenant d'échantillon d'eau. Dans cette étude, le choix du milieu a été fait en deux étapes. La première étape a permis de définir le milieu permettant la croissance du plus grand nombre de colonies des différentes espèces de bifidobactéries disponible. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de gain ou de perte du nombre d'unités formant des colonies (UFC) sur les différents milieux de culture comparativement au nombre d'UFC retrouvées, pour chacune des espèces de bifidobactéries évaluées, à la surface du milieu de culture RCA. Les résultats (voir graphique 1 et résultats détaillés à l'annexe L) montrent que l'ensemble des milieux testés permettent la croissance des quatre espèces de *Bifidobacterium* étudiées (*B. adolescentis*, *B. longum*, *B. globosum* et *B. animalis*). La croissance de *B. adolescentis* a été favorisée dans tous les milieux à l'exception du milieu MRS++++, où le thioglycolate de sodium a été utilisé comme un agent fort de réduction. Les données obtenues montrent que le nombre d'UFC des deux espèces de bifidobactéries d'origine animale (*B. globosum* et *B. animalis*) était plus faible que celui

des espèces humaines de bifidobactéries (à l'exception de *B. adolescentis* dans le milieu MRS ++++ et de *B. longum* dans le milieu MRS+++ ) et variable d'un milieu à l'autre. La deuxième étape a mesuré le caractère sélectif des milieux de culture soumis à un échantillon environnemental.

**Graphique 1. Effet du milieu de culture sur *Bifidobacterium***



## 4.2 La sélectivité des milieux

Suite à l'évaluation de la croissance des différentes souches de bifidobactéries sur les milieux retenus dans cette étude, une appréciation du caractère sélectif de ces milieux a été faite avec l'utilisation d'un échantillon d'eau de rivière. Cet échantillon représente une culture mixte de microorganismes. Le dénombrement des colonies à la surface des milieux MRS +++, MRS +++, MRSLC et BFM et la visualisation au microscope de colonies choisies aléatoirement pouvant appartenir au genre *Bifidobacterium* (croissance en anaérobiose, morphologie en "Y", coloration Gram positif) ont permis d'évaluer sommairement les milieux de culture et de constater que les milieux riches RCA et MRS+++ permettaient la croissance d'une grande diversité de bactéries ne possédant pas les caractères distinctifs des bifidobactéries décrits précédemment. Le milieu BFM présentait, d'un autre côté, le pourcentage le plus élevé de colonies répondant à la définition partielle des bifidobactéries, soit anaérobiose stricte, morphologie en "Y" et coloration Gram positif (tableau 9).

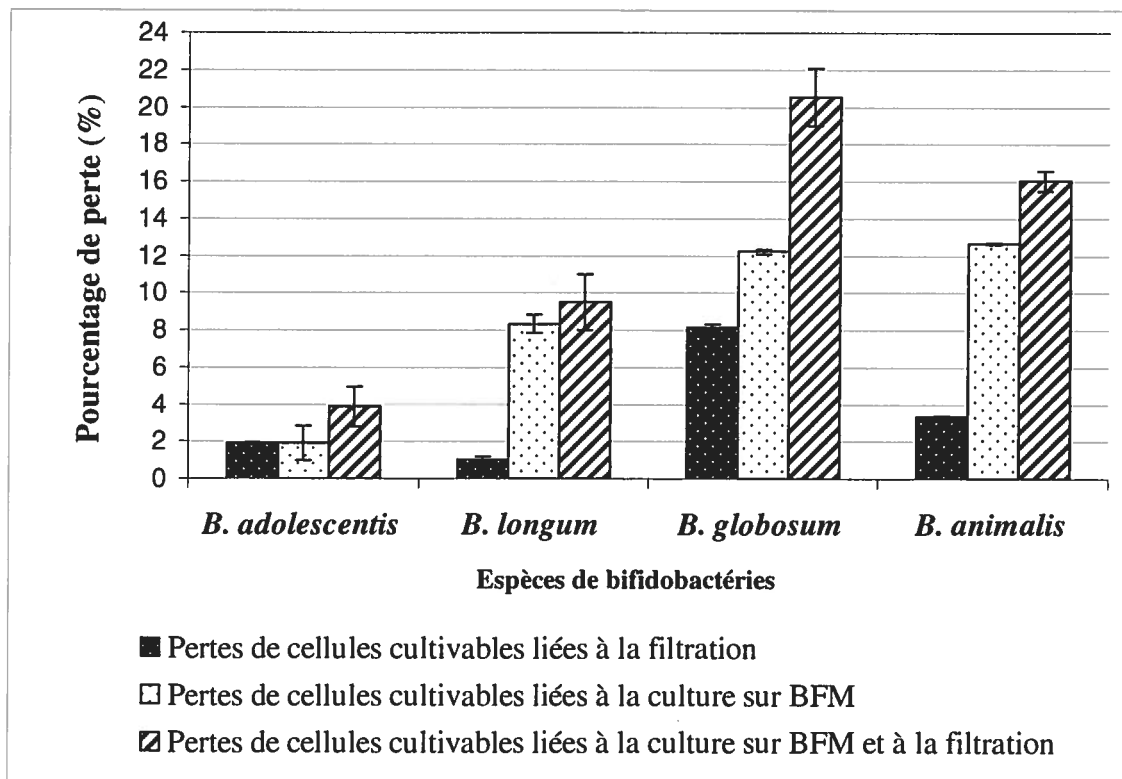
**Tableau 9 : Comportement des milieux de culture face à un échantillon environnemental d'eau**

Milieu	Moyennes des colonies retrouvées sur les membranes (UFC/ml eau de rivière)	Colonies Gram positif ayant une morphologie en "Y" (%)
RCA	31	0
MRS +++)	20	0
MRSLC	17	16
BFM	2	100

### 4.3 L'effet d'une filtration sur le nombre de *Bifidobacterium*

La filtration est utilisée pour concentrer les microorganismes de l'eau et provoque un stress important chez les microorganismes. Une meilleure connaissance des pertes qu'engendre une filtration sur les espèces de *Bifidobacterium* permet d'évaluer jusqu'à quel point cette pratique aura un impact sur la récupération de bifidobactéries cultivables suite à la filtration d'un échantillon d'eau. La perte de colonies cultivables associées uniquement à la filtration a été évaluée pour *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. globosum* et *B. animalis*. Les pertes associées uniquement à la filtration variaient d'une espèce à l'autre partant de 1 % pour *B. longum* jusqu'à 8.3 % chez *B. globosum*. Étant donné que pour cette étude la filtration des échantillons a été combinée avec une incubation sur le milieu de culture BFM, les pertes totales encourues (filtration + croissance sur BFM) ont aussi été évaluées. Les résultats ont montré que le nombre total de colonies retrouvées peut être, selon l'espèce, de 3% à 19 % inférieur aux concentrations réelles présentes en solution (voir graphique 2 et résultats détaillés à l'annexe M).

Graphique 2 : Perte d'UFC chez *Bifidobacterium* suite à une filtration





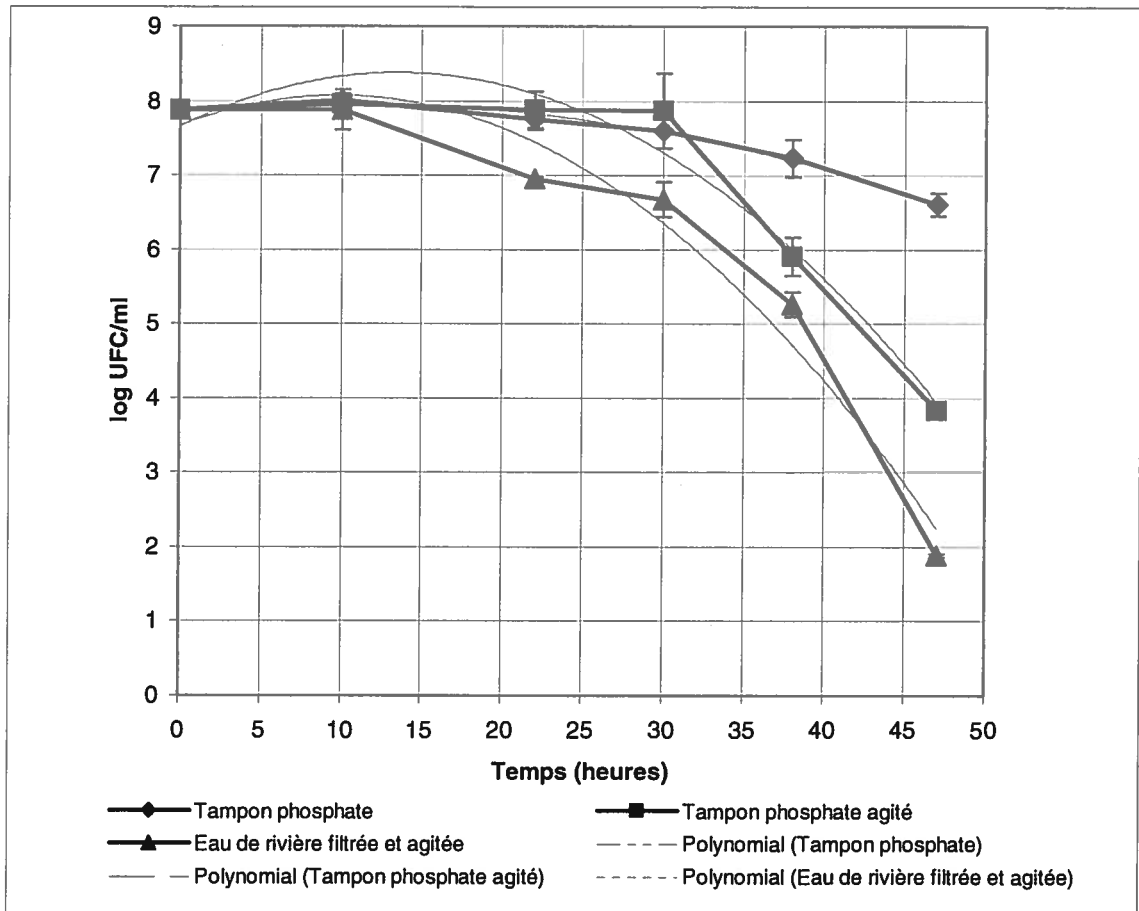
#### 4.4 Le taux de survie de *Bifidobacterium*

L'évaluation de l'impact de différentes conditions abiotiques sur le taux de survie à l'état cultivable des bifidobactéries permet de comprendre en partie le comportement de ce type de bactéries dans l'environnement.

##### 4.4.1 Mesure du taux de survie *B. adolescentis* en aérobiose

Les résultats obtenus suite au dénombrement montrent que l'agitation du milieu influence la survie de *B. adolescentis* en présence d'oxygène. Le type de milieu n'aurait, selon les résultats obtenus, qu'une influence infime sur la survie de *B. adolescentis* à l'état cultivable. Les valeurs obtenues sont présentées au graphique 3.

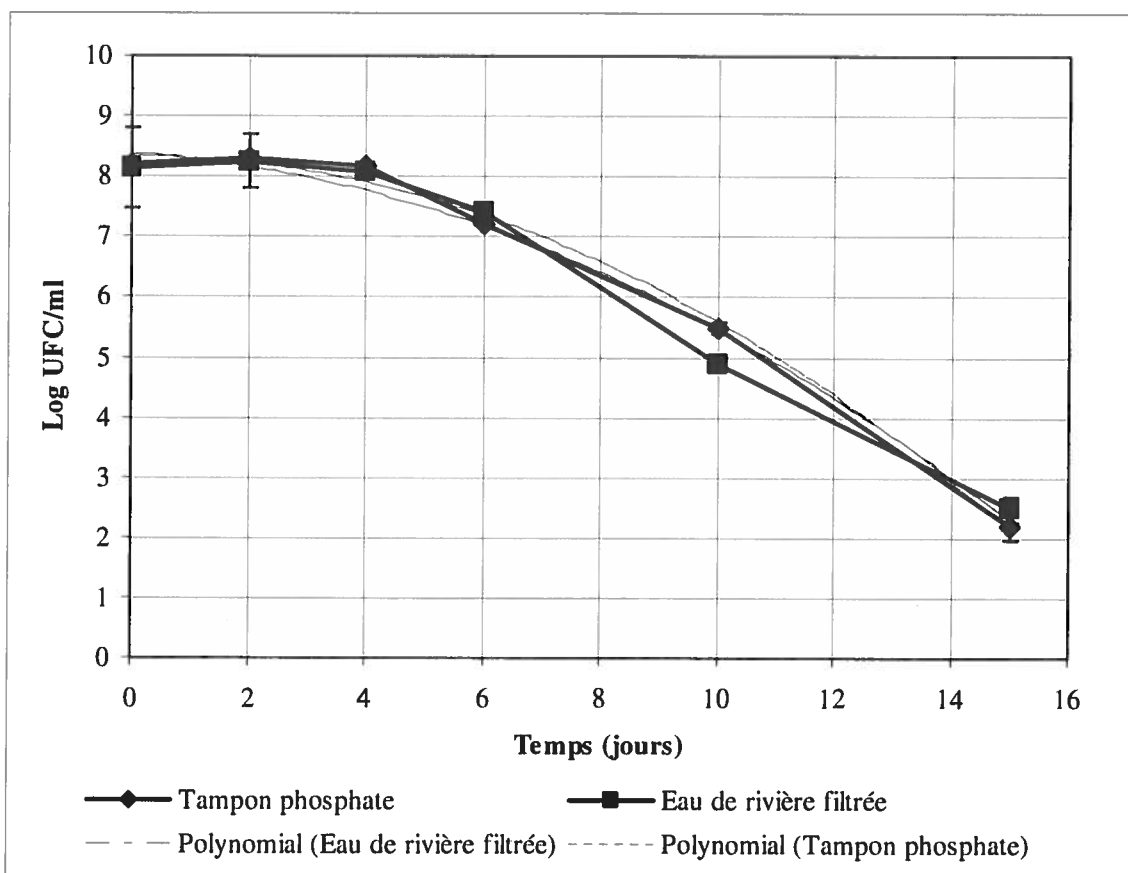
Graphique 3 : Survie de *B. adolescentis* en présence d'oxygène



#### 4.4.2 Mesure du taux de survie *B. animalis* en aérobiose

Les résultats obtenus suite au dénombrement montrent que l'eau de rivière influence nullement la survie de *B. animalis* en présence d'oxygène. De plus, ces résultats font ressortir une persistance plus grande à l'état cultivable de *B. animalis* dans une eau de rivière agitée comparativement à celle obtenue pour *B. adolescentis* dans les mêmes conditions. Les valeurs obtenues sont présentées au graphique 5.

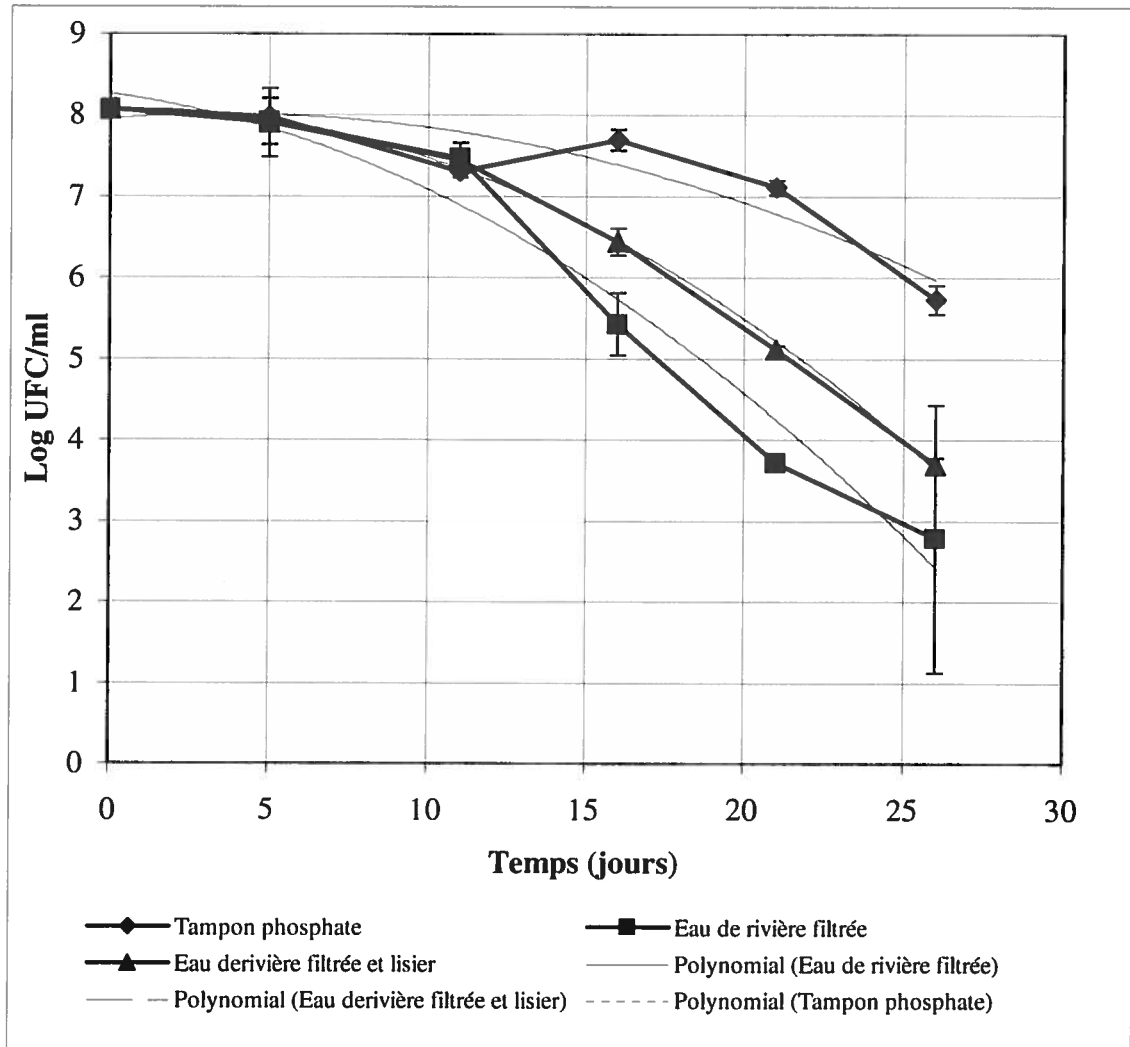
Graphique 4 : Survie de *B. animalis* en présence d'oxygène



#### 4.4.3 Mesure du taux de survie *B. animalis* en anaérobiose

Suite au dénombrement, les résultats obtenus montrent que le milieu liquide (eau de rivière/tampon) dans lequel se retrouve *B. animalis* influence sa survie à l'état cultivable en absence d'oxygène. Ces résultats indiquent aussi que la présence de matières fertilisantes complexe (lisier) permet un meilleur taux de survie à l'état cultivable de *B. animalis* dans une eau de rivière anaérobie. Les valeurs obtenues sont présentées au graphique 7.

**Graphique 5 : Survie de *B. animalis* en absence d'oxygène**



#### **4.5 L'identification de bactéries provenant des rivières L'Assomption, des Prairies et Achigan**

Au total 141 colonies isolées, à partir des cours d'eau visés dans cette étude, ont été soumises à une analyse moléculaire. Les résultats obtenus par PCR, PCR multiplexe et par séquençage montrent que 86 colonies (61%) appartenaient au genre *Bifidobacterium*. Les espèces de bifidobactéries identifiées étaient *Bifidobacterium longum* (53%), *Bifidobacterium adolescentis* (41%), *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (2%), *Bifidobacterium bifidum* (2%) et *Bifidobacterium angulatum* (1%). La plupart des

bifidobactéries identifiées l'ont été par PCR-multiplexe (97 colonies). Le regroupement selon le même patron de bandes suite au PCR-RFLP des colonies n'ayant pu être associées au groupe genre *Bifidobacterium* par PCR-multiplexe a permis de diminuer le nombre de colonies (27 colonies) envoyées au séquençage (rep2, rep 12, rep17, rep 20, rep 22, sra 15, sra 22, rp 10, rp 13, rp 35, rp 40, rp 43, rp 46, rp 57, rp 58, rp 60, rp 66, rp 67, rp 78, rp 79, rp 82, rp 84, rp 89, rp 92, 138, 172, 175). Une fois les séquences obtenues, celles-ci ont été comparées à celles présentes dans la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information). L'étude comparative des séquences a permis d'associer plusieurs colonies aux genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Weisella* ainsi qu'au genre *Bifidobacterium*. Lorsqu'une colonie anaérobie ne démontrait aucun résultat positif suite au PCR ciblant le genre *Bifidobacterium* et les espèces *B. adolescentis* et *B. longum*, elle restait non-identifiée. Sur l'ensemble de cette étude, 17 colonies sont restées non-identifiées. L'annexe G présente l'ensemble des 141 colonies traitées dans cette étude ainsi que la façon dont elles ont été identifiées. D'un autre côté, le tableau 13 montre la répartition des colonies récupérées et identifiées selon le site d'échantillonnage.

**Tableau 10 : Répartition des espèces selon le site d'échantillonnage**

Espèces	Nombre de colonies identifiées par site			
	1	2	3	4
<i>B. adolescentis</i>	14	2	19	0
<i>B. bifidum</i>	0	0	2	0
<i>B. longum</i>	6	1	39	0
<i>B. pseudocatenulatum</i>	2	(1)*	0	(2)*
<i>B. angulatum</i>	0	0	1	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	2	0	0
<i>Enterococcus columbae</i>	0	0	5	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	2	0	0
<i>Lactobacillus salivarius</i>	0	0	4	0
<i>Lactococcus garvieae</i>	0	15	0	0
<i>Streptococcus infantarius</i>	0	0	3	0
<i>Weisella viridescens</i>	0	0	3	0
<i>Eubacterium moniliforme</i>	0	1	0	0
Non-identifiées	0	0	17	0

\* Colonies identifiées lors de la recherche d'espèces animales de bifidobactéries

#### 4.6 Recherche de bifidobactéries cultivables de type animal dans les rivières

Les analyses précédentes ont fait ressortir les espèces suivantes de *Bifidobacterium* : *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. angulatum* et *B. pseudocatenulatum*. Ces espèces sont généralement retrouvées dans le TGI humain. Pour cette raison, une méthode de sélection utilisant une haute température d'incubation a été élaborée afin de faciliter l'isolement d'espèces animales de bifidobactéries. Cette méthode se base sur une étude de Gavini (Gavini et *al.*, 1991).

Les résultats obtenus sur géloses montrent qu'une température supérieure ou égale à 45°C permet d'obtenir seulement la croissance des espèces de *Bifidobacterium* d'origine animale et ce, sur plusieurs des milieux évalués dans cette étude (voir tableau 12).

Afin de vérifier si l'utilisation d'une température d'incubation supérieure ou égale à 45°C permet d'obtenir seulement la croissance des espèces de *Bifidobacterium* d'origine animale une nouvelle campagne d'échantillonnage a été effectuée (11 novembre 2004) sur les sites situés en zone agricole. Le site de prélèvement du Ruisseau St-Jean a été choisi car il était attenant à une ferme d'élevage bovin où les animaux étaient à l'extérieur. À cet emplacement l'eau superficielle (contenant urine et fèces) ruissellait vers le Ruisseau St-Jean.

**Tableau 11: Test de croissance à une température d'incubation de 37°C, 45°C et 46°C chez 4 espèces de *Bifidobacterium***

		Croissance des espèces de <i>Bifidobacterium</i> (en pourcentage des répliquas positifs)			
Milieu	T(°C)	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. globosum</i>
RCA	37	100	100	100	100
	45	0	0	100	100
	46	0	0	100	100
MRS++++	37	100	100	100	100
	45	0	0	100	100
	46	0	0	100	100
BFM	37	100	100	100	100
	45	0	0	100	100
	46	0	0	100	100

#### **4.6.1 Utilisation de la température d'incubation pour la sélection des espèces de bifidobactéries de type animal sur des colonies provenant des rivières Achigan, l'Assomption et du ruisseau St-Jean**

Suite à l'incubation différentielle sur BFM (45°C, 48h et 37°C, 48h) des membranes filtrantes, 24 colonies ont été sélectionnées. De ces colonies purifiées, seules celles anaérobies strictes et Gram positif ont été soumises à une analyse moléculaire afin de confirmer le genre *Bifidobacterium*. Suite aux réactions PCR, 3 colonies ont été associées au genre *Bifidobacterium*. Le séquençage de ces colonies (#138, 172 et 175) a montré que celles-ci appartenaient toutes à l'espèce *B. pseudocatenulatum*. Ce résultat corrobore les travaux faits par Gavini (Gavini et *al.*, 1991) qui avait démontré la croissance de *B. pseudocatenulatum* à une température de 45°C.

## 5 DISCUSSION

Les eaux de surface sont au centre de l'activité humaine. Ce type d'eau alimente la majorité des réseaux d'eau potable desservant les grands centres urbains. Ce type d'eau est essentiel pour la pérennité de certains écosystèmes, pour l'abreuvement des animaux, pour l'irrigation des terres agricoles et il participe à certaines de nos activités récréatives et de transport. Malheureusement, les eaux de surface, trop souvent faciles d'accès, sont aisément contaminées. La pollution peut prendre la forme de déversements, de fuites ou de rejets directs de divers composés organiques et chimiques. Certains de ces contaminants représentent un risque important pour la santé humaine, c'est d'ailleurs le cas des polluants d'origine fécale. Ceux-ci sont potentiellement porteurs de pathogènes et peuvent causer des infections graves chez l'humain. Dans la majorité des principales rivières au Québec, on connaît bien le niveau de contamination fécale et les sources principales contribuant à ce type de pollution. Ces dernières années, d'importantes actions ont été prises (traitement des eaux usées, structures d'entreposage adéquates des fumiers, conservation des milieux filtrants, etc.) afin de limiter la pollution fécale des cours d'eau. Malgré tout, le problème de contamination fécale persiste dans certaines rivières.

L'utilisation d'organismes indicateurs dans l'évaluation de la qualité de l'eau (potable et récréative) a depuis longtemps prouvé sa valeur dans la protection de la santé publique. L'évaluation de la présence de certains microorganismes indicateurs tels les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les entérocoques et les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives a permis de mettre en place des normes de qualité pour les diverses utilisations de l'eau. Malgré le fait que ces groupes ont démontré leur efficacité dans la protection de la santé publique, il n'en demeure pas moins difficile de les utiliser dans un contexte de suivi des sources microbiennes et pathogènes au niveau des écosystèmes aquatiques («microbial source tracking»). La présence universelle de ces microorganismes dans les fèces d'organismes à sang chaud et la possibilité que certains

d'entre eux puissent se retrouver et croître dans un environnement naturel sont des obstacles auxquels les scientifiques doivent faire face afin de prouver que ces microorganismes peuvent être utilisés comme indicateurs des sources de pollution fécale. L'intérêt se porte sur la recherche d'organismes indicateurs pouvant facilement servir à différencier les sources diffuses ou ponctuelles de contamination fécale. Présentement, les tentatives expérimentales mises de l'avant afin d'identifier les sources de contamination fécale dans l'eau des rivières ciblent des microorganismes (bactéries et virus) ou leur matériel génétique (ADN, ARN). À l'heure actuelle, ces méthodes ne sont pas totalement fiables et nécessitent de nombreuses manipulations fastidieuses en laboratoire demandant des coûts élevés, une main-d'œuvre qualifiée et des instruments spécialisés (Malakoff, 2002, Meays et *al.*, 2004). Encore aujourd'hui, trop peu de laboratoires d'analyse d'eau peuvent ce permettre ce genre de technologie.

L'objet de cette étude a donc porté sur l'utilisation de *Bifidobacterium* comme indicateur pouvant différencier les sources de contamination fécale dans les eaux de surface. Initialement, ce projet visait à répondre aux questions suivantes. Existe-il des bifidobactéries à l'état cultivable dans les eaux de surface au Québec? Existe-il une méthode efficace afin de les récupérer et de les cultiver en laboratoire? Existe-il une méthode simple, fiable et rapide d'identifier les bifidobactéries isolées à partir des cours d'eau? À partir des espèces isolées et identifiées, est-il possible d'identifier les sources de contamination? Afin de répondre à toutes ces questions, plusieurs expériences ont dû être faites et, dans certains cas, abandonnées.

## **5.1 La sélectivité des milieux**

Le choix d'un milieu de culture qui assure une croissance optimale de *Bifidobacterium* tout en limitant la croissance d'autres espèces était essentiel au projet. En microbiologie, l'augmentation de la sélectivité des milieux de culture se fait en général par l'addition d'antibiotiques. La sensibilité face aux antibiotiques chez *Bifidobacterium* varie grandement d'une espèce à l'autre (Yazid et *al.*, 2000), c'est pourquoi l'utilisation des antibiotiques demeure limitée pour ce genre bactérien. Pour ce projet, les efforts ont été mis sur des milieux démontrant une sélectivité basée sur le choix d'une source de carbone, sur l'ajout de substances chimiques ayant un effet antimicrobien ciblé ou sur le



maintien de certaines conditions abiotiques (pH) à des niveaux précis. Les milieux expérimentaux MRS+++ , MRSLC et BFM ont été évalués afin de mesurer leur sélectivité dans l'isolement de *Bifidobacterium* à partir d'échantillons environnementaux. Dans cette étude, seul le milieu BFM a démontré une sélectivité utile face aux échantillons environnementaux traités.

Le nombre important de colonies non-spécifiques retrouvées sur les milieux ayant pour base la formulation commerciale MRS limite leur utilisation dans une perspective de suivi. D'ailleurs, au départ, ces milieux ont été développés pour l'industrie laitière, industrie où règne une diversité microbienne essentiellement connue et limitée comparativement à la diversité retrouvée en milieu naturel.

Plusieurs études récentes font état du milieu BFM dans l'isolement de bifidobactéries provenant d'échantillons d'eau de rivière (Nebra et al., 1999; Lynch et al., 2002; Gilpin et al., 2002; Gilpin et al., 2003) et sont venues renforcer le choix de ce milieu de culture. La combinaison du chlorure de lithium, du bleu de méthylène et du lactulose comme la source sélective de carbone ainsi que le maintien d'un pH bas (5.5) à l'aide d'un apport important d'acide propionique favoriseraient la croissance de *Bifidobacterium* tout en ayant un effet inhibiteur sur un important groupe de bactéries composé de : *Lactobacillus acidophilus* CECT 903, *Vibrio furnissii* LMG 7910, *Vibrio cholerae* CECT 658, *Aeromonas hydrophila* CECT 398, *Salmonella typhimurium* WG49, *E. coli* WG5, *Proteus penneri* CECT 864, *Edwardsiella tarda* CECT 849, *Yersinia enterocolitica* CECT 754, *Streptococcus thermophilus* CECT 986 et plus faiblement sur *Lactobacillus plantarum* CECT 748, *Enterococcus faecalis* CECT 481, and *Enterococcus faecium* CECT 410 (Nebra et al., 1999; Apajalahti et al., 2003). Lynch (Lynch et al., 2002) dans une étude ajoute que le milieu BFM aurait aussi un effet inhibiteur sur *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Shigella*. La combinaison du milieu BFM à une coloration Gram et à la vérification d'une croissance uniquement en anaérobiose des colonies a permis d'augmenter le niveau de précision dans la sélection de colonies appartenant au genre *Bifidobacterium*.

L'observation, au préalable, de la croissance sur BFM des cultures pures de bifidobactéries n'a pu faire ressortir aucun caractère visuel distinctif permettant leur identification visuelle claire et rapide. Dans l'ensemble, sur ce milieu, les colonies ont une petite taille, sont blanchâtres et quelques fois légèrement bleutées, ce qui est en accord avec la littérature (Nebra et *al.*, 1999). Par contre, un grand nombre de colonies présentant le même aspect visuel que *Bifidobacterium*, mais n'appartenant pas à ce genre, ont été retrouvées à la surface du milieu BFM. Il a donc été difficile d'identifier directement sur la membrane les colonies appartenant au genre *Bifidobacterium*. C'est pourquoi certaines tentatives d'hybridation *in situ* sur membrane ont été effectuées, ceci afin de présélectionner les colonies appartenant au genre *Bifidobacterium*. L'utilisation de l'hybridation *in situ* sur membrane se voulait être une méthode rapide afin de cibler le genre *Bifidobacterium*. Malheureusement, l'obtention de résultats non-constants a mis un terme au dépôt d'une méthode d'hybridation sur membrane. Les protocoles utilisés ont été tirés d'articles récents publiés par Lynch (Lynch et *al.*, 2002) et Nebra (Nebra et *al.*, 2002; Nebra et *al.*, 2003).

## **5.2 Extraction de l'ADN génomique des colonies isolées**

La plupart des méthodes d'extraction de l'ADN pour les bifidobactéries proposées jusqu'ici impliquent l'action d'enzymes ou de fortes températures afin de briser la paroi cellulaire des bifidobactéries (Wang et *al.*, 1996; Mullié et *al.*, 2003; Masco et *al.*, 2003; Temmerman et *al.*, 2003). L'utilisation de ces enzymes nécessite plusieurs étapes d'incubation à des températures précises augmentant le temps et le coût nécessaire au traitement des isolats. Dans ce projet, un procédé mécanique d'extraction utilisant des billes de verre a été utilisé. Cette méthode a été récemment utilisée dans certains travaux touchant *Bifidobacterium* (Berhard et *al.*, 2000; Ventura et *al.*, 2001; Fasoli et *al.*, 2002; Matsuki et *al.*, 2003). Les modifications apportées au protocole original de Lévesque (Lévesque et *al.*, 1997), soit de doubler la séquence de broyage, d'ajouter une solution de SDS (sodium dodecyle sulfate) et de maintenir continuellement sur glace des échantillons auront permis d'obtenir de l'ADN génomique en quantité suffisante et peu dégradé et ce, tant pour les souches pures provenant de l'ATCC que pour les souches environnementales.

### 5.3 Les espèces retrouvées sur BFM à partir d'échantillons de rivières

#### 5.3.1 Les espèces appartenant au genre *Bifidobacterium*

La plupart des études récentes utilisant *Bifidobacterium* afin de mieux connaître l'origine d'une contamination fécale dans l'eau portaient essentiellement sur l'identification et la survie en microcosme d'espèces communément retrouvées chez l'humain, soit *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* et *B. dentium* (Resnick et al., 1981a; Mara et al., 1983; Carrillo et al., 1985; Rhodes et al., 1999; Lynch et al., 2002; Nebra et al., 2002; Bonjoch et al., 2004) et sur des espèces ayant acquis la possibilité d'utiliser le sorbitol comme source de carbone (Mara et al., 1983; Blanch et al., 2004).

Dans la présente étude, cinq espèces de bifidobactéries ont été identifiées, soit *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. angulatum* et *B. pseudocatenulatum*. Ces espèces représentent les espèces les plus communes du TGI humain selon Matsuki (Matsuki et al., 1998). L'état cultivable dans lequel se trouvaient ces espèces lors du prélèvement en rivière a facilité leur culture en laboratoire et par la suite l'analyse par biologie moléculaire.

Il est difficile d'interpréter la variation du nombre de colonies de bifidobactéries et la variation des espèces de *Bifidobacterium* observées entre les différents points d'échantillonnage. Les campagnes d'échantillonnage visaient davantage à vérifier la présence des bifidobactéries à l'état cultivable ainsi que la variété des espèces dans chacune des rivières.

Les résultats obtenus par PCR et par séquençage démontrent la présence de *Bifidobacterium* à l'état cultivable dans les rivières du Québec. Ce fait, alors incertain au début du projet, a orienté le développement et le choix des techniques utilisées dans cette étude. Le dénombrement et l'identification de bifidobactéries appartenant aux espèces *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. angulatum* et *B. pseudocatenulatum* apportent plusieurs éléments intéressants. La pollution fécale des rivières L'Assomption, Achigan et des Prairies n'est nullement un fait nouveau. La présence d'un fort bassin de population et d'une grande activité humaine et agricole autour de ces rivières crée

nécessairement des impacts sur la qualité de ces rivières. L'identification de *B. adolescentis* et d'autres espèces de bifidobactéries normalement liées au genre humain et ce, dans un état cultivable dans chacun des sites échantillonnés prouve que l'humain doit être considéré comme un acteur important dans la contamination fécale des cours d'eau au Québec. C'est pourquoi des essais supplémentaires ont été faits afin de mieux comprendre l'absence de détection d'espèces de *Bifidobacterium* d'origine animale.

Jusqu'à ce jour, aucun article scientifique n'a présenté une méthode pouvant isoler *B. bifidum*, *B. angulatum* et *B. pseudocatenulatum* d'un cours d'eau naturel. La méthode suivie dans cette étude prouve qu'il est possible de récupérer des bifidobactéries à l'état cultivable dans les rivières du Québec et aussi qu'il semble y exister une large diversité d'espèces de bifidobactéries connues.

Le séquençage des colonies a aussi permis de montrer les limites de la méthodologie utilisée lors de cette étude. L'identification de colonies cultivées sur le milieu BFM n'appartenant pas au genre *Bifidobacterium* montre que ce milieu nécessite des améliorations afin de devenir spécifique aux bifidobactéries dans un contexte d'étude environnementale. L'obtention de faux négatifs et d'un faux positif (*Weisella viridescens*) montre aussi que des erreurs d'interprétation peuvent se glisser lors de l'identification des colonies par PCR.

L'obtention de nouvelles séquences provenant des bifidobactéries ayant survécu aux conditions exigeantes du milieu aquatique, à la filtration ainsi qu'à la culture en laboratoire permettra de développer de nouveaux outils moléculaires plus performants pour l'identification des *Bifidobacterium* dans les cours d'eau québécois.

### **5.3.2 Les autres espèces isolées sur le milieu BFM**

Une meilleure connaissance des espèces bactériennes pouvant croître sur BFM permettront d'améliorer la sélectivité de celui-ci tout en conservant ses propriétés favorables à la croissance des bifidobactéries. Cette étude a mis en évidence des espèces capables de croître sur le milieu BFM. Ces espèces sont *Lactobacillus salivarius*, *Weisella viridescens*, *Lactococcus garvieae* et *Eubacterium moniliforme*. Fait

surprenant, la récupération de colonies appartenant à *Enterococcus columbae* et *Streptococcus infantarius* a été possible, ce qui entre en contradiction avec les observations de Lynch (Lynch et al., 2002). Celui-ci mentionne que le milieu BFM inhibe la croissance de ces espèces. Pourtant, des résultats contraires ont été obtenus.

#### **5.4 La survie de *Bifidobacterium* dans l'eau**

La diversité des espèces de *Bifidobacterium* obtenus par PCR et par séquençage a fait ressortir l'absence d'espèces de bifidobactéries normalement associées aux fèces animales (voir 2.2.12). Pour cette raison, l'évaluation de la survie de *Bifidobacterium* dans différents microcosmes a été entreprise. Les conditions ciblées pouvant affecter cette survie à l'état cultivable ont été la nature du milieu (tampon ou eau de rivière), le brassage (normalement observé en rivière) en présence d'oxygène ainsi que la présence de lisier dans un environnement aquatique anaérobie mimant les conditions d'eutrophisation des rivières en zones agricoles. L'eutrophisation des lacs et rivières à faible débit se caractérise par une prolifération d'algues et d'autres plantes aquatiques suite à un enrichissement du milieu en ions nutritifs (nitrates, phosphates). Ces éléments sont apportés par l'épandage de fumiers ou d'engrais chimiques. L'eutrophisation provoque une désoxygénation progressive des couches inférieures et une accélération du dépôt des matières organiques.

Les résultats publiés montrent une très grande variabilité au niveau du taux de survie des bifidobactéries en microcosme et en milieu naturel. Plusieurs raisons peuvent expliquer la variation des résultats obtenus notamment le choix initial de l'inoculum et le milieu de croissance. Dans plusieurs études, cet inoculum est constitué de bactéries pures baignant dans un milieu de culture. Les auteurs tiennent compte du pouvoir diluant du microcosme (tampons, PBS, eau de rivière) afin de limiter l'impact du milieu nutritif traîné lors de l'inoculation. Dans cette étude, une étape préalable de centrifugation suivie d'une resuspension du culot dans un tampon phosphaté a permis de limiter l'effet du milieu de culture au niveau des microcosmes.

La variété des milieux de culture utilisée pour le dénombrement, la sous-estimation de l'effet du brassage, la salinité des microcosmes, les températures d'incubation choisies et les espèces de *Bifidobacterium* utilisées peuvent aussi expliquer la diversité des résultats obtenus d'une étude à l'autre (Resnick et al., 1981b; Munoa et al., 1988; Rhodes et al., 1999) et remettent en question les résultats obtenus afin d'expliquer le comportement des bifidobactéries dans les cours d'eau. Par ailleurs, il ressort de ces études certaines tendances : la survie des bifidobactéries diminuerait en fonction du milieu liquide (PBS/eau de rivière) (Resnick et al., 1981a), avec l'augmentation de la température (Resnick et al., 1981a, Rhodes et al., 1999) ou de la salinité (Rhodes et al., 1999). La lumière jouerait aussi un rôle bactéricide sur *Bifidobacterium*. (Arango, 2000).

#### **5.4.1 Survie de *B. adolescentis* en présence d'oxygène**

L'analyse de la tendance des courbes de régression montre une différence significative de la survie de *B. adolescentis* lorsque cette espèce est confrontée à un environnement agité. Selon les résultats obtenus par la présente étude, *B. adolescentis* pourrait survivre approximativement 2 jours dans une eau de rivière agitée, 2,5 jours dans un tampon agité et un peu plus de 4 jours dans un tampon non-agité. L'agitation joue donc un rôle important sur le taux de survie des bifidobactéries et devient un paramètre important à considérer lorsque l'on veut reconstituer en laboratoire les conditions subies par *Bifidobacterium* en milieu naturel.

Le faible taux de survie de *B. adolescentis* dans l'eau de rivière agitée en présence d'oxygène pourrait devenir intéressant afin d'estimer le début d'une contamination fécale d'un cours d'eau ou pourrait permettre de prétendre à une contamination continue du cours d'eau.

#### **5.4.2 Survie de *B. animalis* en présence et en absence d'oxygène**

Afin de mieux comprendre l'absence d'espèces de *Bifidobacterium* provenant de fèces animales dans l'eau prélevée à partir de rivières situées en zone agricole, il a été décidé d'utiliser *B. animalis* comme modèle animal afin d'évaluer l'impact de certaines conditions sur sa survie. Les résultats obtenus montrent tout d'abord qu'en présence d'oxygène, *B. animalis* survit plus longtemps à l'état cultivable que la souche d'origine

humaine *B. adolescentis* et que, comme pour ce dernier, le milieu (eau de rivière, tampon) n'influence aucunement la survie à l'état cultivable de *B. animalis*. D'un autre côté, en microcosme anaérobie, on peut remarquer une nette augmentation de la survie à l'état cultivable de *B. animalis*.

Par ailleurs, en absence d'oxygène, la nature du milieu possède un impact important sur la survie à l'état cultivable de *B. animalis*. Le passage de *B. animalis* du tampon à une eau de rivière diminue la survie d'au moins dix jours. D'autre part, la présence de matière organique sous forme de lisier permet de conserver plus longtemps *B. animalis* à l'état cultivable. Ces matières organiques sont souvent présentes en quantité importante dans les ruisseaux longeant les terres agricoles. Si l'on se fie aux résultats obtenus, les espèces animales de bifidobactéries en milieu agricole, où des conditions anaérobies sont présentes, devraient persister dans un état cultivable assez longtemps pour y être détectées. Deux raisons pourraient être avancées afin d'expliquer l'incapacité d'isoler les types animales de bifidobactéries : premièrement, le manque de sélectivité et l'incapacité d'assurer une croissance suffisante des espèces de bifidobactéries normalement retrouvées chez les animaux sur le milieu de culture BFM et, deuxièmement, la quantité insuffisante de bifidobactéries d'origine animale à l'état cultivable dans les rivières québécoises.

#### **5.4.2.1 Les faiblesses du milieu BFM**

Cette étude a fait ressortir le manque de sélectivité et l'incapacité d'assurer une croissance suffisante des espèces de bifidobactéries normalement retrouvées chez les animaux. À ce propos, Lynch (Lynch et al., 2002) a démontré que *B. coryneforme*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. magnum* et *B. ruminantium*, toutes des espèces provenant généralement des fèces animales, ne pouvaient croître ou démontraient une faible croissance sur le milieu BFM. Ainsi, certaines colonies de type animal pouvaient se retrouver à la surface des membranes, mais leur taille était insuffisante pour qu'elles soient détectées à l'œil et ainsi isolées. Afin de vérifier ce fait, l'analyse au microscope binoculaire des membranes ayant servi à la filtration d'eau de rivière a révélé qu'il existe à la surface de ces membranes une multitude de colonies microscopiques. Des études plus poussées devraient être réalisées afin d'identifier la nature de ces microcolonies.

#### **5.4.2.2 La faible concentration de bifidobactéries provenant de fèces animales**

On ne peut ignorer le fait qu'il existe possiblement une quantité insuffisante d'espèces de bifidobactéries d'origine animale à l'état cultivable dans les rivières québécoises pour qu'elles soient détectées par les méthodes utilisées dans cette étude aussi facilement que pour les types humains. Pour expliquer ce fait, trois raisons peuvent être avancées : la faible présence des bifidobactéries dans le tractus intestinal animal, l'utilisation chez les animaux d'élevage d'antibiotiques et, finalement, l'entreposage des matières fécales animales.

Une forte concentration de bifidobactéries dans les fèces augmente la probabilité de retrouver ce microorganisme dans l'environnement. Deux études publiées récemment évoquent une plus faible concentration de *Bifidobacterium* dans les fèces animales que dans celles humaines (Mara et al., 1983; Lynch et al., 2002).

L'usage à grande échelle d'antibiotiques dans le milieu agricole tant comme facteur de croissance que pour le traitement préventif des animaux en élevage intensif ou pour les soins aux animaux infectés amène un questionnement important sur l'impact de ces produits bactéricides sur la survie de *Bifidobacterium* dans le tractus gastro-intestinal des animaux.

Les pratiques agricoles d'aujourd'hui prévoient l'entreposage temporaire des fèces animales à l'air libre avant que ces dernières soient épandues. Cette étape d'entreposage, tout comme le temps de résidence sur le sol de ces fèces une fois épandues, soumettent la flore bactérienne qui s'y trouve à de forts effets létaux (ultraviolets, oxygène, compétition bactérienne). En bout de ligne, on peut envisager que les organismes pouvant atteindre les cours d'eau par cette voie sont davantage adaptés à un environnement extraintestinal aérobie, ce qui n'est pas le cas de *Bifidobacterium*.

Bref, les conditions qui déterminent la population bactérienne initiale présente dans les fèces animales ainsi que les traitements que subit cette matière fécale influenceraient grandement les espèces et la concentration de bifidobactéries retrouvées en rivière.



## CONCLUSION

Les pays qui traitent l'eau et qui utilisent des indicateurs microbiens pour mesurer la qualité de l'eau ont pu éradiquer plusieurs maladies d'origine hydrique et diminuer le niveau de contamination fécale de leurs rivières. Aujourd'hui, les efforts se portent plus en amont, au niveau des sources mêmes de la contamination. C'est pour cette raison que de nouveaux indicateurs tels que *Bifidobacterium* sont évalués afin de voir si l'identification des sources de contamination est possible. La raison pour laquelle on voudrait utiliser *Bifidobacterium* est sa spécificité entre l'espèce et l'hôte colonisé. Concrètement, l'identification des espèces de *Bifidobacterium* retrouvées en rivières permettra de les relier à des hôtes et ainsi indiquer le ou les sources responsables de la contamination fécale d'un cours d'eau.

Cette étude visait principalement à démontrer la présence de *Bifidobacterium* dans les rivières québécoises afin de pouvoir l'utiliser comme un indicateur microbien d'une source de pollution fécale. Pour ce faire, le milieu de culture BFM a été utilisé afin d'isoler les bifidobactéries cultivables provenant de la filtration d'eau des rivières l'Assomption, Achigan, des Prairies et du ruisseau St-Jean. Le traitement par PCR et par séquençage de l'ADN des colonies Gram positif purifiées ayant un métabolisme anaérobie stricte a conduit à l'identification du genre *Bifidobacterium* et des espèces présentes dans les cours d'eau évalués dans cette étude.

Les amorces publiées PO et LM3 ont été utilisées pour identifier le genre *Bifidobacterium*. Les colonies appartenant au genre *Bifidobacterium* ont par la suite été soumises à un PCR multiplexe comprenant trois paires d'amorces aussi publiées pour *B. adolescentis*, *B. longum* et *B. breve*, ce qui a permis d'identifier plus de la moitié des colonies isolées. Le regroupement des colonies inconnues par PCR-RFLP appartenant au genre *Bifidobacterium* et le séquençage de celles-ci sont venus compléter le processus d'identification.

Cette étude a porté sur plus de 141 colonies isolées à partir d'eau de rivières. Cinq espèces de bifidobactéries ont été retrouvées à l'état cultivable dans les cours d'eau, soit *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. angulatum* et *B. pseudocatenulatum*. Toutes ces espèces sont normalement retrouvées, selon la littérature, en grande quantité dans les fèces humaines et témoignent donc d'un épisode de contamination de matières fécales humaines. La survie variable de *Bifidobacterium* à l'état cultivable selon les conditions du milieu remet en question l'association d'une présence de bifidobactéries dans un cours d'eau agité à un évènement ponctuel de contamination fécale. Par contre, la faible survie à l'état cultivable de *B. adolescentis* en présence d'oxygène dans une eau de rivière ouvrirait la voie à son utilisation afin d'estimer le début d'un évènement de contamination fécale d'un cours d'eau.

Enfin, cette étude a montré que *Bifidobacterium*, une bactérie anaérobie stricte et uniquement d'origine fécale, existe réellement sous forme cultivable dans certaines rivières du Québec, ce qui confirme la contamination de ces rivières par de la matière fécale. Par contre, les techniques utilisées dans cette étude n'ont pas permis d'identifier, dans l'eau des rivières échantillonnées, des espèces de bifidobactéries provenant de fèces animales. Conséquemment, on ne peut conclure que *Bifidobacterium* pourrait être utilisé comme un outil microbiologique permettant la différenciation des sources de contamination fécale des cours d'eau.

Afin de sortir de cette impasse, il serait intéressant de voir, chez plusieurs animaux et individus, quelles espèces de bifidobactéries colonisent réellement leur tractus gastro-intestinal et ainsi mieux départager les bifidobactéries d'origine intestinale animale de celles d'origine intestinale humaine. Dès lors, les méthodes d'isolement et la recherche de cibles moléculaires seront plus justes. D'autre part, aucune étude n'a encore été faite sur le taux de survie des bifidobactéries, de l'excrétion jusqu'à son aboutissement en rivière. Une fois ce sujet approfondi, peut-être sera-t-il possible d'expliquer l'absence d'espèces de bifidobactéries provenant de fèces animales observée dans cette étude et, qui sait, d'amener un éclairage nouveau sur la possibilité d'utiliser ce microorganisme comme un indicateur des sources de pollution fécale des cours d'eau.

## **REMERCIEMENTS**

Ce travail a été effectué sous la direction de Pr. Pierre Payment, sous dirigé par Pr. Darakshan Ahmad et Pr. Richard Villemur. Je tiens à remercier P. Payment pour m'avoir accepté pour ce projet de maîtrise et de m'avoir donné la latitude et les moyens nécessaires afin de mener à bien mes études graduées.

Il serait prétentieux de ma part de croire que la réalisation d'un mémoire peut se faire seul. C'est pourquoi je tiens à remercier particulièrement ces personnes qui de près ou de loin m'ont permis d'avancer et de croire : tout le laboratoire de Richard Villemur, Louis Racine, Annie Locas et les deux techniciennes du laboratoire de Pierre Payment, mes deux compagnes du laboratoire de François Lépine, Darakshan Ahmad, Denis Roy de l'Université Laval et, finalement, Luc Bissonnette du CHUL.

Tisser des liens est utile à la connaissance, mais d'avantage entre les individus...

## **ANNEXES**

**Annexe A : Composition et conditions de stérilisation des milieux utilisés**

Ingrédients (g/litre)	Milieux						
	RCM	MRS	MRS +	MRS +++	MRS ++++	MRS LC	BFM
Acétate de sodium	3.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	
Acide propionique	-	-	-	-	-	-	5
Agar ( pour milieux gélosés)	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Amidon	1.0	-	-	-	-	-	2.0
Bleu de méthylène	-	-	-	-	-	-	0.016
Carbonate de sodium	-	-	-	0.2	0.2	0.2	-
Chlorure de calcium	-	-	-	0.1	0.1	0.1	-
Chlorure de lithium	-	-	-	-	-	2.0	2.0
Chlorure de sodium	5.0	-	-	-	-	-	5.0
D(+)-Glucose	5.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	-
Extrait de levure	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	7.0
Extrait de viande	10.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	2.0
Hydrochlorure de thiamine	-	-	-	-	-	-	0.001
Hydrogénocitrate di-ammonium	-	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	-
Hydrogéo-phosphate di-potassium	-	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	-
Lactulose	-	-	-	-	-	-	5.0
L-Cystéine hydrochloride	0.5	-	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5
Peptone de caséine	-	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	-
Peptone de viande	5.0	-	-	-	-	-	-
Peptone	-	-	-	-	-	-	5.0
Riboflavine	-	-	-	-	-	-	0.001
Sulfate de magnésium	-	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-
Sulfate de manganèse	-	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	-
Thioglycolate de sodium	-	-	-	-	0.25	-	-
Tryptone	-	-	-	-	-	-	2.0
Tween® 80	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-
Autoclavage t (min)/T(°C)	18/12 1	18/12 1	18/121	18/121	18/121	18/121	18/12 1
pH avant autoclavage (25°C)	6.8± 0.2	7± 0.2	7± 0.2	7± 0.2	7± 0.2	7± 0.2	-
pH après autoclavage (45°C)	-	-	-	-	-	-	5.5± 0.2

**Annexe B : Marqueurs de poids moléculaires utilisés**

Bandes	Marqueur de poids moléculaire I (GeneRuler™ 50 bp DNA ladder)		Marqueur de poids moléculaire II (λ Sty)	
	Longueurs des fragments (paires de bases)	Concentrations d'ADN (ng/μl)	Longueurs des fragments (paires de bases)	Concentrations d'ADN (ng/μl)
1	1031	500	27 837	200
2	900	500	23 583	80
3	800	500	7 743	70
4	700	500	6 223	45
5	600	500	4 254	35
6	500	500	3 472	30
7	400	500	2 690	20
8	300	500	1 882	15
9	250	500	1 489	10
10	200	500	925	5
11	150	500	421	1
12	100	500	72	
13	50	500		

Annexe C : Listes des amorces utilisées dans la confirmation du genre et des espèces de *Bifidobacterium*

Noms	Séquences (5'-3')	Bandes (Pb)	Locations	Cibles	Sources
AB06658	Avant GGGAGCAAGGCACTTTGTGT Arrière GAAACCCCATCTCTGGGATC	568	rADN-16s	<i>B. breve</i>	Mullié et al., 2003
Ban2-23si	Avant CATATTGGATCACGGTTCG Arrière CATTGGACACCCCTGGGATC	467	ITS-23S rARN	<i>B. animalis</i>	Ventura et al., 2002
M58729	Avant CTCCAGTTGGATGCATGTC Arrière CGAAGGCTTGCTCCCAGT	278	rADN-16s	<i>B. adolescentis</i>	Mullié et al., 2003
M58739	Avant TTCCAGTTGATCGCATGGTC Arrière GGGAAGCCGTATCTCTACGA	831	rADN-16s	<i>B. longum</i>	Mullié et al., 2003

## Annexe D : Extraction d'ADN et Réaction PCR

### 1) Liste des constituants nécessaires à une réaction de PCR

Master mix	volume final 50 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	38,5 $\mu$ L
Tampon Taq 10X*	5 $\mu$ L
Bovine serum albumine	1 $\mu$ L 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L
dNTP 10 mM	1 $\mu$ L 200 $\mu$ M finale
Amorce ~10 pmoles/ $\mu$ L	1 $\mu$ L 10 pmoles/réaction
Amorce ~10 pmoles/ $\mu$ L	1 $\mu$ L 10 pmoles/réaction
Taq DNA polymérase	0,5 $\mu$ L 2.5 U/réaction
ADN	2 $\mu$ L

\* concentration finale: (Tris HCl 10 mM pH 9.0, KCl 50 mM, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>,)

### 2) Liste des constituants du tampon TEN

TRIS-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA.2Na	10 mM
NaCl	150 mM



## Annexe E : Programmes d'amplification utilisés

### 1) Programme associé à la paire d'amorces PO-LM3

Nombres de cycles	Températures et temps
1 cycle	95°C pendant 5 minutes
30 cycles	95°C pendant 30 secondes
	58°C pendant 45 secondes
	72°C pendant 2 minutes
1cycle	72°C pendant 7 minutes

### 2) Programme associé à la paire d'amorces PO-P6

Nombres de cycles	Températures et temps
1 cycle	95°C pendant 3 minutes
30 cycles	94°C pendant 30 secondes
	55°C pendant 45 secondes
	72°C pendant 2 minutes
1cycle	72°C pendant 7 minutes

### 3) Programme associé à la paire d'amorces Ban2-23si

Nombres de cycles	Températures et temps
1 cycle	95°C pendant 5 minutes
30 cycles	95°C pendant 30 secondes
	54°C pendant 1 minute
	72°C pendant 1.5 minutes
1cycle	72°C pendant 7 minutes

### 4) Programme associé aux paires d'amorces M58729, AB006658 et M58739

Nombres de cycles	Températures et temps
1 cycle	94°C pendant 5 minutes
35 cycles	94°C pendant 30 secondes
	59°C pendant 30 secondes
	72°C pendant 1 minutes
1cycle	72°C pendant 5 minutes

**Annexe F : Séquences des bactéries isolées de cours d'eau (seules les bifidobactéries ont été traitées par le logiciel CHROMAS, Technelysium, version 2.3) et comparées à la banque de données du NCBI**

**1. REP 22 (10-1000)**

>rep22 sequence exported from rep22\_SB73\_044.ab1  
GCGNNGCGCNCCTATACATGCAGTCGAGCGGATGATTAAGATAGCTTGCTATTTTTATG  
AAGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGGGGACAACGTT  
TGGAAACGAACGCTAATACCGCATAACAATGAGAATCGCATGATTCTTATTTAAAAGAAG  
CAATTGCTTCACTACTTGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAAGGACT  
ACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA  
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGA  
CCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAA  
GAACGTTAAGTAGAGTGGAAAATTACTTAGGTGACGGTATCTAACCAGAAAGGGACGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG  
CGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTTCTTAAAGTCTGATGTA AAAAGGCAGTGGCTCAACCAT  
TGTGTGCATTGGAACTGGGAGACTTGGAGTGCAGGAAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTA  
CGGTGAAAGTGCCTAAAATATATGGAGAAGGGAACAACCTCGGGGAGGCGGAAAGCGGGC  
TCTCTTGGCTGTTAAACTTGGACCACTGAGGCCTCGAAAAGCGTTGGGGAAGCCAAAAA  
CCAGGATTTAGAATAACCCCTTGGGTGAGGTGCCCTAGACCGGTAACGATTGAAGTTTGG  
CCTAACTTGTGGGGGAGCCGTATAGGTTCTCCTTGGTAAACCCAGAGTTAGAGAGCCA  
TTTAAAGGCAATCTCTCGCCCCGGGGGAAGTACCAACGCCCATGGGTGGAACTTGCAAA  
GGAAATTTAAAGGGTGGNCCCCTACCGAGCCCGGTGGAACCNNGGNTNTGTCTAATTNT  
AAGCANNNGCNGTAGAANCCTNNCCCAGNGNCNNNTNNCNCNCNCCNNNCNNTNCGTNG  
TNAGANAAGGGNNTTNCCTTNCNGANCNNCAGNGAATCNANNGNGGNGNCATGNCGNTG  
GTNNACTNCCTNCNNNTCCNGNAGTANGTTGGGNTNANNNCCNGGAAGCTNNNGCNA  
NCCCTCAATGCNTNNNTTNCAGTNCCTTGANNCGGGGCNNCTCNNNCNNNANCCGNNNN  
GGNNANANTCCNNAANGANGGGTCCGANAGCNNTATNCTGNNAGCNNTNCTCCTCNCTA  
NACCGTGTGTCNGNCNNCNTCCATGTANTTGNNTCGCNTTANCNTGTAGNTCCCCNN  
CNNCGTNGTNCGNANTACTNTGNNNTGCNTTNTCANNNCNTNNTGTAGCGCGTNTNA  
CNTNTNNGTGCGTNAGTNANNANNNGTNGNACATGCGGNNTNCANNCGTCGCGNNAAN  
NTNANCGTNNGGANTNN

1) [gi|51512138|gb|AY699289.1](#) *Lactococcus garvieae* isolate M79 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1541

Score = 1215 bits (613), Expect = 0.0  
Identities = 651/657 (99%), Gaps = 5/657 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|19070641|gb|AF352166.1](#) *Lactococcus garvieae* strain FLG12 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1544

Score = 1215 bits (613), Expect = 0.0  
Identities = 651/657 (99%), Gaps = 5/657 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|19070640|gb|AF352165.1](#) *Lactococcus garvieae* strain FLG5 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1544

Score = 1215 bits (613), Expect = 0.0  
Identities = 651/657 (99%), Gaps = 5/657 (0%)

Strand = Plus / Plus

- 4) [gi|19070639|gb|AF352164.1](#) *Lactococcus garvieae* strain FLG4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1544

Score = 1215 bits (613), Expect = 0.0  
Identities = 651/657 (99%), Gaps = 5/657 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|19070638|gb|AF352163.1](#) *Lactococcus garvieae* strain FLG2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1544

Score = 1215 bits (613), Expect = 0.0  
Identities = 651/657 (99%), Gaps = 5/657 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 6) [gi|4234619|gb|AF061005.1|AF061005](#) *Enterococcus seriolicida* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1485

Score = 1215 bits (613), Expect = 0.0  
Identities = 651/657 (99%), Gaps = 5/657 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 7) [gi|46091297|dbj|AB120031.1](#) *Lactococcus garvieae* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:A10LG03  
Length = 748

Score = 1193 bits (602), Expect = 0.0  
Identities = 650/658 (98%), Gaps = 6/658 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 8) [gi|18640076|dbj|AB079369.1](#) *Enterococcus* sp. U1-1 gene for 16S rRNA, partial sequence  
Length = 1494

Score = 1193 bits (602), Expect = 0.0  
Identities = 650/658 (98%), Gaps = 6/658 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 9) [gi|56182372|gb|AY669388.1](#) *Lactococcus garvieae* isolate 15G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1548

Score = 1191 bits (601), Expect = 0.0  
Identities = 648/657 (98%), Gaps = 5/657 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 10) [gi|493094|gb|L32813.1|ENERRD](#) *Enterococcus seriolicida* 16S ribosomal RNA (16S rRNA)  
Length = 1497

Score = 1191 bits (601), Expect = 0.0  
Identities = 647/657 (98%), Gaps = 5/657 (0%)  
Strand = Plus / Plus

## 2. REP 2 (10-1180)

>rep2 sequence exported from rep2\_SB73\_011.ab1

```
ANTGCGNGNCCTATCATGCAGTCGAGCGATGATTAAGATAGCTTGCTATTTTTATGAAG
AGCGGCGAACGGGTGAGTAACCGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGGGGACAACGTTTGG
AAACGAACGCTAATACCGCATAACAATGAGAATCGCATGATTCTTATTTAAAAGAAGCAA
TTGCTTCACTACTTGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAGGACTACC
AAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCGTACCG
AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAA
CGTTAAGTAGAGTGGAATACTTAAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGGGACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
AAAGCGAGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTAAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTGT
GCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGAGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAACGTG
ACACTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAGCTGTAGGGAGCTATAAGTTCTCTGTAGCGCAGCTAACGCATTA
AGCACTCCGCTGGGGGAGTACGACCGCCANGGTTGAAACTCAAANGGAATTGACGGGGG
CCNACCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCCGAAAACCTTACCAGGGT
CTTGACATACTCGTGCTATCCCTTAGAGATTAAGGAGTTCCTTCCGGGACACGGGGAAT
ACAGGTGGTGCATGGTTTGTGCGTCACCCTCCGTGTCGGTGGAAATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACCGAGCGCAACCCCTTAATTAATAATTGCCATCCATTAAGTTGGGCCCTTTAAGT
GGAAAACCTGCCGGTGAATAAACCGGAAGGAAGGTGGGGGAGGAGTTCAAATCTTNNNTGC
CCCNTNATAACCGGGGCNACCCCNNTCTNCAAGGGAGGGGAAAANNNGNTCCCCACCC
CNNNGGGGGGCCNAATTCCTNAAACCNNTTTTCNTTTTGGATTGNGGGGNGACCCCCCC
NNGNAAATNGGANCCCNNTANACNGGNNNNCCCCCCCCGGNNAAN
```

1) [gi|51512138|gb|AY699289.1](#) *Lactococcus garvieae* isolate M79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1541

Score = 1850 bits (933), Expect = 0.0  
Identities = 1054/1079 (97%), Gaps = 17/1079 (1%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|19070641|gb|AF352166.1](#) *Lactococcus garvieae* strain FLG12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1544

Score = 1850 bits (933), Expect = 0.0  
Identities = 1054/1079 (97%), Gaps = 17/1079 (1%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|19070640|gb|AF352165.1](#) *Lactococcus garvieae* strain FLG5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1544

Score = 1850 bits (933), Expect = 0.0  
Identities = 1054/1079 (97%), Gaps = 17/1079 (1%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|19070639|gb|AF352164.1](#) *Lactococcus garvieae* strain FLG4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1544

Score = 1850 bits (933), Expect = 0.0  
Identities = 1054/1079 (97%), Gaps = 17/1079 (1%)  
Strand = Plus / Plus

5) [gi|19070638|gb|AF352163.1](#) *Lactococcus garvieae* strain FLG2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1544

Score = 1850 bits (933), Expect = 0.0  
Identities = 1054/1079 (97%), Gaps = 17/1079 (1%)  
Strand = Plus / Plus

6) *Enterococcus seriolicida* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1485

Score = 1850 bits (933), Expect = 0.0  
Identities = 1054/1079 (97%), Gaps = 17/1079 (1%)  
Strand = Plus / Plus

7) [gi|18640076|dbj|AB079369.1](#) *Enterococcus* sp. U1-1 gene for 16S rRNA, partial sequence  
Length = 1494

Score = 1844 bits (930), Expect = 0.0  
Identities = 1054/1080 (97%), Gaps = 17/1080 (1%)  
Strand = Plus / Plus

8) [gi|18640078|dbj|AB079371.1](#) *Enterococcus* sp. U5-1 gene for 16S rRNA, partial sequence  
Length = 1444

Score = 1830 bits (923), Expect = 0.0  
Identities = 1061/1089 (97%), Gaps = 19/1089 (1%)  
Strand = Plus / Plus

9) [gi|56182372|gb|AY669388.1](#) *Lactococcus garvieae* isolate 15G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1548

Score = 1818 bits (917), Expect = 0.0  
Identities = 1050/1079 (97%), Gaps = 17/1079 (1%)  
Strand = Plus / Plus

10) [gi|493094|gb|L32813.1|ENERRD](#) *Enterococcus seriolicida* 16S ribosomal RNA (16S rRNA)  
Length = 1497

Score = 1802 bits (909), Expect = 0.0  
Identities = 1046/1079 (96%), Gaps = 17/1079 (1%)  
Strand = Plus / Plus

### 3. REP 17 (10-1180)

>rep17 sequence exported from rep17\_SB73\_028.ab1

```
ANTGCGCGCCTATACATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATG
ATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCG
GGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGA
GTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGG
TGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACA
TTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAAT
GGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACT
CTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTC
GGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGGA
ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGC
TGCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGT
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTC
AAAGGGAATTGACGGGGGGCCCGCACCAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAAATTCAAAGC
TACGCCGAAGAACCTTAACAGGTCTTGGACATACTATGCAAATCTAAGAAGGATTAAGA
ACGTTCCCTTCGGGGACATGGAATAACAGGGTGGTTGCATTGGGTTGCTTCACCTCC
GGGTTCCGTGGAGAATGTTTGGGGTTAAGTTCACCAACCAAGCGCAACTCTTTATTA
TTCAGTTGGCCACCATTAAATTGGGCCCTCCCGTGTGTGAAACTGCCGGGGTAACAAACC
GGAGAAAGGTGGGGAATAAACTCCAATCATCCAGGCCCTTTATAAACCGTGGCCTCACC
GGGGCTTCAGTGGAAAGGTANACNAGGTTNCAACCCCGNNGNAAAACCTANTTCTTAAAC
CTTNCNTTTCGNATATGGGNCNCCNCCCCCNAAAAGNNGGAANNCTTNAANNCGGNACN
CGTCNCNGGNAAANTTCCCGGCCTTTAACC
```

1) [gi|28271521|emb|AL935258.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/28271521) *Lactobacillus plantarum* strain WCFS1 complete genome; segment 7/11

Length = 297050

Score = 1800 bits (908), Expect = 0.0  
Identities = 986/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Minus

2) [gi|28270119|emb|AL935253.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/28270119) *Lactobacillus plantarum* strain WCFS1 complete genome; segment 2/11

Length = 324050

Score = 1800 bits (908), Expect = 0.0  
Identities = 986/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|1122745|dbj|D79211.1|LBA16SRRN2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/1122745) *Lactobacillus pentosus* gene for 16S rRNA, partial sequence

Length = 1519

Score = 1800 bits (908), Expect = 0.0  
Identities = 986/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Plus

4) *Lactobacillus plantarum* gene for 16S rRNA, partial sequence

Length = 1489

Score = 1800 bits (908), Expect = 0.0  
Identities = 986/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Plus

5) [gi|15408522|dbj|AB070610.1](#) *Lactobacillus* sp.B5407 gene for 16S rRNA  
Length = 1481

Score = 1800 bits (908), Expect = 0.0  
Identities = 986/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Plus

6) [gi|21541789|gb|AF516755.1](#) *Lactobacillus* sp. MR-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1522

Score = 1794 bits (905), Expect = 0.0  
Identities = 985/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Plus

7) [gi|21541788|gb|AF516754.1](#) *Lactobacillus* sp. MR-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1521

Score = 1794 bits (905), Expect = 0.0  
Identities = 985/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Plus

8) [gi|53766378|gb|AY675256.1](#) *Lactobacillus plantarum* strain LP3 16S ribosomal RNA gene, complete  
sequence  
Length = 1559

Score = 1792 bits (904), Expect = 0.0  
Identities = 985/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Plus

9) [gi|21591596|gb|AF515222.1](#) *Lactobacillus plantarum* strain RO7 16S ribosomal RNA gene, complete  
sequence  
Length = 1528

Score = 1792 bits (904), Expect = 0.0  
Identities = 985/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Plus

10) [gi|31711508|dbj|AB112083.1](#) *Lactobacillus plantarum* gene for 16S ribosomal RNA, partial  
sequence  
Length = 1557

Score = 1792 bits (904), Expect = 0.0  
Identities = 985/999 (98%), Gaps = 11/999 (1%)  
Strand = Plus / Plus

#### 4. RP 43 (10-1180)

>rp43 sequence exported from rp43\_SB73\_041.ab1

```
NATGCGCGNGCTATCATGCAGTCGAACGCTTTGTGGTCCAACCTGATTTGAAGAGCTTGCT
CAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCT
ACCTCTTAGCAGGGGATAACACTTTGGAAACAAGTGCTAATACCGTATAACACTAATAACC
GCATGGTTATTAGTTAAAAGATGGTCTTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGTATT
AGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGATACATAGCCGAGTTGAGAGACTG
ATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGC
TCGTA AAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCA GTGTGTGACGG
TATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCC
AAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCATGACGGTTATTTAAGTCCGAAG
TGAAAGCCACAGCTTAACTGTGGAAGTGCTTTTGGAAACTGGATAACTTGAGTGCNGTA
GAGGAGAGTGGA ACTCCTTGTGTAGCGGTTGAAATGCGTAAATATATGGAAGAACCACCA
GTGGCGGAAGCGGCTCTCCTGGA ACTTGTAACTTGGACGTTTGGAAAGGGCTCGTAAAGTT
GTTGGGTAGCCAAAACCAGGAATTAGATACCCTTGGTAGTCCCAACC GGTA AACCGAT
TGAAGTGCTTATATGTTTGGAAAGGGTTTCCCGGCCCTTAAAATTGGTTCGCGAGCTTAAACA
CAATTAAGGC ACTTCTCGCCCCGGGGGGAGTACCGAGCCGGCAGGGTTTGGAACTCCCA
GAGGGAATATAACCGGGGACACCCCGCAACAAGCCGGGTGGAGCAATTGGTGTGTTTAA
TATTTGGAAGGCAAACGCCGCAAGAACCCTGTTACCGAGGTCTTGGACATCCCTTTGTGC
CTCCCTCTGAAAAAATGTAAAGCATTTTCCCGTTTCGGGGAACACAAAGGTACAGGTGGTG
TGATGCATGGTTTTCTCGTCACTCCCTCTTGTCCCGAGAAAAATTTGGGTAATATCCCGC
AAGCAGGCGCGAACCCCTTTTACTAATTGTGGCCTCTTCTCATTGGACCCTCTCGAAGT
GTGAGACAGTGGCCGTTTACAACCCCGTGATAAATGTGGGGATAACTCTTCAAATATAGT
TGGCCCCCTTAAGAACGTGGGGCGTGACAGTGTCATCACACGATGGGAGATGTACACAG
AGTCGGGAGCGCGAGGGGGGTGTGCTCAGATGATCTCAAAAATGTTCTCCTGTGGTGGGGTA
CGCTCACCGCCCGNNGGTNGNNATACCTNGTANTNCCNGATCCNACGNCGCANGANGA
TNANNCGCGGCTNNNGCN
```

1) [gi|6683523|dbj|AB023236.1](#) *Weissella viridescens* DNA for 16S ribosomal RNA, strain NRIC 1536  
Length = 1479

Score = 1324 bits (668), Expect = 0.0  
Identities = 710/719 (98%), Gaps = 4/719 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|175037|gb|M23040.1|LBARRNAO](#) *L.viridescens* 16S small subunit ribosomal RNA  
Length = 1582

Score = 1310 bits (661), Expect = 0.0  
Identities = 708/719 (98%), Gaps = 4/719 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|6683486|dbj|AB022920.1](#) *Weissella minor* gene for 16S rRNA, strain:NRIC 1625  
Length = 1478

Score = 1197 bits (604), Expect = 0.0  
Identities = 694/719 (96%), Gaps = 4/719 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|175036|gb|M23039.1|LBARRNAA](#) *Lactobacillus minor*, 16S small subunit ribosomal RNA  
Length = 1524

Score = 1168 bits (589), Expect = 0.0  
Identities = 689/719 (95%), Gaps = 4/719 (0%)  
Strand = Plus / Plus



- 5) [gi|44147|emb|X52568.1|LV16SRNA](#) *Lactobacillus viridescens* 16S ribosomal RNA  
 Length = 1515
- Score = 1148 bits (579), Expect = 0.0  
 Identities = 681/719 (94%), Gaps = 4/719 (0%)  
 Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|18644190|gb|AF371481.1|](#) Uncultured bacterium clone p-2734-24E5 16S ribosomal RNA gene,  
 partial sequence  
 Length = 1335
- Score = 1128 bits (569), Expect = 0.0  
 Identities = 683/716 (95%), Gaps = 4/716 (0%)  
 Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|18644189|gb|AF371480.1|](#) Uncultured bacterium clone p-2770-24E5 16S ribosomal RNA gene,  
 partial sequence  
 Length = 1510
- Score = 1128 bits (569), Expect = 0.0  
 Identities = 683/716 (95%), Gaps = 4/716 (0%)  
 Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|6683528|dbj|AB023241.1|](#) *Weissella confusa* DNA for 16S ribosomal RNA, strain JCM 1093  
 Length = 1477
- Score = 1128 bits (569), Expect = 0.0  
 Identities = 683/716 (95%), Gaps = 4/716 (0%)  
 Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|44239430|gb|AY537089.1|](#) Uncultured bacterium clone mdt16h11 16S ribosomal RNA gene,  
 partial  
 sequence  
 Length = 721
- Score = 1090 bits (550), Expect = 0.0  
 Identities = 674/709 (95%), Gaps = 5/709 (0%)  
 Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|26801228|emb|AJ422031.1|WC1422031](#) *Weissella cibaria* 16S rRNA gene, strain ACA-DC  
 341 It2  
 Length = 1529
- Score = 1088 bits (549), Expect = 0.0  
 Identities = 678/716 (94%), Gaps = 4/716 (0%)  
 Strand = Plus / Plus

## 5. Clone 138 (10-1050)

>138 sequence exported from 138\_CZ542\_002.ab1

```
AATNCGGNCTTAACATGCAAGTCGAACGGGATCCATCAGGCTTTGCTTGGTGGTGAGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCATACACCGGAATAGCTCCTGGAAA
CGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCGACTCCTCGCATGGGGTGTCTGGGAAAGATTTTCATCGG
TATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGGTAGTCGGCGGGGTAACGGCCACCGAGCCTACG
ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCC
GCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCGCTTTTGATCGGGAGCAAGCCTTCGGG
TGAGTGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGGCGTTCTGCGCGTC
CGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGAGTGC
GGTAGGGGAGACTGGAATTCGGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACAC
CAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGATGCTGGATGTGGGGCC
CGTTCACGGGTTCCGTGTCTGGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCGCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGACATGCGGATT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACAGCCGTAAGA
TATGGCCTCCCTTCGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGTCGTCTGTCAGTCTGTCGTGAG
ATGTTGGGTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTCCCCTGTNTTGCAGCCCGTCATGTGGAAC
TCACGGGGGAACCGCGGGTCAACTCGGAAGAAGGGGGGATAAATAAATANATGCCCNNTTA
CNTCANGGTTTNCNAGGCTNAAATGGCCGGTAAACGGGATNCCCACCCGGCACCTNGA
ACGNANCNNTTAAACCGGTTCTTTNCGNATTGGANTCCN
```

1) [gi|4730862|dbj|D86187.1](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1961 bits (989), Expect = 0.0  
Identities = 1036/1044 (99%), Gaps = 7/1044 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|14388778|gb|AF253367.1](#) Uncultured bacterium (human infant) S7A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1406

Score = 1897 bits (957), Expect = 0.0  
Identities = 1024/1040 (98%), Gaps = 9/1040 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|16612136|gb|AF432082.1](#) *Bifidobacterium catenulatum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1445

Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 1026/1044 (98%), Gaps = 8/1044 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|57231888|gb|AY856700.1](#) *Bifidobacterium* sp. h12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1450

Score = 1865 bits (941), Expect = 0.0  
Identities = 1025/1044 (98%), Gaps = 8/1044 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|14388783|gb|AF253372.1](#) Uncultured bacterium (human infant) L14B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1403
- Score = 1842 bits (929), Expect = 0.0  
Identities = 1024/1046 (97%), Gaps = 10/1046 (0%)  
Strand = Plus / Minus
- 6) [gi|14388777|gb|AF253366.1](#) Uncultured bacterium (human infant) S7B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1402
- Score = 1784 bits (900), Expect = 0.0  
Identities = 1007/1047 (96%), Gaps = 11/1047 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|13160586|gb|AF275893.1](#) Uncultured *Bifidobacterium* sp. 9B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1360
- Score = 1768 bits (892), Expect = 0.0  
Identities = 983/1006 (97%), Gaps = 8/1006 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|12247890|gb|AF333390.1|AF333390](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1357
- Score = 1746 bits (881), Expect = 0.0  
Identities = 1009/1044 (96%), Gaps = 7/1044 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|4730857|dbj|D86182.1](#) *Bifidobacterium angulatum* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1520
- Score = 1719 bits (867), Expect = 0.0  
Identities = 981/1006 (97%), Gaps = 11/1006 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|13160577|gb|AF275884.1](#) Uncultured *Bifidobacterium* sp. 13D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1297
- Score = 1667 bits (841), Expect = 0.0  
Identities = 965/998 (96%), Gaps = 10/998 (1%)  
Strand = Plus / Plus

## 6. REP 12 (20-1010)

>rep12 sequence exported from rep12\_SB73\_012.ab1

```
GGNATNGCGNGNCCTATCATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATC
ATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAA
GCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTC
CGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGA
TGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC
AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA
ACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
TTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT
GGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCATAACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTC
AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCAACCAAGCGGTGGGACAATGTGGTTAATTGCAAGCT
ACCCGAAGAACCTTTACCCAGGTCTTGACATACTTATTGCAAATCTAGAAGATTAAGANC
NTTCCCTTCCGGGGACATTGGAATACAGGGTGGGTGCATGGGTTTGTCTCCAGCCCGTT
GTCCGGGAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAANNAAGCCCNACCCTTNTTATNAATTTGCNA
GCANTNANTTTGGGCCCTTGGGTAAANNTGCCGGGTANNAACNGNAGGNAGGGNGGGA
ANGNATNCNAACNNCCTGGCCCCNTATACACCTGGGCNACNNCTNCTANANNNGGNGGGA
NACCNANNTTCGCNNNCCCNGAGNAANCCTATTCCTTTAAAACCNNTTTCCANTNCGNAT
GTGGGCGNCCCNCCCCNNNNAANGAAACCNTTNAATCCCGANNTNCNCNCCCAGGNA
AAACTNN
```

1) [gi|28271521|emb|AL935258.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/acc.cgi?acc=gi|28271521|emb|AL935258.1) *Lactobacillus plantarum* strain WCFS1 complete genome; segment 7/11

Length = 297050

Score = 1812 bits (914), Expect = 0.0  
Identities = 965/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Minus

2) [gi|28270119|emb|AL935253.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/acc.cgi?acc=gi|28270119|emb|AL935253.1) *Lactobacillus plantarum* strain WCFS1 complete genome; segment 2/11

Length = 324050

Score = 1812 bits (914), Expect = 0.0  
Identities = 965/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|1122745|dbj|D79211.1|LBA16SRRN2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/acc.cgi?acc=gi|1122745|dbj|D79211.1|LBA16SRRN2) *Lactobacillus pentosus* gene for 16S rRNA, partial sequence

Length = 1519

Score = 1812 bits (914), Expect = 0.0  
Identities = 965/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|50284518|dbj|AB183696.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/acc.cgi?acc=gi|50284518|dbj|AB183696.1) *Lactobacillus plantarum* gene for 16S rRNA, partial sequence

Length = 1489

Score = 1812 bits (914), Expect = 0.0  
Identities = 965/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Plus

5) [gi|15408522|dbj|AB070610.1](#) *Lactobacillus* sp.B5407 gene for 16S rRNA  
Length = 1481

Score = 1812 bits (914), Expect = 0.0  
Identities = 965/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Plus

6) [gi|21541789|gb|AF516755.1](#) *Lactobacillus* sp. MR-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1522

Score = 1806 bits (911), Expect = 0.0  
Identities = 964/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Plus

7) [gi|21541788|gb|AF516754.1](#) *Lactobacillus* sp. MR-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1521

Score = 1806 bits (911), Expect = 0.0  
Identities = 964/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Plus

8) [gi|53766378|gb|AY675256.1](#) *Lactobacillus plantarum* strain LP3 16S ribosomal RNA gene, complete  
sequence  
Length = 1559

Score = 1804 bits (910), Expect = 0.0  
Identities = 964/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Plus

9) [gi|21591596|gb|AF515222.1](#) *Lactobacillus plantarum* strain RO7 16S ribosomal RNA gene, complete  
sequence  
Length = 1528

Score = 1804 bits (910), Expect = 0.0  
Identities = 964/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Plus

10) [gi|31711508|dbj|AB112083.1](#) *Lactobacillus plantarum* gene for 16S ribosomal RNA, partial  
sequence  
Length = 1557

Score = 1804 bits (910), Expect = 0.0  
Identities = 964/976 (98%), Gaps = 7/976 (0%)  
Strand = Plus / Plus

## 7. REP 13 (20-1010)

>rep13 sequence exported from rep13\_SB73\_027.ab1

```
GANTGCGCCNNCTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAAT
TGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGA
TAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTG
AAAGGCGCTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG
AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTT
GTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTC
AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC
ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCT
GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTCAGTGCTG
CAGCAAACGCATTAAGCACTCCCGCCTGGGGGAGTACGACCCGCAAGGGTTGAAACCTTC
AAAGGAATTGAACGGGGGCCCGCACCAGGCGGTTGGAAGCATGGTGGTTTAAATTCGAAA
GCAAACCCNAAAGAACTTTAACCCAGGGTCTTGGAAACAATCCTTTTGAACCNCTNNA
ANAGAACCTTTNCCNNTTTCNNGGANAAANTGGACAGGTGGNGCAGGNTTNTCCTCACTC
CTNGTCTGGAAANGTTGGGTTAAATTNCCGCANCANANGCCCACCNTTATGGTAGTTG
CCANCCNTTTNGTTGGCNNTTTNCCNNAANNNNCCGGNAAAAACCCGNAGGAAAGGN
GGGANACNTNCAATNNNNNGCCCCCTNNNNACCNGGGCANCACCTTTCTNNAATGGGN
AANCANNAGNNTCCTAACCCCGNGGCTTCANATTNTTAAANCNTTCTCNNTTNAATTGC
GGCNCNCTNCCCCNNGAANGGAATCCTTNATNCCGAAAATCCCCCCCCGGANAANCTT
TCCCGGCCNTT
```

- 1) [gi|57117784|gb|AY850358.1|](#) *Enterococcus faecalis* strain SFL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1553

Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 2) [gi|29345086|gb|AE016957.1|](#) *Enterococcus faecalis* V583, section 11 of 11 of the complete genome  
Length = 176545

Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Minus

- 3) [gi|29344791|gb|AE016956.1|](#) *Enterococcus faecalis* V583, section 10 of 11 of the complete genome  
Length = 304454

Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Minus

- 4) [gi|29343010|gb|AE016950.1|](#) *Enterococcus faecalis* V583, section 4 of 11 of the complete genome  
Length = 301488

Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|40363632|dbj|AB154827.1|](#) *Enterococcus faecalis* gene for 16S ribosomal RNA, complete sequence  
Length = 1522
- Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|50593487|gb|AY692453.1|](#) *Enterococcus faecalis* strain SL5 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1570
- Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|17977839|emb|AJ420803.1|EFA420803](#) *Enterococcus faecalis* 16S rRNA gene, strain CECT481T  
Length = 1477
- Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|21591597|gb|AF515223.1|](#) *Enterococcus faecalis* strain RO90 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1522
- Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|2828135|gb|AF039902.1|AF039902](#) *Enterococcus faecalis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1494
- Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|5578753|emb|Y18293.1|EFE18293](#) *Enterococcus faecalis* 16S rRNA gene  
Length = 1449
- Score = 1679 bits (847), Expect = 0.0  
Identities = 898/906 (99%), Gaps = 8/906 (0%)  
Strand = Plus / Plus

## 8. REP 20 (20-900)

>rep20 sequence exported from rep20\_SB73\_043.ab1

```
GNAANGCGGCTNCTACACATGCAAGTCGAGCGATGAAGTTTTCTTCGGGAAACGGGAT
TAGCGGCGGACCGGTGAGTAACACGCTGGGATAACCTGCCTTGTAGTGGGGGATAGCCTT
TCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATATTGTAGTATCGCATGGTACAACAATCAAAAAGA
GCAATCTGCTACAAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACC
AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG
CCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGC
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGTCTTCGGATTGTAAAACCTCTGTCTTTGGGGACGAT
AATGACGGTACCCAAGGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTATAGCGTGATGTTT
AAATGGGATGTATGAAATACTCGGTGCCTCAACCTGAGTGCTGGCATTCCAATCTGGGA
TATCTATTATTGCTGCGACTGGTGAGTAGTTGGAATTTCCGTCTGTTAACCGGTGTGAAA
TGTGCATTTAGTAGGAATTTACGGAATAACTCCCAGTTGGCCTAAATGGGCGAACTTCTT
TTGTTGGGTGCTTGGTATCCTGTAACCTGCCTATAGGTCTCTAAAGCACGTGGTGGGATGG
CCTAACACTAGGTAATAAAATTAACCCTCGTTGGGCTGTATGTTCCGATCGTCCCGAGTA
AAAGCGTATGTGTGATCACCTAGAGGTGTTGGGGAAGGACGGTCTCGTAGCTTCCGTTTT
CCGGTNTCNGNCGTNAAGGTNNANTNATGTANNNTCNCCCCTGNNNGAGNTCGGTTCCG
GATTNNAGANCTCNCTNNGNNNTGCNGTGGGNCGGNCNNGCNTATNNAACCNNTANNT
TNTTNNNTCGGANNNTCNGNNGATCATCCANNNTNCTNNANNNTGNNNTACTTNNNTGN
NNANNNGTTNNGNCGNNGGAANTNGTNTTANNNNGNNNANCTTNCCTCCCNTNTNTCAT
NTNTNNTCCCCNNNCTGCTNTNTNNTNGATNTTANAGATANAACNCCNCCNNTNTGC
CGNNGGACCCCGCTNTANATNTNATNACNTCANTNTNTNCCNCCNTNTCNTCCACTNTN
CNCNTNCTTTCNTCTNNGNNTNTTNNAGNTNNNTNCNATCTGTCNCTCCNNTTANTT
GTGGACTTTGCCTCCTCNTNTNGTCCATTANNCANTGTTNGNTTNTCGNCGCTGCGCC
CTAAATNNTCTTATNTNGTNTNTNNTCNTTANTNTNNNNNAANNNTGNNTNGCNAGNNC
TNGTANTCTNAATNNNCTNNTTAGANGTTNAGGNNNNNTCNNTCTGNNNGNCCNTNTN
CGCNGTTCGNTATNCTNTNTAANNACATGNTCGNC
```

1) [gi|762805|gb|L34622.1|EUBRRDS](#) *Eubacterium moniliforme* 16S ribosomal RNA  
Length = 1463

Score = 787 bits (397), Expect = 0.0  
Identities = 487/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|437769|emb|X73446.1|CS16SRNC](#) *Clostridium sardiniense* 16S rRNA gene, strain DSM 2632  
Length = 1510

Score = 785 bits (396), Expect = 0.0  
Identities = 488/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|33517446|gb|AY341243.1|](#) *Clostridium baratii* clone D12 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1466

Score = 785 bits (396), Expect = 0.0  
Identities = 488/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|33517445|gb|AY341242.1|](#) *Clostridium baratii* clone 111 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1466

Score = 785 bits (396), Expect = 0.0  
Identities = 488/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus



5) [gi|46359709|dbj|AB161374.1](#) *Clostridium sardiniense* gene for 16S rRNA, strain:KZ 1544,  
sub\_clone:c2  
Length = 1519

Score = 785 bits (396), Expect = 0.0  
Identities = 488/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus

6) [gi|46359708|dbj|AB161373.1](#) *Clostridium sardiniense* gene for 16S rRNA, strain:KZ 1544,  
sub\_clone:c1  
Length = 1519

Score = 785 bits (396), Expect = 0.0  
Identities = 488/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus

7) [gi|46359707|dbj|AB161372.1](#) *Clostridium sardiniense* gene for 16S rRNA, strain:DSM 600,  
sub\_clone:c2  
Length = 1519

Score = 785 bits (396), Expect = 0.0  
Identities = 488/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus

8) [gi|46359705|dbj|AB161370.1](#) *Clostridium sardiniense* gene for 16S rRNA, strain:DSM 599,  
sub\_clone:c2  
Length = 1519

Score = 785 bits (396), Expect = 0.0  
Identities = 488/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus

9) [gi|46359704|dbj|AB161369.1](#) *Clostridium sardiniense* gene for 16S rRNA, strain:DSM 599,  
sub\_clone:c1  
Length = 1519

Score = 785 bits (396), Expect = 0.0  
Identities = 488/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus

10) [gi|46359703|dbj|AB161368.1](#) *Clostridium sardiniense* gene for 16S rRNA, strain:DSM 2632,  
sub\_clone:c2  
Length = 1519

Score = 785 bits (396), Expect = 0.0  
Identities = 488/512 (95%), Gaps = 5/512 (0%)  
Strand = Plus / Plus

## 9. RP 10 (20-1080)

>rp10 sequence exported from rp10\_SB73\_009.ab1

```
GAANNNGGNGNCTAAACATGCAGTCGAACGGGATCCATCAAGCTTGCTTGGTGGTGAGAG
TGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATGCTCCGGAATAGCTCCTGGAA
ACGGGTGGTAATGCCGGATGTTCCACATGATCGCATGTGATTGTGGGAAAGATTCTATCG
GCGTGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTC
GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGC
CGCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTGTGGGAGCAAGCCTTCGG
GTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGGCGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGGCGCTCGTCGCGT
CCGGTGTGAAAGTCCATCGCTAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGAGTG
CGGTAGGGGAGACTGGAATTCGGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACA
CCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGACGCTGGATGTGGGGC
ACGTTCCACGTGTTCCGTGTCCGAGCTAACCGGTTAAAGCGTCCCGCCTGGGGAAGTACG
GCCGAAAGGCTAAACTCAAAGAAATTGACCGGGGGCCCGCAACAAGCGGCGGGAACAT
GCGGGAATTAATTCCGATGCAACGCGAAAAAACCTTTACCTGGGGCTTGACAATGTTTC
CCGACAAACCCCGAAAATGGCGGTTTTCCCTTCGGGGGCGGGTTCACAGGTGGGGGCCAG
GGTCCGTCTTCAACCTCCGTGTCCGTGAAAAATGTTTGGGTTAATTCCCGCAAACGAAG
CGCNAACCCTNCNCCCGTTGTTNCCNACCCCNNTTNTTGGNGGGGAAACNCCNCGGGG
AACCCCGGGGTTTAAACNCTNAAGAAAGGTNGGGAAAAAANNAANAANAATTCANNCCC
CNTTAAGNTCAGGGCTTCCCNNANTNNTCAAATGGCCNGGNNAANNGGNATNCNAACA
TNNCGCANTTGAANGGAATNCCTNAAANCCGTTCCCTTTNNANATGAAACCTGTACAC
CNGGTTCTGGNNAGGGGGANTTCTNNAATNCGGNAAAACACCCCCCGGAAAA
```

1) [gi|808106|gb|U25952.1|BBU25952](#) *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3202 16S rRNA gene  
Length = 1488

Score = 1657 bits (836), Expect = 0.0  
Identities = 897/907 (98%), Gaps = 9/907 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|808105|gb|U25951.1|BBU25951](#) *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3202 16S rRNA gene  
Length = 1488

Score = 1657 bits (836), Expect = 0.0  
Identities = 897/907 (98%), Gaps = 9/907 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|244838|gb|S83624.1|S83624](#) 16S rRNA [*Bifidobacterium bifidum*, DSM 20456T, Genomic, 1532 nt]  
Length = 1532

Score = 1614 bits (814), Expect = 0.0  
Identities = 895/909 (98%), Gaps = 11/909 (1%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|173880|gb|M38018.1|BIFRRDQ](#) *B. bifidum* small subunit ribosomal RNA gene  
Length = 1532

Score = 1598 bits (806), Expect = 0.0  
Identities = 859/873 (98%), Gaps = 5/873 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|51703256|gb|AY694148.1](#) *Bifidobacterium bifidum* 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1466
- Score = 1578 bits (796), Expect = 0.0  
Identities = 889/907 (98%), Gaps = 11/907 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|14388806|gb|AF253395.1](#) Uncultured bacterium (human infant) D39Ebif 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1354
- Score = 1536 bits (775), Expect = 0.0  
Identities = 849/875 (97%), Gaps = 5/875 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|22002912|emb|AJ307005.1|BSC307005](#) *Bifidobacterium scardovii* partial 16S rRNA gene, strain CCUG 13008  
Length = 1380
- Score = 1302 bits (657), Expect = 0.0  
Identities = 856/908 (94%), Gaps = 12/908 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|7110448|gb|AF227870.1|AF227870](#) *Bifidobacterium* sp. 65947 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1505
- Score = 1302 bits (657), Expect = 0.0  
Identities = 856/908 (94%), Gaps = 12/908 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|4730862|dbj|D86187.1](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DNA for 16S ribosomal RNA,  
partial sequence  
Length = 1519
- Score = 1302 bits (657), Expect = 0.0  
Identities = 854/908 (94%), Gaps = 10/908 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|52854423|gb|AY736853.1](#) *Bifidobacterium longum* bv. *Infantis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1480
- Score = 1294 bits (653), Expect = 0.0  
Identities = 853/907 (94%), Gaps = 12/907 (1%)  
Strand = Plus / Plus

## 10. RP-13 (20-1040)

>rp13 sequence exported from rp13\_SB73\_010.ab1

```
ACTGCGCNCCTATCATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTAC
CGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGG
GATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGA
TGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAAGTGTGGTGGG
GTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC
GCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGT
TGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTATCTAACCAGCAA
GTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
TTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCT
TAACCGGAGTAGTGCATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGCTCTC
TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCC
GCAGCTAACGCAATAAGCATTCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAA
GGAATTGACGGGGGCCCGCCACAAGCGGGTGGANCAATGTGGGTTTAATTGAAAGCAAAA
CGCCAAGAAACCTTACCAGGTCTTTGACATCCCTTTTTGACCCACCTAAAAAATTAGGG
TTTTCCCTTCCGGGGAACAAANNNTGACAGGNGGGNGCAAGGGCTNNTCTCCANNCNNT
GTTCNNGGNANNTTGGGTTAAANTTCCCCCNACCNAGCCNCCACCCCTTGTGNNNGTT
TGCCNACCANTTAAGTTTGGGCCNNTTGNNNNNACTGNCGGTNANNAACCCGGANGGAA
GGGTGGGGAANACCTNNANTTCTNCAGNCCCCCTNTNACNGGGGCNNACCNCNGTCNN
NAANGGANGGAAAANCNNTNCNCAAACCCNGGTTTACCNAATNNTTAAACCCTTNTNN
TTTNGNATTNGGGNGGCCCCCCCCCCANAGNATNCGNANCCNTTATNCNAANNNNNNTN
NCNGGANAAC
```

- 1) [gi|22213633|gb|AY137589.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1230 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 2) [gi|22213632|gb|AY137588.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1047 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 3) [gi|22213631|gb|AY137587.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1046 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1489

Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 4) [gi|22213630|gb|AY137586.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1045 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|22213629|gb|AY137585.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519
- Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|22213628|gb|AY137584.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1042 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519
- Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|15987824|gb|AF420311.1|AF420311](#) *Lactobacillus salivarius* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1515
- Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|6625772|gb|AF201900.1|AF201900](#) Chicken intestinal bacterium MRS 4.5 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1484
- Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|18644206|gb|AF371497.1|](#) Uncultured bacterium clone p-4323-4Wa3 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1482
- Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [>gi|12963449|gb|AF335475.1|AF335475](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* 16S ribosomal RNA gene,  
complete sequence  
Length = 1517
- Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0  
Identities = 953/965 (98%), Gaps = 10/965 (1%)  
Strand = Plus / Plus

## 11. RP 35 (20-1050)

>rp35 sequence exported from rp35\_SB73\_025.ab1

```
GNATGCGNGNCTATCATGCAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTACC  
GTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGGGG  
ATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGAT  
GAAAGATGGTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCCGGGCGTATTAAGTGGTGGTGGG  
TAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGG  
ACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG  
CAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTT  
GTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAG  
TCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT  
TTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTT  
AACCGGAGTAGTGCATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCC  
ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCT  
GGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG  
TAGTCCACGCCGTAACAGTGAATGCTAGGTGTTGGGAGGGGTTTCGCCCTTCAGTGCC  
GCAAGCTTACGCAATAAGCCATTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCGCCAAGGTTGAAAAC  
TCAAAGGGAATTGACGGGGGGCCCGCCACAAGCCGGTGGGAAGCCTTGTGGTTTTAATTC  
GAAAGCAACCGCCGAAAAACCTTTACCAGGTCTCTTTGACCATTCCCTTTTGAACCCACC  
CTTAAAGAAAATTAAGGCTTTTCCCTTTTCGGGGANAAANTTGAANAGGTGGTTGCNTNGG  
CTTGTCCNTCAACCTCCNNGTCNNGNNAAGTTGGGTTTAAANTCCNNCNACNANNCCCA  
NCCNTTNTTTTCANTTGCCNACNTTAAANTTNGGCCCCCGCCGAAACCTGCCGGGTGANN  
NNCCGGANGNANGGGGGGNCANACTCNCAAGCNNTNCGCCCCCTTNNANCTGGGCTCCCN  
CTTGCNCNATGNNGGGGGNCAACAATCCNCAACCNGGGGTTTACTANTCTTTAAANCC  
TNCCTTNCGGATTNGGNGNCCCCCNAGAANNGAANCCNTNACCCAAAACCNCTCNGG  
GNAAAANTCCGGGGGTTTAAACCCCTTACNTAAA
```

- 1) [gi|22213633|gb|AY137589.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1230 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 2) [gi|22213632|gb|AY137588.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1047 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 3) [gi|22213631|gb|AY137587.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1046 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1489

Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 4) [gi|22213630|gb|AY137586.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1045 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|22213629|gb|AY137585.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519
- Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|22213628|gb|AY137584.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1042 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519
- Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|15987824|gb|AF420311.1|AF420311](#) *Lactobacillus salivarius* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1515
- Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|6625772|gb|AF201900.1|AF201900](#) Chicken intestinal bacterium MRS 4.5 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1484
- Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|18644206|gb|AF371497.1](#) Uncultured bacterium clone p-4323-4Wa3 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1482
- Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|12963449|gb|AF335475.1|AF335475](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* 16S ribosomal RNA gene,  
complete sequence  
Length = 1517
- Score = 1626 bits (820), Expect = 0.0  
Identities = 887/901 (98%), Gaps = 10/901 (1%)  
Strand = Plus / Plus

## 12. RP 40 (20-1000)

>rp40 sequence exported from rp40\_SB73\_026.ab1

```
NNTGCGCGNGCCTATCATGCAAGTCGAACGCACTTTCTTTACCCGTAGTCTTGCTACATC
GGAAAGAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGCTGGGTAACCTGCCCATCAGCGGG
GGATAACACTTGAGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATATCATTTCTCGCATGAGAGTGT
GATTGAAAGCGCAACTGCGTCACTGATGGATGGACCCGCGCGTGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCTGCGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG
GACGCAAGTCTGACCGAGACAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACT
CTGTTGTTAGAGGAAGAACAGGGATGAAAGTGGAAAGTTCATCCTATAGACGTGTATCTA
ACCTAGTAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCATGCAGCCGCGTGTAGATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGAGATTTATTGGGCGTATAAGCTGTAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTG
TATGTGAAAGCCCACGGCTTAACCGTGGAGGGTCATTGGAGAAGTGGGGAGACTTGGAGT
GCAGAAAAGGAAAGCGGGAATTCATGTGTTAGCGGGTGGAAATGCGTAGATATATCGGA
GGAACACCCAATTGGCGAAGGCGGGCTTTCTGGTCTGGTAAACTGAACGCCTGAGGGCTC
CAAAGCATGGGCGGAGCAAAACAGGGAATTAGGAGTAGCCCTTGGGTAGTTCACGCC
GTTAAAACCGATGAGGTGGCTAAAGAATGGCTTGGGAAGGGGTTTTCCGCCCTTTCAG
TGCCTTGCAGGCCAAACTCATTTAGGGCCACCTTCGCCCCGGGGGAGTTACCCAACCGCG
CCAAGGGTNGAAAACCTTCAAAGGGAATTTGACACGGGGGACACCCCCACCANGCGGNGG
NANCNNGTGGTTTCTANTTCNGAANCAANCCCGTANAACCTTNNCNGGGGCNTGNGANTT
NCCTTTTGACCTCCNAAAANANNGGAATTTTCNCCTTNCNGGGAAAAANTNAANNANNC
GGNGCNGNGATTNNGCTCCNNTTNCNTTNCNNTTAATTTTTNGGTATANCTCCCGNANN
NGTGNANAAACGTTTANNTTATGNTCCNCNNTCNANTNNGGTCCNTANNTNNCNGT
CCNAANACTANNTNANANACNGGGGGTGANCTNNCNAATNTTTNTCNCNCNGTNCNTCN
CGNGNNNNNACCGCCCTCAAGGGTAANAGACNCNGTNGNNTNTCTNTTCGGGNAANN
NNCTGCNGAANTCGNCTCNTCCGNGGNAANAGATCGTCACGTNNCCTTCNGTNNNCTNGT
NATTTATNAAGNAGAGANGACTNNCCCCGNGNAACNATCNCTCTNCNANNGTNACC
```

1) [gi|4234620|gb|AF061006.1|AF061006](#) *Enterococcus columbae* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1480

Score = 890 bits (449), Expect = 0.0  
Identities = 694/738 (94%), Gaps = 32/738 (4%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|5578769|emb|Y18275.1|ECOL18275](#) *Enterococcus columbae* (strain NCIMB 13013T)16S rRNA gene

Length = 1443

Score = 884 bits (446), Expect = 0.0  
Identities = 693/738 (93%), Gaps = 32/738 (4%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|11342554|emb|AJ301828.1|ECO301828](#) *Enterococcus columbae* 16S rRNA gene, strain LMG 11740

Length = 1818

Score = 876 bits (442), Expect = 0.0  
Identities = 692/738 (93%), Gaps = 33/738 (4%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|34304720|gb|AY365054.1](#) *Enterococcus cecorum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1462

Score = 771 bits (389), Expect = 0.0  
Identities = 679/738 (92%), Gaps = 32/738 (4%)  
Strand = Plus / Plus



5) [gi|4234623|gb|AF061009.1|AF061009](#) *Enterococcus cecorum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1509

Score = 763 bits (385), Expect = 0.0

Identities = 678/738 (91%), Gaps = 32/738 (4%)

Strand = Plus / Plus

6) [gi|11342553|emb|AJ301827.1|ECE301827](#) *Enterococcus cecorum* 16S rRNA gene, strain LMG 12902

Length = 1667

Score = 761 bits (384), Expect = 0.0

Identities = 677/737 (91%), Gaps = 32/737 (4%)

Strand = Plus / Plus

7) [gi|5578762|emb|Y18355.1|ECE18355](#) *Enterococcus cecorum* 16S rRNA gene

Length = 1409

Score = 757 bits (382), Expect = 0.0

Identities = 677/738 (91%), Gaps = 32/738 (4%)

Strand = Plus / Plus

8) [gi|13898908|gb|AF357562.1|AF357562](#) *Bacterium* mpn-isolate group 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1413

Score = 728 bits (367), Expect = 0.0

Identities = 640/696 (91%), Gaps = 30/696 (4%)

Strand = Plus / Minus

9) [gi|40840|emb|X56422.1|EC16SRNAG](#) *E. columbae* 16S rRNA gene

Length = 1493

Score = 714 bits (360), Expect = 0.0

Identities = 666/738 (90%), Gaps = 32/738 (4%)

Strand = Plus / Plus

10) [gi|46787|emb|X54290.1|SC1RRNA](#) *S. cecorum* gene for 16S ribosomal RNA

Length = 1496

Score = 656 bits (331), Expect = 0.0

Identities = 656/731 (89%), Gaps = 32/731 (4%)

Strand = Plus / Plus

### 13. RP 57 (20-1030)

>rp57 sequence exported from rp57\_SB73\_057.ab1

```
ACNGCGNGNCCTATCATGCAAGTCGAACGAAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTAC
CGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGGG
GATAAACTTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGA
TGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAAGTGTGGTGGG
GTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC
GCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGT
TGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTATCTAACCGCAA
GTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
TTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCT
TAACCGGAGTAGTGATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACCTC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGCTCTC
TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCG
CAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAAAAATAAGGCTTTCCCTTCGGGGACA
AGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCNTCNCCNNGTCCNGNAAAGTTTGGGTAAATCCCNC
AACGGCNCCANCCCTTNTTGNCAATTNCCANCATNAATTNNGCCCCCTGGCNAACGCCGGTG
ANNANCCGGANGAAGGTGGGGANAACNTCAATNCCNCCNCCNTTNNACCTGGGCCNCCC
CCNTNCAANTGGNCGGNANNNATCCNNANCCNNGGTTTACCNANTNNTAAACCTT
NNNNTTNAATNNGGCNCNCCCCCNNNNANNGGANCCNNNANCCNAACCNNNCCGGG
AAAATTCNNGGNTTTANNC
```

1) [gi|22213633|gb|AY137589.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1230 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1966 bits (992), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|22213632|gb|AY137588.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1047 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1966 bits (992), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|22213631|gb|AY137587.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1046 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1489

Score = 1966 bits (992), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|22213630|gb|AY137586.1](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1045 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1966 bits (992), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|22213629|gb|AY137585.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519
- Score = 1966 bits (992), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|22213628|gb|AY137584.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1042 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519
- Score = 1966 bits (992), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|15987824|gb|AF420311.1|AF420311](#) *Lactobacillus salivarius* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1515
- Score = 1966 bits (992), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|6625772|gb|AF201900.1|AF201900](#) Chicken intestinal bacterium MRS 4.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1484
- Score = 1966 bits (992), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|12963449|gb|AF335475.1|AF335475](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1517
- Score = 1966 bits (992), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|37654436|gb|AY389803.1|](#) *Lactobacillus salivarius* strain RA2115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1523
- Score = 1959 bits (988), Expect = 0.0  
Identities = 1007/1012 (99%), Gaps = 1/1012 (0%)  
Strand = Plus / Plus

#### 14. RP 58 (20-1050)

>rp58 sequence exported from rp58\_SB73\_058.ab1

```
ANTGCGCNCCTATCATGCAAGTTAGAACGCTGAAGACTTTAGCTTGCTAAAGTTGGAAG
AGTTGCGAACGGGTGAGTAACCGGTAGGTAACCTGCCTACTAGCGGGGATAACTATTGG
AAACGATAGCTAATACCGCATAACAGCATTTAACCCATGTTAGATGCTTAAAAGGAGCAA
TTGCTTCACTAGTAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCG
AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAA
CGTGTGTGAGAGTGGAAGTTACACAGTGACGGTAACTTACCAGAAAGGGACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
AAAGCGAGCGCAGGCGGTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAACCATTGTTC
GCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGT
ACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTTAGTGCCGCAGCTAACGCATT
AAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAATTCGAAACACCCCGAAAAACCTTTACCAGGT
CTTGACATCCCGATGCTATTCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGGAACATCCGGTGAAAAG
GTGGTGCATGGTTGTCCTCACCTCTGTCTCTNGAAANGTTGGGTTAAGTCCCNCNACNAN
NCCANCCCCNTNNTGNTTANTTNCCATCNTTAATTTGGCCNCTCTACNAAACTGCCGGTA
ANAAACCGNNGGAAGGNGGGGNGGAGNTCAANTCTCNNGCCCCTTNTNACCGGGCANNNC
CANNNNAAANNGTTGGGNNNACNATTCCNNATCNTNANNNCNNANAANTTTNTNAAACCNAN
NCNNTTNGNNTTNNGGNNCCCCCCCCCNNAANNGNAANCCNNNANNCNGNAANNCCC
CCNNGNNAANNTTNNCGGGTTTANANNCCCC
```

1) [gi|16798424|gb|AF429763.1](#) *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1473

Score = 1907 bits (962), Expect = 0.0  
Identities = 1014/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|11095286|gb|AF298199.1|AF298199](#) *Streptococcus* sp. LRC 0476 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1480

Score = 1907 bits (962), Expect = 0.0  
Identities = 1014/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|1944074|dbj|AB002481.1](#) *Streptococcus bovis* DNA for 16S rRNA, strain ATCC 27960  
Length = 1500

Score = 1907 bits (962), Expect = 0.0  
Identities = 1014/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|38374179|gb|AY442813.1](#) *Streptococcus bovis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1498

Score = 1899 bits (958), Expect = 0.0  
Identities = 1013/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|33638254|gb|AY347306.1|](#) *Streptococcus bovis* strain Sb R1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1470
- Score = 1899 bits (958), Expect = 0.0  
Identities = 1013/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|15011526|gb|AF396921.1|](#) *Streptococcus bovis* strain C14b1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1539
- Score = 1899 bits (958), Expect = 0.0  
Identities = 1013/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|6573183|gb|AF202263.1|AF202263](#) *Streptococcus bovis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1540
- Score = 1899 bits (958), Expect = 0.0  
Identities = 1013/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|4324443|gb|AF104109.1|AF104109](#) *Streptococcus bovis* strain JB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1541
- Score = 1899 bits (958), Expect = 0.0  
Identities = 1013/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|7230383|gb|AF135453.1|AF135453](#) *Streptococcus bovis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1462
- Score = 1899 bits (958), Expect = 0.0  
Identities = 1013/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|40737885|gb|AY500370.1|](#) *Streptococcus bovis* isolate Sb5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1470
- Score = 1899 bits (958), Expect = 0.0  
Identities = 1013/1026 (98%), Gaps = 4/1026 (0%)  
Strand = Plus / Plus

## 15. RP 78 (20-1010)

>rp78 sequence exported from rp78\_SB73\_007.ab1

```
GNNNNGCGNGNCCTATCATGCAGTTCGAACGCACTTTCTTTACCGTAGCTTGCTACACC
GAAAGAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAACCTGCCCATCAGCGGGGG
ATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATATTACTTTTCGCATGAGAAGTAATT
GAAAGGCGCAACTGCGTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGC
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTG
TTAGAGAAGAACAGGGATGAGAGTGGAAAGTTCATCCTATGACGGTATCTAACAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTT
AACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGAATTCC
ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTTC
TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTTGGGGGAGCAAACAAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCCACGCCGTAACGATGAATTGCTAAGTGGTTGGAAGGGGTTTCCGCC
CTTCAGTGCCTGCAGCCAAAACGCATTAGCCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCCAG
GTTGAAAACCTCAAAGGAATTTGACGGGGGACCCCCACAAACCGTGGAAGCATGTTGG
GTTTTTAATTTTCGTAAGCCACCGCCTAAAGAAACTTTACCAGGGTCTTGGANANNCTT
TTTGNACCCTTCTTANAANNGGGACTTTTNCCTTNCNGGGACAAATTNANNNGGNGN
NGCNGNGTTTGTNTTTCACCTNCTTTGTNCNTNNNAAGTTTGGGGTTAANNNTCCCTA
ACGNGCGNNAACCCCTTNTNTTATGTTNCCCNCTTANAGNTTGGGGANCNTNTCCCA
NANNTGCCNCTNAANAANTTCNGAGAGNAANGGGGGNTAAANTTCNAATNATTTTCCC
CTTTTANCCGGGNTTAAACCNTTNTANTTGGNGAGNNCANNNTTTTNNAATTTNAGGG
TTTANNTATCNTTAAACCTCTTTTGTNGNANNTNNGCGGCCCTCCCCNGAGAG
```

1) [gi|5578769|emb|Y18275.1|ECOL18275](#) *Enterococcus columbae* (strain NCIMB 13013T) 16S rRNA gene

Length = 1443

Score = 1475 bits (744), Expect = 0.0

Identities = 860/883 (97%), Gaps = 17/883 (1%)

Strand = Plus / Plus

2) [gi|4234620|gb|AF061006.1|AF061006](#) *Enterococcus columbae* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1480

Score = 1473 bits (743), Expect = 0.0

Identities = 860/883 (97%), Gaps = 17/883 (1%)

Strand = Plus / Plus

3) [gi|11342554|emb|AJ301828.1|ECO301828](#) *Enterococcus columbae* 16S rRNA gene, strain LMG 11740

Length = 1818

Score = 1441 bits (727), Expect = 0.0

Identities = 857/883 (97%), Gaps = 18/883 (2%)

Strand = Plus / Plus

4) [gi|34304720|gb|AY365054.1](#) *Enterococcus cecorum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1462

Score = 1275 bits (643), Expect = 0.0

Identities = 835/883 (94%), Gaps = 17/883 (1%)

Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|40840|emb|X56422.1|EC16SRNAG](#) *E. columbae* 16S rRNA gene  
Length = 1493
- Score = 1245 bits (628), Expect = 0.0  
Identities = 824/883 (93%), Gaps = 17/883 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|2828132|gb|AF039899.1|AF039899](#) *Enterococcus casseliflavus* isolate 32 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1508
- Score = 1205 bits (608), Expect = 0.0  
Identities = 829/884 (93%), Gaps = 19/884 (2%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|2828136|gb|AF039903.1|AF039903](#) *Enterococcus casseliflavus* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1509
- Score = 1197 bits (604), Expect = 0.0  
Identities = 828/884 (93%), Gaps = 19/884 (2%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|2828133|gb|AF039900.1|AF039900](#) *Enterococcus gallinarum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1506
- Score = 1197 bits (604), Expect = 0.0  
Identities = 828/884 (93%), Gaps = 19/884 (2%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|7230382|gb|AF135452.1|AF135452](#) *Eubacterium* sp. 1275b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1513
- Score = 1197 bits (604), Expect = 0.0  
Identities = 828/884 (93%), Gaps = 19/884 (2%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|58013012|gb|AY863424.1|](#) *Enterococcus* sp. 020824/02-A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1438
- Score = 1197 bits (604), Expect = 0.0  
Identities = 828/884 (93%), Gaps = 19/884 (2%)  
Strand = Plus / Plus

## 16. RP 79 (20-970)

>rp79 sequence exported from rp79\_SB73\_008.ab1

```
AAANGCCGCGNCTTANACATGCAAGTCGAACGGGATCCCAGGAGCTTGCTCCTGGGTGAG
AGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCTGG
AAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCAGTTGGATGCATGTCTTCTGGGAAAGATTCTAC
CGTATTGGAAGGGGTCCCCTCCCAACCACTGAATGCCGGGTAACCGCCCCCTGGCCT
CCAACGGTAACCCGGCCGAAAAGGCCAACCGGCCCTTTGGAACGAAAAACCGCCCCAAA
CCCCACCGGAAGGCACCATGGGGAAAAATGCCCATGGGCCCAACCCTAATCCACCACC
CCCCCTGCCGGAATACACGCCCTCCGGTTGGAAACCCCTTTTACATGGGAACCAACCC
TCCGGTGAATTGACCCTTCCAAAAACCCCGCTAACTACCTTCCCACCACCCCGTAA
TACCTAAGGGGCCAACCTTATCCCGAATTTATGGGCCTAAAAGGCTCCTAAGCCGGTCT
CCCCTCCCGGTTAAAATCCCTCCCTAACCGTGGAACCCCCCCGGTACCGGCCGGCTT
TAATTCGGTAAGGGAAAACGGAATTTCCCGGTAACCGTTGAATGGTTAAAATTCCGGAA
AAAACCCCATGGCCAAAGGAAGGTCTCTGGGCCTCCCCTACCCCTAAGAACCAAAACCTT
GGGAACCGAAAAAGAATAAAAAACCTGGGTAATTCCCCCCTTAAACCGGTGAATCCT
TGAATTTTGGGGAACAATTTCCACGGTCTTCCTTTCCGGAACCCAACCCTTAAACCATCC
CCCCCTGGGGGAATACCGGGCCCCAAGGGCTAAAACCCCAAAAAAATTTAACGGGG
GGCCCCCCAAACCGGGGGAAAACATGGGAATTAATTTCAATTCCAACCCCAAAAAAAA
CCTTAACCTGGGCNTNNAANNTTTTTCCCCANAANCCCCNTAAAAAAAANCGGNNCNC
CTTNNNGGGGGGGGTTTNCNAAAGNGGGGGCNANGGNNCCCCCNCNCCNNTNTT
NTNNAAAAAATTTTNGGGTAAANTTCCCNAAAANNGGNCNACCCNCTCCCCCTTT
TTTTCNNNCCACCCNTNTTNGGGGGGAAAAANCCNNNGGGGAAAACCCCNNGNNNNN
NCNCCNAAANAAAANGGGGGGAAAAANNNAAAAANANTNNNNCCCCCTTTNNNNN
N
GGGGTNTNNNCNNNTNAAAAANGNNNGNNAAAAANNGGNTNTCNCCCCCCCCCGG
GGGGGGGGGANNCCCCTNAANN
```

1) [gi|22212500|dbj|AB064925.1](#) *Bifidobacterium* sp. CB8 gene for 16S rRNA, partial sequence  
Length = 506

Score = 323 bits (163), Expect = 7e-85  
Identities = 163/163 (100%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|42493348|gb|AY457812.1](#) Uncultured bacterium clone 7-22D77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 492

Score = 323 bits (163), Expect = 7e-85  
Identities = 163/163 (100%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|42493318|gb|AY457782.1](#) Uncultured bacterium clone 7-22D42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 488

Score = 323 bits (163), Expect = 7e-85  
Identities = 163/163 (100%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|42493314|gb|AY457778.1](#) Uncultured bacterium clone 7-22D38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 489

Score = 323 bits (163), Expect = 7e-85  
Identities = 163/163 (100%)  
Strand = Plus / Plus



- 5) [gi|42493295|gb|AY457759.1](#) Uncultured bacterium clone 7-22D18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 493
- Score = 323 bits (163), Expect = 7e-85  
Identities = 163/163 (100%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|13160578|gb|AF275885.1](#) Uncultured *Bifidobacterium sp.* 15A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1363
- Score = 319 bits (161), Expect = 1e-83  
Identities = 161/161 (100%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|13160575|gb|AF275882.1|AF275882](#) *Bifidobacterium adolescentis* clone nru-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1448
- Score = 319 bits (161), Expect = 1e-83  
Identities = 161/161 (100%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|34558691|gb|AY305304.1](#) *Bifidobacterium adolescentis* isolate L2-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1448
- Score = 319 bits (161), Expect = 1e-83  
Identities = 161/161 (100%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|42493302|gb|AY457766.1](#) Uncultured bacterium clone 7-22D26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 487
- Score = 315 bits (159), Expect = 2e-82  
Identities = 162/163 (99%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|13160576|gb|AF275883.1](#) Uncultured *Bifidobacterium sp.* 15B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1357
- Score = 311 bits (157), Expect = 3e-81  
Identities = 157/157 (100%)  
Strand = Plus / Plus

## 17. RP 82 (20-1050)

>rp82 sequence exported from rp82\_SB73\_023.ab1

```
AATGCGNGNCCTATCATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTAC
CGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGGG
GATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGA
TGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAAGTACTGTTGGTGGG
GTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAAGTCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC
GCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGT
TGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTATCTAACAGCAA
GTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
TTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCT
TAACCGGAGTAGTGCATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGCTCTC
TGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAACCGATGAATGCTAGGTGTTGGAAGGGTTCCGCCCTTCAGTGGC
CGACTAACGCAATAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCCGAA
AACCTTACCAGGTCTTGGACATCCCTTTGACCACCTAAGAAAATTAAGGCTTTCCCTTC
GGGACAAAGTGACAGGGGGGGCCATGGGCTNTCNCANCTCNNGTCCTGANATNTTGGG
GTTNAANTCCCCCACCAGCCCCACCCCTTGTGTCANNTNCCACCATTAAANTTTGGC
NCCCTNGCAAACCTCCCGGGANAAANCCGGAGGAAGGGGGGGACCAACTTCAANTCTNCN
TNCCCNTTNTACCNNGGGCTCCNCNNNCCTCAATGGGAGGNANAANANTNCCNNAACCC
CGNGGTTTNNCTNNTCTTTAAACCCTTTTCNNTTTGAATTTNGGCNCCNCNCCCCCANAN
NANNNGAANCCCTTNANTCCNAAACCCTTTTCGGGGNAAAATTCGGGGTTTTCN
```

1) [gi|22213633|gb|AY137589.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1230 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 997/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|22213632|gb|AY137588.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1047 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 997/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|22213631|gb|AY137587.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1046 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1489

Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 997/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|22213630|gb|AY137586.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1045 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 997/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|22213629|gb|AY137585.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519
- Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 997/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|22213628|gb|AY137584.1|](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* strain JCM 1042 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1519
- Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 997/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|15987824|gb|AF420311.1|AF420311](#) *Lactobacillus salivarius* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1515
- Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 997/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|6625772|gb|AF201900.1|AF201900](#) Chicken intestinal bacterium MRS 4.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1484
- Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 997/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|12963449|gb|AF335475.1|AF335475](#) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1517
- Score = 1873 bits (945), Expect = 0.0  
Identities = 997/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|37654436|gb|AY389803.1|](#) *Lactobacillus salivarius* strain RA2115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1523
- Score = 1865 bits (941), Expect = 0.0  
Identities = 996/1016 (98%), Gaps = 7/1016 (0%)  
Strand = Plus / Plus

## 18. RP 92 (20-1030)

>rp92 sequence exported from rp92\_SB73\_039.ab1

```
ACTGCGNGNCCTATCATGCAAGTAGAACGCTGAAGACTTTAGCTTGCTAAAGTTGGAAGA
GTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTACTAGCGGGGGATAACTATTGGA
AACGATAGCTAATACCGCATAACAGCATTTAACCCATGTTAGATGCTTGAAAGGAGCAAT
TGCTTCACTAGTAGATGGACCTGCGTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGA
GCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAAC
GTGTGTGAGAGTGGAAAGTTACACAGTGACGGTAACTTACCAGAAAGGGACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTCCTCGAGCGTGTCCGGATTTATTGGGCGTA
AAGCGAGCGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAAACCATTGTTCCG
CTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGCTGTAACTGA
CGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAGGGTGTAGGCCCTTTCGGGGCTTAGTGCCGCAGCTAAACGCA
TTAAGGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGCAAGGTTTGAAGCAAGGAAATTGACGG
GGCCCGCACAAAGCGGTTGGAGCATGTGGGTTAATTTGAAAGCACCAGGAAAGAAACCTT
TACCAGTCCCTTGACATCCCCGATGCTATTCCTAAAAGAAAGGAAAGTTTCTTCGGAAACA
TCGTTGACAGGGTGGTGCATGGTTGTCCTCNGCNCNNGTCGTGANATGTTGGGTTAATTC
CCNCNACCNAGCCNCAACCCCCTATTGTTANTTGNCCNTAATTAAGGGGCCNCNNAN
NNANAACCTGCCNGGTAANAANCCGNAGGNANGGGGGNNGAACNTCAAAANCTCANGN
C
CCNTTAGNNCTGGGGCTCANNNGNNNNNTAANNNGTNNGTAAANACAATNCCCNTTCTTT
AAGGCNACCAATNCTTAANNCCAANNCTTNGGAAGGNGGNCCNCCCCNNTTAAAT
NGAAACCNTTATTCNCGNAACCCNCCGGTAAAATTTCCGGGCTNTTAACCCCNNTCACC
```

1) [gi|16798424|gb|AF429763.1](#) *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1473

Score = 1786 bits (901), Expect = 0.0  
Identities = 1041/1068 (97%), Gaps = 16/1068 (1%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|11095286|gb|AF298199.1|AF298199](#) *Streptococcus* sp. LRC 0476 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1480

Score = 1782 bits (899), Expect = 0.0  
Identities = 1039/1066 (97%), Gaps = 16/1066 (1%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|38374179|gb|AY442813.1](#) *Streptococcus bovis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1498

Score = 1778 bits (897), Expect = 0.0  
Identities = 1040/1068 (97%), Gaps = 16/1068 (1%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|33638254|gb|AY347306.1](#) *Streptococcus bovis* strain Sb R1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1470

Score = 1778 bits (897), Expect = 0.0  
Identities = 1040/1068 (97%), Gaps = 16/1068 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|15011526|gb|AF396921.1](#) *Streptococcus bovis* strain C14b1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1539
- Score = 1778 bits (897), Expect = 0.0  
Identities = 1040/1068 (97%), Gaps = 16/1068 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|6573183|gb|AF202263.1|AF202263](#) *Streptococcus bovis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1540
- Score = 1778 bits (897), Expect = 0.0  
Identities = 1040/1068 (97%), Gaps = 16/1068 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|4324443|gb|AF104109.1|AF104109](#) *Streptococcus bovis* strain JBI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1541
- Score = 1778 bits (897), Expect = 0.0  
Identities = 1040/1068 (97%), Gaps = 16/1068 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|7230383|gb|AF135453.1|AF135453](#) *Streptococcus bovis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1462
- Score = 1778 bits (897), Expect = 0.0  
Identities = 1040/1068 (97%), Gaps = 16/1068 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|40737885|gb|AY500370.1](#) *Streptococcus bovis* isolate Sb5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1470
- Score = 1778 bits (897), Expect = 0.0  
Identities = 1040/1068 (97%), Gaps = 16/1068 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|1944074|dbj|AB002481.1](#) *Streptococcus bovis* DNA for 16S rRNA, strain ATCC 27960  
Length = 1500
- Score = 1778 bits (897), Expect = 0.0  
Identities = 1040/1068 (97%), Gaps = 16/1068 (1%)  
Strand = Plus / Plus

## 19. SRA 15 (20-950)

>sra15 sequence exported from sra15\_SB73\_059.ab1

```
GNTANGCGNGCNCTAAACATNCAAGTTCGAACGGGATCCATCAGGCTTTGCTTGTTGGTGGT
AGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCT
GGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCGACTCCTCGCATGGGGTGTCCGGAAAGATTTT
ATCGGTATGGGATGGGGTCCGCTCCTATCAGGTAGTCGGCGGGGTAACGGCCCCACCGAGC
CTACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCG
ACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCGCTTTTGATCGGGAGCAAGCCT
TCGGGTGAGTGTACCTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGGCGTTTCGTC
GCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGG
AGTGCCGTTAGGGGAGACTGGAATCCCGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAG
AACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTTGAGGAGCTAAAGGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTTATATACCCTGGGTAGTCCACGCCTGTAAACGGTGGATGCTGG
AATGGTGGGGGCCCGTTTCCAACGGGGTTCGGTGGTCCGAGCTAACCGCGTTTAAAGCAT
CCCCCGCTGGGGGATTACGGGGCCCGCAAGGGCTTAAACTTCAAAATAAATTGGACGGG
GGCCCGCAACACAAGCGGCGGGAGCAATGCCGGAATATAATTCCAATTCAAACCCNAAA
AACCTTTANCTNGGGCTTTAACATGTTNCCNAAAANNCCTTAAAAAAAATGGCCCCNCCN
TTCNGGGGGNGGGTTTNCNAGGNTNNGNGCAATGGCCAACCNNNCCNCTNTCCNTGAAA
AATTTTNNGGTTAANTCCCGTNAANGAANGCCANTCACNTTCCCTTGTTCCTAGACT
CNTNTTTTNGGGAANTNAANGGGGNCCTCCCGGNNTTNNNTTNNANAGAGGGTGGG
GAAAGAANCNNAACAATNTTACCCCTTAATNCCCAGGGCNTTNNNNCCANTCTTAATN
GGCCNANTNNACGNTNTATNGGNCNNNNCNCTCNAAGTCNNANNTNCTAAACCN
CCTNNGTCNCAGTTNGANNCTTNGCCTAATCNCNATATANGGGANNTCCNGTGTTCCT
ANTGATAATNCNCCCCGNCNTGNAAAATTTCTNCNGANCGCTTANAAC
```

1) [gi|4730862|dbj|D86187.1](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DNA for 16S ribosomal RNA,  
partial sequence  
Length = 1519

Score = 1402 bits (707), Expect = 0.0  
Identities = 748/755 (99%), Gaps = 5/755 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|4730862|dbj|D86187.1](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DNA for 16S ribosomal RNA,  
partial sequence  
Length = 1519

Score = 1402 bits (707), Expect = 0.0  
Identities = 748/755 (99%), Gaps = 5/755 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|14388778|gb|AF253367.1](#) Uncultured bacterium (human infant) S7A 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1406

Score = 1356 bits (684), Expect = 0.0  
Identities = 743/756 (98%), Gaps = 7/756 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|16612136|gb|AF432082.1](#) *Bifidobacterium catenulatum* 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1445

Score = 1344 bits (678), Expect = 0.0  
Identities = 719/726 (99%), Gaps = 5/726 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|57231888|gb|AY856700.1](#) *Bifidobacterium sp.* h12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1450
- Score = 1328 bits (670), Expect = 0.0  
Identities = 717/726 (98%), Gaps = 5/726 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|24850405|gb|AY166523.1](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* strain Z2-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 679
- Score = 1314 bits (663), Expect = 0.0  
Identities = 663/663 (100%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|24850403|gb|AY166521.1](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* strain T1-3-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 697
- Score = 1314 bits (663), Expect = 0.0  
Identities = 675/678 (99%), Gaps = 1/678 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|14388777|gb|AF253366.1](#) Uncultured bacterium (human infant) S7B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1402
- Score = 1283 bits (647), Expect = 0.0  
Identities = 723/755 (95%), Gaps = 5/755 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|55709752|gb|AY766407.1](#) Bacterium Ba33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 671
- Score = 1277 bits (644), Expect = 0.0  
Identities = 663/667 (99%), Gaps = 2/667 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|13160586|gb|AF275893.1](#) Uncultured *Bifidobacterium sp.* 9B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1360
- Score = 1277 bits (644), Expect = 0.0  
Identities = 713/727 (98%), Gaps = 7/727 (0%)  
Strand = Plus / Plus

## 20. SRA 22 (20-1000)

>sra22 sequence exported from sra22\_SB73\_060.ab1

```
AATGCGGNCTTACACATGCAAGTGAACGGGATCCATCAAGCTTGCTTGGTGGTGAGAG
TGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCTGGAA
ACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGGAAAGCTTTCGCGG
TATGGGATGGGGTTCGCGTCCATCAGCTTGACGGCGGGGTAACGGCCCCACCGTGGCTTCG
ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCC
GCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTATCGGGGAGCAAGCGAGAGTG
AGTTTACCCGTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCGCGTCCG
GTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGCGG
TAGGGGAGACTGGAATCCCGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCA
ATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGATGCTGGATGTGGGGGCC
CGTTCCACGGGTTCCGTGTGCGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTAAAACTCAAAGAAAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAAGCATGCC
GAATTAATTCCGAATGCAACGCGGAAAAACCTTACCTGGGCCTTGACATGTTCCCAACG
GTCGTAAAAAAAACCGGCTTCCCTTTCGGGGCGGGTCCCAAGGGTGGTGGCAAGGTTTC
CTCCGTCCACCTCGTGGTCNTNAAAAGTTTNGGTTNAANTCCCNCAACNNAGCGCCAAC
CCTTCNCCCCGTTNTTGCANCGGAATTTNGCCGGGAAACTCACNGGGGAACCCCCCGG
NTTAANNCCGNAGAAAGGGTGGGNAAAANNTTCAAATAANNTTCCCCCTAAGTCCNNGG
GNTTNCCTGNTAAAANGGNCGGTNAACGGGNNTNCACNNNNCAACCCGGAAGGAAT
CCTTAAAACCGGTTNNTTTTAAAACAATTNTCNATTCAANNNGNNNAGNNGANNCNTTNA
NCCCAANAANCAATCCNGTAAAAGGTTCCGGGCNNTTNAACCCCCCNTANTTNAAAAGG
GGAACCCNAANGGGGCCACCCCTTTGNNG
```

1) [gi|53766368|gb|AY675246.1](#) *Bifidobacterium longum* strain BG 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1517

Score = 1703 bits (859), Expect = 0.0  
Identities = 930/942 (98%), Gaps = 10/942 (1%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|52854423|gb|AY736853.1](#) *Bifidobacterium longum* bv. *Infantis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1480

Score = 1687 bits (851), Expect = 0.0  
Identities = 928/942 (98%), Gaps = 10/942 (1%)  
Strand = Plus / Plus


3) [gi|14388776|gb|AF253365.1](#) Uncultured bacterium (human infant) S6C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1402

Score = 1685 bits (850), Expect = 0.0  
Identities = 925/943 (98%), Gaps = 8/943 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|55442173|gb|AY735403.1](#) *Bifidobacterium longum* strain BG3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1481

Score = 1681 bits (848), Expect = 0.0  
Identities = 929/943 (98%), Gaps = 11/943 (1%)  
Strand = Plus / Plus



- 5) [gi|58012118|gb|AE014295.3](#)  *Bifidobacterium longum* NCC2705, complete genome  
Length = 2256640
- Score = 1681 bits (848), Expect = 0.0  
Identities = 929/943 (98%), Gaps = 11/943 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|25247101|gb|AY151399.1](#) *Bifidobacterium longum* strain KB 6 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1400
- Score = 1667 bits (841), Expect = 0.0  
Identities = 929/944 (98%), Gaps = 12/944 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|57117785|gb|AY850359.1](#) *Bifidobacterium longum* strain SB11 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1518
- Score = 1661 bits (838), Expect = 0.0  
Identities = 925/941 (98%), Gaps = 11/941 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|12958603|gb|AF321297.1](#) *Bifidobacterium sp.* group III-3 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1475
- Score = 1657 bits (836), Expect = 0.0  
Identities = 926/943 (98%), Gaps = 11/943 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|4730859|dbj|D86184.1](#) *Bifidobacterium infantis* DNA for 16S ribosomal RNA, partial  
sequence  
Length = 1515
- Score = 1657 bits (836), Expect = 0.0  
Identities = 926/943 (98%), Gaps = 11/943 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|51558053|gb|AY699578.1](#) *Bifidobacterium longum* bv. *Infantis* strain BT1 16S ribosomal RNA  
gene, partial sequence  
Length = 1390
- Score = 1651 bits (833), Expect = 0.0  
Identities = 927/944 (98%), Gaps = 12/944 (1%)  
Strand = Plus / Plus

## 21. RPXXX53 (20-1050)

>53 sequence exported from 53\_CZ542\_067.ab1

```
NGGAAAAGNNGGNCTTAAATGCNAGTCGAACGGGATCGGCTGGAGCTTGCTCCGGCCGTG
AGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCT
GGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCAGTTGGATGCATGTCTTCTGGGAAAGATTCT
ATCGGTATGGGATGGGGTCGCGTCTATCAGCTTGATGGCGGGGTAAACGGCCCACCATGG
CTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCG
ACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCGCTTTTACTGGGAGCAAGCCC
TTCGGGTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCC
TCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTAACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCT
TGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCGCGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGA
AGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGATAAACGGTGGATGCTGGAT
GTGGGGACCAATCCACGGTCTCCGTGTCGGAGCCAACGCGTTAAACCATCCCCGCTGGGG
AAGTACCGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGCGGA
ACCATCGGATTTAATTCGATGCAACGCCGAAAAACCTTACCTGGGGCTTGACATGTTCC
CCAACAGCCATAAAAAACGGTTTTCCCTTTTCGGGGGCGGGTTCCACAGGGGGGTGCAT
GGTCTCCTCCACCTCGTGTGAGAAAAATTTGGGGTTAAANTCCCNAAAAGNNGCNAA
CCCTTCCCCCTNTTTTTCCNCCCCCTTNTGGGNGGGAAACTCCCGGGGAACCCNCGG
GGTCCACCTNCGNAAAAGGGGGGGANAAANNTAAANNNTTNGCCCCNTTNACTNCGGG
NTTTCNNCCATCCNAAAANGGGGGAAAANGGGGTGNCCCCNTTGGGGGGGNGGGNAT
CCNTTAAACNGTTCTNNTTTGAATGGGNNTNCCCCCCCCCNCNTANGGGGNTTCTTT
N
```

1) [gi|13160574|gb|AF275881.1|AF275881](#) *Bifidobacterium adolescentis* clone nru-1 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1451

Score = 1695 bits (855), Expect = 0.0  
Identities = 928/942 (98%), Gaps = 8/942 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|13160575|gb|AF275882.1|AF275882](#) *Bifidobacterium adolescentis* clone nru-5 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1448

Score = 1624 bits (819), Expect = 0.0  
Identities = 922/942 (97%), Gaps = 11/942 (1%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|34558691|gb|AY305304.1](#) *Bifidobacterium adolescentis* isolate L2-32 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1448

Score = 1624 bits (819), Expect = 0.0  
Identities = 922/942 (97%), Gaps = 11/942 (1%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|13160578|gb|AF275885.1](#) Uncultured *Bifidobacterium* sp. 15A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1363

Score = 1592 bits (803), Expect = 0.0  
Identities = 917/943 (97%), Gaps = 10/943 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|13160584|gb|AF275891.1|](#) Uncultured *Bifidobacterium* sp. 7G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1365
- Score = 1562 bits (788), Expect = 0.0  
Identities = 917/945 (97%), Gaps = 13/945 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|4730874|dbj|D86197.1|](#) *Bifidobacterium ruminantium* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1437
- Score = 1556 bits (785), Expect = 0.0  
Identities = 882/904 (97%), Gaps = 8/904 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|173865|gb|M58729.1|BIFRR16SA](#) *Bifidobacterium adolescentis* 16S ribosomal RNA  
Length = 1477
- Score = 1552 bits (783), Expect = 0.0  
Identities = 906/942 (96%), Gaps = 9/942 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|10732830|gb|AF306789.1|AF306789](#) *Bifidobacterium* sp. PL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1491
- Score = 1544 bits (779), Expect = 0.0  
Identities = 912/942 (96%), Gaps = 11/942 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|13160576|gb|AF275883.1|](#) Uncultured *Bifidobacterium* sp. 15B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1357
- Score = 1536 bits (775), Expect = 0.0  
Identities = 912/942 (96%), Gaps = 13/942 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|13160582|gb|AF275889.1|](#) Uncultured *Bifidobacterium* sp. 16F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1362
- Score = 1526 bits (770), Expect = 0.0  
Identities = 871/896 (97%), Gaps = 9/896 (1%)  
Strand = Plus / Plus

## 22.XXX60 (20-1050)

>60 sequence exported from 60\_CZ542\_068.ab1

```
AATGCCGNGNCTTAACATGCAAGTTCGAACGGGATCGGCTGGAGCTTGCTCCGGCCGTGA
GAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCGTACACCGGAATAGCTCCTG
GAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCAGTCCATCGCATGGTGGTCTGGGAAAGATTTTA
TCGGTATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGGTAGTCGGCGGGGTAACGGCCACCGAGCC
TACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGA
CGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCGCTTTTGTGGGGAGCAAGCCTT
CGGGTGAGTGTACCCTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
CGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTCGTCC
CGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGA
GTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCGGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGA
ACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGATGCTGGATGTGG
GGCCATTCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGACATGCGG
ATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACAGCCCCAA
AGATGGGGCCTCCCTTCGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTCGTTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTCGCCCCNTGTTTCCNCC
AATGATGGTGGGAANCTCCCGGGGAACCCCGGGTTANCTNNGAAGAANGGGGGGAAAA
ANTNAAANTATNTTNCCTTNTTCCNNGGTTTNNCCNNGNTAAAATGNCNGGTAAANG
GNTNNANTGGCNANTNNAGGANNCNTNAAAACNGTTTTNTTNNATNGGANTTNNCCNC
CCNCCNNAANGGNTCCCTTATTCCAANA
```

1) [gi|4730857|dbj|D86182.1](#) *Bifidobacterium angulatum* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1520

Score = 1996 bits (1007), Expect = 0.0  
Identities = 1024/1027 (99%), Gaps = 2/1027 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|57231888|gb|AY856700.1](#) *Bifidobacterium* sp. h12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1450

Score = 1770 bits (893), Expect = 0.0  
Identities = 977/997 (97%), Gaps = 6/997 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|4730862|dbj|D86187.1](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1519

Score = 1770 bits (893), Expect = 0.0  
Identities = 977/997 (97%), Gaps = 6/997 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|4730867|dbj|D86192.1](#) *Bifidobacterium merycicum* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1435

Score = 1768 bits (892), Expect = 0.0  
Identities = 971/995 (97%), Gaps = 2/995 (0%)  
Strand = Plus / Plus

5) [gi|16612136|gb|AF432082.1](#) *Bifidobacterium catenulatum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1445

Score = 1762 bits (889), Expect = 0.0  
Identities = 976/997 (97%), Gaps = 6/997 (0%)  
Strand = Plus / Plus

6) [gi|14388778|gb|AF253367.1](#) Uncultured bacterium (human infant) S7A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1406

Score = 1717 bits (866), Expect = 0.0  
Identities = 970/998 (97%), Gaps = 8/998 (0%)  
Strand = Plus / Plus

7) [gi|4730874|dbj|D86197.1](#) *Bifidobacterium ruminantium* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence

Length = 1437

Score = 1717 bits (866), Expect = 0.0  
Identities = 968/997 (97%), Gaps = 4/997 (0%)  
Strand = Plus / Plus

8) [gi|13160574|gb|AF275881.1|AF275881](#) *Bifidobacterium adolescentis* clone nru-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1451

Score = 1699 bits (857), Expect = 0.0  
Identities = 991/1029 (96%), Gaps = 5/1029 (0%)  
Strand = Plus / Plus

9) [gi|14388783|gb|AF253372.1](#) Uncultured bacterium (human infant) L14B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1403

Score = 1683 bits (849), Expect = 0.0  
Identities = 969/999 (96%), Gaps = 9/999 (0%)  
Strand = Plus / Minus

10) [gi|13160586|gb|AF275893.1](#) Uncultured *Bifidobacterium* sp. 9B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1360

Score = 1673 bits (844), Expect = 0.0  
Identities = 968/999 (96%), Gaps = 9/999 (0%)  
Strand = Plus / Plus

### 23. XXX 61 (20-1050)

>61 sequence exported from 61\_CZ542\_083.ab1

```
GAAAAGGGGCNCTNGCATNCGANTCGAACGGGATCCATCAAGCTTGCTTGGTGGTGAGAG
TGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATGCTCCGGAATAGCTCCTGGAA
ACGGGTGGTAATGCCGGATGTTCCACATGATCGCATGTGATTGTGGGAAAGATTCTATCG
GCGTGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTTC
GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACCG
CGCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTGTGGGAGCAAGCCTTCGG
GTGAGTGTACCTTTTGAATAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGGCGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGGCGGCTCGTCGCGT
CCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGAGTG
CGGTAGGGGAGACTGGAATCCCGGTGTAACGGTGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACA
CCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGCTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGACGCTGGATGTGGGGC
ACGTTCACGTGTTCCGTGTCCGAGCTAACGCGTTAAGCGTCCCGCCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGCTAAAACCTCAAAAAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGCCGAT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACGACCCAAGAA
GATGGCGTTCCCTTCGGGGCGGGTCCACAGGTGGTGCATGGTCTCCTCAGCCTCGT
GTCGTGAAAATTTTGGGTTAANTCCCGCAACNANNCAACCCTNCCCCCNTGTTGCCCN
NCNCNTTNTTGGGGGGAACNCCNGGGGAACCCCGGGTTANCNCNGAAGAANGGGGGGAA
TNANTNNAATAATNTTCCCCCTNANTTCCAGGGNTTCCCCNTGCTAAAAAGGCCNNG
TANCCGGGNTGCNAANTGNANNANATTGANNNGNAACCNTTAAAACCNNTTTTNTTTNGA
ATNNAANCNTCCNCCCNCCCCNTNAAGGGGATNCCNTTAAANCNGNAANAAAAACCCCN
GN
```

1) [gi|808106|gb|U25952.1|BBU25952](#) *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3202 16S rRNA gene  
Length = 1488

Score = 1869 bits (943), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1027 (98%), Gaps = 5/1027 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|808105|gb|U25951.1|BBU25951](#) *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3202 16S rRNA gene  
Length = 1488

Score = 1869 bits (943), Expect = 0.0  
Identities = 1008/1027 (98%), Gaps = 5/1027 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|244838|gb|S83624.1|S83624](#) 16S rRNA [*Bifidobacterium bifidum*, DSM 20456T, Genomic, 1532 nt]  
Length = 1532

Score = 1826 bits (921), Expect = 0.0  
Identities = 1006/1029 (97%), Gaps = 7/1029 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|173880|gb|M38018.1|BIFRRDQ](#) *B. bifidum* small subunit ribosomal RNA gene  
Length = 1532

Score = 1794 bits (905), Expect = 0.0  
Identities = 996/1027 (96%), Gaps = 5/1027 (0%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|51703256|gb|AY694148.1](#) *Bifidobacterium bifidum* 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1466
- Score = 1790 bits (903), Expect = 0.0  
Identities = 987/1011 (97%), Gaps = 6/1011 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|14388806|gb|AF253395.1](#) Uncultured bacterium (human infant) D39Ebif 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1354
- Score = 1705 bits (860), Expect = 0.0  
Identities = 989/1032 (95%), Gaps = 10/1032 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|4730881|dbj|D89379.1](#) *Bifidobacterium subtile* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1510
- Score = 1509 bits (761), Expect = 0.0  
Identities = 962/1027 (93%), Gaps = 7/1027 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|4730880|dbj|D89378.1](#) *Bifidobacterium subtile* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1513
- Score = 1501 bits (757), Expect = 0.0  
Identities = 940/999 (94%), Gaps = 7/999 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|52854423|gb|AY736853.1](#) *Bifidobacterium longum* bv. *Infantis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1480
- Score = 1499 bits (756), Expect = 0.0  
Identities = 963/1027 (93%), Gaps = 8/1027 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|22002912|emb|AJ307005.1|BSC307005](#) *Bifidobacterium scardovii* partial 16S rRNA gene, strain CCUG 13008  
Length = 1380
- Score = 1499 bits (756), Expect = 0.0  
Identities = 965/1028 (93%), Gaps = 8/1028 (0%)  
Strand = Plus / Plus

## 24. 76 (20-1000)


>76 sequence exported from 76\_CZ542\_084.ab1

```
NGAAAAGGGNCNCTNGCATgCGATCGAACGGGATCCATCAGGCTTTGCTTGGTGGTGAGA
GTGGCAAACGGGTGAGTAATGCGGTGACCGACCTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCTGG
AAACGGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGGAAAGCTTTTCG
CGGTATGGGATGGGGTTCGCGTCCTATCAGCTTGACGGCGGGGTAAACGGCCCACCGTGGCT
TCAACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCAACCGGCCACATTGGGACTGAAATACGGCCCCAAA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCGAC
CCCGCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTATCGGGGAGCAAGCGAGA
GTGAGTTTACCCGTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCCTCGT
CCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGATTG
CGGTAGGGGAGACTGGAATTCGGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAAAACA
CCAATGGCAAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTAAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGC
CCGTTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAATTTGACGGGGGGCCCCCAAGCGCGGAACCACTGCG
GAATTAATTTCGATGCAACCCGAAAAAACCTTACCTGGGGCTTGACATGTTCCCAACCGT
CGTAAAAAATACGGCTTCCCTTTCGGGGGCGGGTTTCAAAGGGTGGNGCATGGGTCCCTC
CNTCANCTCCGTTTCCCTTGNNAAATTTTGGGNTTAAATTCCCCCNAANNANGGGCAANC
CCTTCCCCCNGTNTTGGCCNANCGGAATTNTNCCGGGAAACTCCNCGGGGGGAACCCC
CCGGGGTTNNAACTNGGNANNAAGGNGGGGAANAAANTTNAAAATTTTCCCCCNT
TNAATTCAGGGGNTTNCCTTNTTTAAAAAGGCGNGGGTANAAACGGGAATNCCCAC
CNCCCAN
```

1) [gi|55442173|gb|AY735403.1](#) *Bifidobacterium longum* strain BG3 16S ribosomal RNA gene, complete

sequence  
Length = 1481

Score = 1592 bits (803), Expect = 0.0  
Identities = 905/930 (97%), Gaps = 8/930 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|58012118|gb|AE014295.3](#)  *Bifidobacterium longum* NCC2705, complete genome  
Length = 2256640

Score = 1592 bits (803), Expect = 0.0  
Identities = 905/930 (97%), Gaps = 8/930 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) >[gi|57117785|gb|AY850359.1](#) *Bifidobacterium longum* strain SB11 16S ribosomal RNA gene, partial

sequence  
Length = 1518

Score = 1572 bits (793), Expect = 0.0  
Identities = 901/928 (97%), Gaps = 8/928 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|53766368|gb|AY675246.1](#) *Bifidobacterium longum* strain BG 16S ribosomal RNA gene, complete

sequence  
Length = 1517

Score = 1568 bits (791), Expect = 0.0  
Identities = 903/930 (97%), Gaps = 9/930 (0%)  
Strand = Plus / Plus



- 5) [gi|12958603|gb|AF321297.1](#) *Bifidobacterium* sp. group III-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1475
- Score = 1568 bits (791), Expect = 0.0  
Identities = 902/930 (96%), Gaps = 8/930 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|4730859|dbj|D86184.1](#) *Bifidobacterium infantis* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1515
- Score = 1568 bits (791), Expect = 0.0  
Identities = 902/930 (96%), Gaps = 8/930 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|25247101|gb|AY151399.1](#) *Bifidobacterium longum* strain KB 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1400
- Score = 1554 bits (784), Expect = 0.0  
Identities = 902/931 (96%), Gaps = 9/931 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|52854423|gb|AY736853.1](#) *Bifidobacterium longum* bv. *Infantis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1480
- Score = 1552 bits (783), Expect = 0.0  
Identities = 901/930 (96%), Gaps = 9/930 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|51558053|gb|AY699578.1](#) *Bifidobacterium longum* bv. *Infantis* strain BT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1390
- Score = 1538 bits (776), Expect = 0.0  
Identities = 900/931 (96%), Gaps = 9/931 (0%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|25247072|gb|AY151398.1](#) *Bifidobacterium infantis* strain KB 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1400
- Score = 1538 bits (776), Expect = 0.0  
Identities = 900/931 (96%), Gaps = 9/931 (0%)  
Strand = Plus / Plus

## 25. 83 (20-1080)

>83 sequence exported from 83\_CZ542\_001.ab1

```
NNGATAAANGNCNCACCGAACCCGAATTCGAACGGGTATCCATCAAGCTTGCTTGGTGGT
GAGAGTGGCGAACTGTGGTGAATTAATGCGTGACCGACCTGCCCATACACCGGAATAGC
TCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGGAAAGC
TTTCGCGGTATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGACAGGACTGGGGTAACTGCGCC
CACCGTGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGAT
ACGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTATCGGGGA
GCAAGCGAGAGTGAGTTTACCCGTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTAATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGG
TTCGTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCG
GGCTTGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATCCCGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATC
GGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAACGCCGTAAACGGTGGATGCT
GGATGTGGGGCCCGTTCACGGGGTTCGCTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCCT
GGGGAGTACGGGCCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGGCACAAGC
GGCGGAGCATTGCCGGGATTTAATTTTCGATGGCAACGCCGAAAGAGAAACCTTACCTTG
GGGCTTGAACATGTTCCCGAACGGTCCGTAAGAAAGAATAACCGGCTTTCCCTTTTCGGG
GGCGGGGTTTCCACCAGGGGGGTGGCATGGGCCGCTCCTTCAACCTCCGTGGTTCCGTGG
AAAATTTTTGGGGTTAANTTCCCCGNAANGAGGGNCAANCCCTCNCCCCNGNNGTTNGC
CCGNNGGATTATNCCCGGAAACTNCCCGGGGGGACCCCCCGGGGTTTAAACNCCGAAA
AAAAGGTGGGGNAANAACTTNAAAATATTTNTTTGCCCTTTAAGNTCCAAGGGNNTT
CCCCAATTNTAAAATNGNCCGGGTANAAACCGGAANNCTCAACCCGGGCAACCCCGAA
AAAGGAANNCCCTNNAANCCGGTNNNTANTTTGN
```

1) [gi|53766368|gb|AY675246.1](#) *Bifidobacterium longum* strain BG 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1517


Score = 1548 bits (781), Expect = 0.0  
Identities = 864/881 (98%), Gaps = 13/881 (1%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|52854423|gb|AY736853.1](#) *Bifidobacterium longum* bv. *Infantis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1480

Score = 1532 bits (773), Expect = 0.0  
Identities = 862/881 (97%), Gaps = 13/881 (1%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|55442173|gb|AY735403.1](#) *Bifidobacterium longum* strain BG3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence  
Length = 1481

Score = 1526 bits (770), Expect = 0.0  
Identities = 863/882 (97%), Gaps = 14/882 (1%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|58012118|gb|AE014295.3](#)  *Bifidobacterium longum* NCC2705, complete genome  
Length = 2256640

Score = 1526 bits (770), Expect = 0.0  
Identities = 863/882 (97%), Gaps = 14/882 (1%)  
Strand = Plus / Plus

- 5) [gi|51558053|gb|AY699578.1](#) *Bifidobacterium longum* bv. *Infantis* strain BT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1390
- Score = 1513 bits (763), Expect = 0.0  
Identities = 863/883 (97%), Gaps = 15/883 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 6) [gi|25247101|gb|AY151399.1](#) *Bifidobacterium longum* strain KB 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1400
- Score = 1513 bits (763), Expect = 0.0  
Identities = 863/883 (97%), Gaps = 15/883 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 7) [gi|25247072|gb|AY151398.1](#) *Bifidobacterium infantis* strain KB 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1400
- Score = 1513 bits (763), Expect = 0.0  
Identities = 863/883 (97%), Gaps = 15/883 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 8) [gi|57117785|gb|AY850359.1](#) *Bifidobacterium longum* strain SB11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1518
- Score = 1511 bits (762), Expect = 0.0  
Identities = 861/882 (97%), Gaps = 14/882 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 9) [gi|12958603|gb|AF321297.1](#) *Bifidobacterium* sp. group III-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1475
- Score = 1507 bits (760), Expect = 0.0  
Identities = 842/860 (97%), Gaps = 12/860 (1%)  
Strand = Plus / Plus
- 10) [gi|4730859|dbj|D86184.1](#) *Bifidobacterium infantis* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1515
- Score = 1507 bits (760), Expect = 0.0  
Identities = 842/860 (97%), Gaps = 12/860 (1%)  
Strand = Plus / Plus

## 26. 172 (20-1070)

>172 sequence exported from 172\_CZ542\_017.ab1

```
NGGAATGCGNGNCTTAACATGCAAGTCGAACGGGATCCATCAGGCTTTGCTTGGTGGTGA
GAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCTG
GAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCGACTCCTCGCATGGGGTGTCCGGAAAGATTTCA
TCGGTATGGGATGGGGTTCGCGTCTATCAGGTAGTCGGCGGGGTAACGGCCACCGAGCC
TACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGA
CGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCGCTTTTGATCGGGAGCAAGCCTT
CGGGTGAAGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGGTGAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCG
CGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGA
GTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCGGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGA
ACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGATGCTGGATGTGG
GGCCCGTTCCACGGGTTCCGTGTCCGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCGCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAgCATGCG
GATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACAGCCGT
AGAGATATGGCCTCCCTTCGGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTCGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCCCCTTTGTTGCCANCN
CNTCATGGTGGGNANCTCNCNGGGGACCCCCGGGNTCANTCCCGANANAAGGTGGGGAT
AANNTTCAAATATTATGCCCCNTNACTTCNNGGNTTCCCCAATGCTAAAATGGCCGGTA
AAANNGGGATNCCACCGGCNACNTTGNANGGAATCCNTAAANCGGTTTTTTTTTTT
```

1) [gi|4730862|dbj|D86187.1](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1519

Score = 2040 bits (1029), Expect = 0.0  
Identities = 1043/1045 (99%), Gaps = 2/1045 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|14388778|gb|AF253367.1](#) Uncultured bacterium (human infant) S7A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1406

Score = 1972 bits (995), Expect = 0.0  
Identities = 1036/1047 (98%), Gaps = 5/1047 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|16612136|gb|AF432082.1](#) *Bifidobacterium catenulatum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1445

Score = 1955 bits (986), Expect = 0.0  
Identities = 1006/1010 (99%), Gaps = 2/1010 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|57231888|gb|AY856700.1](#) *Bifidobacterium* sp. h12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1450

Score = 1947 bits (982), Expect = 0.0  
Identities = 1005/1010 (99%), Gaps = 2/1010 (0%)  
Strand = Plus / Plus

5) [gi|14388783|gb|AF253372.1](#) Uncultured bacterium (human infant) L14B 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1403

Score = 1921 bits (969), Expect = 0.0  
Identities = 1031/1047 (98%), Gaps = 5/1047 (0%)  
Strand = Plus / Minus

6) [gi|14388777|gb|AF253366.1](#) Uncultured bacterium (human infant) S7B 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
Length = 1402

Score = 1863 bits (940), Expect = 0.0  
Identities = 1014/1048 (96%), Gaps = 6/1048 (0%)  
Strand = Plus / Plus

7) [gi|13160586|gb|AF275893.1](#) Uncultured *Bifidobacterium* sp. 9B 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence  
Length = 1360

Score = 1848 bits (932), Expect = 0.0  
Identities = 995/1011 (98%), Gaps = 5/1011 (0%)  
Strand = Plus / Plus

8) [gi|12247890|gb|AF333390.1|AF333390](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* 16S ribosomal RNA  
gene, partial  
sequence  
Length = 1357

Score = 1826 bits (921), Expect = 0.0  
Identities = 1016/1045 (97%), Gaps = 2/1045 (0%)  
Strand = Plus / Plus

9) [gi|4730857|dbj|D86182.1](#) *Bifidobacterium angulatum* DNA for 16S ribosomal RNA, partial  
sequence  
Length = 1520

Score = 1804 bits (910), Expect = 0.0  
Identities = 991/1010 (98%), Gaps = 6/1010 (0%)  
Strand = Plus / Plus

10) [gi|14388784|gb|AF253373.1](#) Uncultured bacterium (human infant) L157C 16S ribosomal RNA  
gene,  
partial sequence  
Length = 1418

Score = 1784 bits (900), Expect = 0.0  
Identities = 1015/1054 (96%), Gaps = 12/1054 (1%)  
Strand = Plus / Plus

## 27. XXX 175 (20-1060)

>175 sequence exported from 175\_CZ542\_018.ab1

```
NGGAATGCGGNCTTAACATGCAAGTCGAACGGGATCCATCAGGCTTTGCTTGGTGGTGGAG
AGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCTGG
AAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCGACTCCTCGCATGGGGTGTCCGGAAAGATTTTCAT
CGGTATGGGATGGGGTCCGCTCCTATCAGGTAGTCGGCGGGGTAAACGGCCCACCGAGCCT
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGAC
GCCGCGTCCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCCGCTTTTGATCGGGAGCAAGCCTTC
GGGTGAGTGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGTGAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGGCGTTTCGTCGC
GTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGAG
TGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCGGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAA
CACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGATGCTGGATGTGGG
GCCCGTTCACGGGTTCGGTGTCCGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCCCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCCG
ATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACAGCCGTAG
AGATATGGCCTCCCTTCGGGCGGGTTCACAGTGGTGCATGGTCTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAATAATGTTGGGTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTNNNNNTNCCAGCACGT
CATGGTGGGANCTCACGGGGNACCCCGGGTCAACTCGGAAGAANGNNGGGGATNANTTCA
AATAATCATGCCCCNTTACNTCNAGGGNTTNNCNCATGCTANAATGGCCGGTAAANNGGG
TTCCNACCCGCCACNTGGAANGGANNCTTAAACGGTTCNATTTNGGAANGGAGTTCCC
NCCCCCCTTTAAAGGGN
```

1) [gi|4730862|dbj|D86187.1](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1519

Score = 2026 bits (1022), Expect = 0.0  
Identities = 1039/1042 (99%), Gaps = 2/1042 (0%)  
Strand = Plus / Plus

2) [gi|14388778|gb|AF253367.1](#) Uncultured bacterium (human infant) S7A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1406

Score = 1959 bits (988), Expect = 0.0  
Identities = 1025/1036 (98%), Gaps = 4/1036 (0%)  
Strand = Plus / Plus

3) [gi|16612136|gb|AF432082.1](#) *Bifidobacterium catenulatum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1445

Score = 1943 bits (980), Expect = 0.0  
Identities = 1003/1008 (99%), Gaps = 2/1008 (0%)  
Strand = Plus / Plus

4) [gi|57231888|gb|AY856700.1](#) *Bifidobacterium* sp. h12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1450

Score = 1935 bits (976), Expect = 0.0  
Identities = 1002/1008 (99%), Gaps = 2/1008 (0%)  
Strand = Plus / Plus

5) [gi|14388783|gb|AF253372.1|](#) Uncultured bacterium (human infant) L14B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1403

Score = 1907 bits (962), Expect = 0.0  
Identities = 1027/1044 (98%), Gaps = 5/1044 (0%)  
Strand = Plus / Minus

6) [gi|14388777|gb|AF253366.1|](#) Uncultured bacterium (human infant) S7B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1402

Score = 1850 bits (933), Expect = 0.0  
Identities = 1010/1045 (96%), Gaps = 6/1045 (0%)  
Strand = Plus / Plus

7) [gi|13160586|gb|AF275893.1|](#) Uncultured *Bifidobacterium* sp. 9B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1360

Score = 1836 bits (926), Expect = 0.0  
Identities = 992/1009 (98%), Gaps = 5/1009 (0%)  
Strand = Plus / Plus

8) [gi|12247890|gb|AF333390.1|AF333390](#) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length = 1357

Score = 1812 bits (914), Expect = 0.0  
Identities = 1012/1042 (97%), Gaps = 2/1042 (0%)  
Strand = Plus / Plus

9) [gi|4730857|dbj|D86182.1|](#) *Bifidobacterium angulatum* DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence  
Length = 1520

Score = 1792 bits (904), Expect = 0.0  
Identities = 988/1008 (98%), Gaps = 6/1008 (0%)  
Strand = Plus / Plus

Annexe G : Résumé de l'identification des 141 colonies de cette étude

Colonies	Identification par PCR				Identification par séquençage	Noms
	Genre	Espèces				
		<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. adolescentis</i>		
rp 1	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 2	-	-	-	-	-	Non-identifiée
rp 3	-	-	+	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rp 4	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 5	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 6	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 7	+	-	+	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rp 8	-	-	+	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rp 9	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 10	-	-	-	-	-	<i>B. bifidum</i>
rp 11	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 12	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 13	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i>
rp 14	-	-	+	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rp 15	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 16	+	-	-	-	-	<i>Weissella viridescens</i>
rp 17	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 18	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 19	+	-	+	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rp 20	-	-	+	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rp 21	-	-	-	-	-	Non-identifiée
rp 22	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 23	+	+	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 24	-	-	-	-	-	Non-identifiée
rp 25	+	-	+	-	-	<i>B. adolescentis</i>







rp 86	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 87	+	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rp 88	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. longum</i>
rp 89	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Non-identifiée
rp 90	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rp 91	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Non-identifiée
rp 92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Inconnue aérophile
rp 93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>coli</i>
rp 94	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>coli</i>
rp 95	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rep 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. longum</i>
rep 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
rep 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. longum</i>
rep 10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rep 11	+	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>B. adolescentis</i>
rep 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
rep 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>
rep 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Enterococcus faecalis</i>
rep 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>
rep 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>
rep 21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Eubacterium moniliforme</i>
										<i>Lactococcus garvieae</i>

rep 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>	
rep 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>	
rep 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactococcus garvieae</i>	
sra 1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. adolescentis</i>
sra 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. longum</i>
sra 3	+	+	-	-	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 4	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 5	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 6	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 7	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 8	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 9	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 10	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 11	+	+	-	-	-	-	-	-	-		<i>B. longum</i>
sra 12	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 13	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 14	+	-	-	-	-	-	-	-	-		<i>B. longum</i>
sra 15	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. pseudocatenulatum</i>	
sra 18	+	+	-	-	-	-	-	-	-		<i>B. longum</i>
sra 19	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 20	+	+	-	-	-	-	-	-	-		<i>B. longum</i>
sra 21	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 22	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. longum</i>	
sra 23	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
sra 24	+	-	-	+	-	-	-	-	-		<i>B. adolescentis</i>
138	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. pseudocatenulatum</i>	
172	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. pseudocatenulatum</i>	
175	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. pseudocatenulatum</i>	

**Annexe H : Liste d'amorces utilisées dans l'identification moléculaire de *Bifidobacterium***

	Origine	Cible	Nom	Amorces	Longueur (pb)	Références
<i>Bifidobacterium</i>	Humain Porcs	16S rRNA	Bif164F-Bif601R	Fwd 5'-3': GGGTGGTAATGCCGG ATG Rev 5'-3': TAAGCGATGGACTTTCACACC	438	Bernhard et al., 2000
<i>Bifidobacterium</i>	Humain Animal	16S rRNA	Po / Lm3	Fwd 5'-3': GAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG Rev 5'-3': CGGGTGTICCCACTTTCATG	1400	Ventura et al., 2000
<i>Bifidobacterium</i>	Humain Animal	16S rRNA	P0 / P6	Fwd 5'-3': GAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG Rev 5'-3': CTACGGCTACCTTGTACGA	1500	Ventura et al., 2001
<i>Bifidobacterium</i>	Humain Animaux laitiers	16S rDNA	Pbi F1/ Pbi R2	Fwd 5'-3': CCGGAATAGCTCC Rev 5'-3': GACCATGCACCCACCCTGTGAA	914	Roy et al., 2000
<i>Bifidobacterium</i>	Humain Animaux laitiers	16S rRNA	Im26/ Im3	Fwd 5'-3': GATTCTGGCTCAGGATGAACG Rev 5'-3': CGGGTGTICCCACTT ATG	1530	Kaufmann et al, 1997
<i>B. adolescentis</i>	Humain	16S rRNA	BIA1-BIA2 (209-452)	Fwd 5'-3': GGAAAGATTCTATCGGTATGG Rev 5'-3': CTCCCAGTCAAAAAGCGGTT	244	Wang et al., 1996
<i>B. adolescentis</i>	Humain	16S rRNA	BiADO1- BiADO2 (184-462)	Fwd 5'-3': CTCCAGTTGGATGCATGTC Rev 5'-3': CGAAGGCTTGTCTCCCAGT	279	Matsuki et al., 1999
<i>B. animalis</i>	Animal	16S rDNA	Ban F2 / Pbi R1	Fwd 5'-3': AACCTGCCCTGTG Rev 5'-3': GCACCACCTGTGAACCG	925	Roy et al., 2000
<i>B. animalis</i>	Animal	16S-23S ITS region	Ban2-23Si	Fwd 5'-3': CATATTGGATCACGGTCC Rev 5'-3': CATTCCGGACACCCITGGGATC	1176	Ventura et al., 2002
<i>B. longum</i>	Humain	16S rRNA	BIL1-BIL2 (973-1126)	Fwd 5'-3': GTTCCCAGACGGTCTGTAGAG Rev 5'-3': GTGAGTTCCTCCGGCATAATCC	154	Wang et al., 1996
<i>B. bifidum</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': CCACATGATCGCATGTGATTG Rev 5'-3': CCGAAGGCTTGTCTCCCAA	277	Mullié et al., 2003

<i>B. breve</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': GGGAGCAAGGCACITTTGTGT Rev 5'-3': GAAACCCCACTCTCTGGGATC	568	Mullié et al., 2003
<i>B. longum biovar infantis</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': TTCCAGTTGATCGCATGGTC Rev 5'-3': GAAACCCCACTCTCTGGGATC	826	Mullié et al., 2003
<i>B. angulatum</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': ATCGGCTGGAGCTTGCCTCC Rev 5'-3': CATGCCATGGACTGGAGCAT	126	Mullié et al., 2003
<i>B. catenulatum/B. pseudocatenulatum continuum</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': CGGATGCTCCGACTCCT Rev 5'-3': CGAAGGCTTGCTCCCCGAT	285	Mullié et al., 2003
<i>B. dentium</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': ATCCCGGGGGTTTCGCCT Rev 5'-3': GAAGGGCTTGCTCCCCGA	387	Mullié et al., 2003
<i>B. longum</i>	Humain	16S rRNA	Pbi F1/ Lon R4	Fwd 5'-3': CCGGAATAGCTCC Rev 5'-3': CGTATCTCTACGACC	875	Roy et al., 2000
<i>B. longum</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': TTCCAGTTGATCGCATGGTC Rev 5'-3': GGGAAAGCCGTATCTCTACGA	831	Mullié et al., 2003
<i>B. adolescentis</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': CTCCAGTTGGATGCATGTC Rev 5'-3': CGAAGGCTTGCTCCCCAGT	278	Mullié et al., 2003
<i>P. denticolens</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': GGAAAGCTTTTGGCCCATGG Rev 5'-3': GCGGATCGTCAACATGTCAA	788	Mullié et al., 2003
<i>B. gallicum</i>	Humain	16S rRNA		Fwd 5'-3': TAATACCGGATGTTCGGCTC Rev 5'-3': ACACAGGACCCCGAAAAAGG	681	Mullié et al., 2003

Annexe I : Liste de sondes utilisées dans l'identification moléculaire de *Bifidobacterium*

Espèces	Cibles	Oligosondes (5' - 3')	Longueur (pb)	Tm	G+C	References
<i>Bifidobacterium</i>	16S rDNA 662-689	TCTACACATTCCACCGTTACACC G GGAA	28			Nebra et al., 2002
<i>Bifidobacterium</i>	16S rRNA 1412-1432	CGGGTGCTICCCACTTTCATG	21			Kaufmann et al., 1997
<i>Bifidobacterium</i>	16S rRNA 165-148	CATCCGGCATTACCAACC	18	56,3	61,1	Bernhard et al., 2000
<i>Bifidobacterium</i>	16S rRNA 586-566	TAAGCGATGGACTTTCACACC	21	56,2	47,6	Bernhard et al., 2000
<i>B. adolescentis</i>	16S rRNA 442-434	CTCCCAGTCAAAAAGCGGTT	19	56,3	52,6	Wang et al., 1996
<i>B. adolescentis</i>	16S rRNA 202-184	GACATGCATCCAACCTGGAG	19	54,1	52,6	Matsuki et al., 1999
<i>B. adolescentis</i>	16S rRNA 205-184	AAGGACATGCATCCAACCTGGAG	22	58,7	50	Lynch et al., 2002
<i>B. adolescentis</i>	16S rRNA	CTCCAGTTGGATGCATGTCCCTTC T GGG	27			Lynch et al., 2002
<i>B. breve</i>	16S rRNA 1477-1456	GTAGGATTAGTCCCAATCAGGA	22	54,5	45,5	inconnue
<i>B. breve</i>	16S rRNA 66-45	AGC CCGATGGATAACCCGTTCGA	22	63,7	59,1	inconnue
<i>B. longum</i> <i>biovar infantis</i>	16S rRNA 1447-1468	ATCAGGATTTACCTTAGACGG	22	55,5	45,5	inconnue
<i>B. adolescentis</i>	16S rRNA 72-51	TCTCACGGCCGGAGCAAGCTCC	22	67	68,2	inconnue
<i>B. dentium</i>	16S Rma 1132-1151	ACGTCACGGTGGGAECTCA	19	60		Nebra et al., 2003
<i>B. gallinarum</i>	16S rRNA 210-189	TCCCATGCGGTTCATCTGGAGCA	22	64,6	59,1	inconnue

<i>B. inopinatum</i>	16S rRNA 186-165	ACCGAATGGTCCCACTGGGCTGC	22	65,5	63,6	inconnue
<i>B. longum</i>	16S rRNA 191-172	TCCCAACACACACCATGCCGGTGTG	22	63,8	59,1	inconnue
<i>B. longum</i>	16S rRNA 991-973	CTCTACGACCGTCGGGAAC	19	57,5	63,2	Wang et al., 1996
<i>B. magnum</i>	16S rRNA 616-595	AGCGCAAATCCGCCCGTTAAGCG	22	64,5	59,1	inconnue
<i>B. minimum</i>	16S rRNA 200-179	CCCATGAGGTCATGTGGAGCAT	22	60,6	54,5	inconnue
<i>B. pseudolongum</i>	16S rRNA 200-179	CTTTCCCACTCGCATGCGGCT	22	63,9	59,1	inconnue
<i>B. psychroaerophilum</i>	16S rRNA 210-189	GACCCCATCTCATACCCGCTAAC	22	58,1	54,5	inconnue
oral strain	16S rRNA 65-44	CCCCTAGCAAGCTAGAAAGGAT	22	57,5	50	inconnue
complexe animal	16S rRNA 1037-1053	CCGGTTCACAGGTGGT	16	52		Nebra et al, 2003



**Annexe J : Patron de digestion avec Sau 3AI des colonies isolées des différents sites d'échantillonnage non-identifiées par PCR multiplexe**

Colonies	Nombre de paires de bases																	Groupes						
	1100	1050	1031	950	900	850	800	750	700	650	600	550	500	450	400	350	320		300	250	200	175	150	125
Rep 1				+															+	+				A
Rep 2				+															+	+				A
Rep 3				+															+	+				A
Rep 4				+															+	+				A
Rep 5				+															+	+				A
Rep 8				+															+	+				A
Rep 14				+															+	+				A
Rep 15				+															+	+				A
Rep 16				+															+	+				A
Rep 18				+															+		+			B
Rep 19				+															+		+			B
Rep 21				+															+		+			B
Rep 22				+															+		+			B
Rep 23				+															+		+			B
Rep 24				+															+		+			B
Rp 29				+																	+	+		C
Rp 40				+																	+	+		C
Rp 47				+																	+	+		C





**Annexe K : Photo des différents sites d'échantillonnage**



**Site 1 : Rivière Achigan, village de St-Roch-de-L'Achigan**



**Site 1 : Rivière Achigan, village de St-Roch-de-L'Achigan**



Site 2 : Rivière L'Assomption, pont de la 341



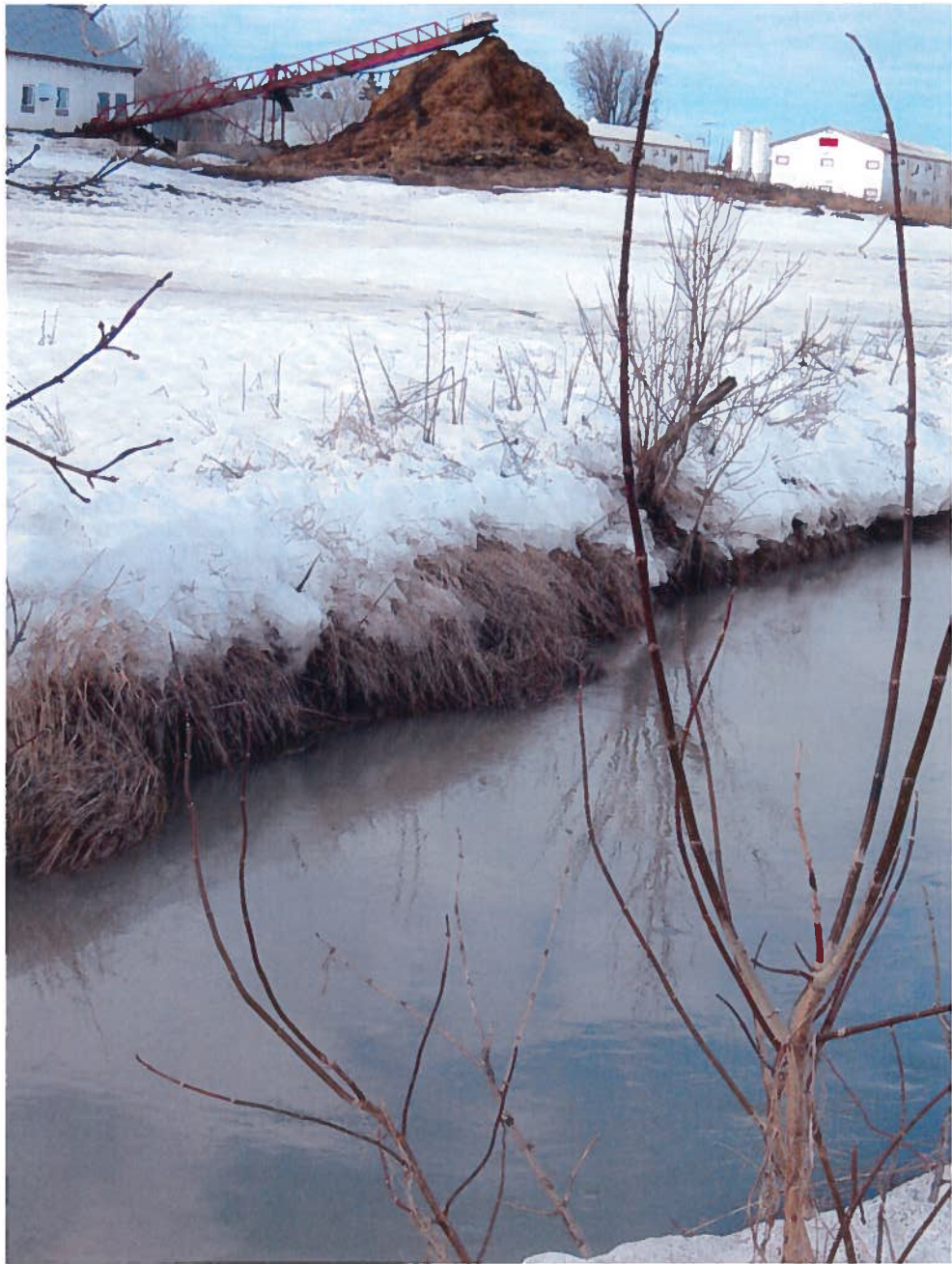
Site 2 : Rivière L'Assomption, pont de la 341



Site 3 : Rivière des Prairies, face à l'Institut Armand-Frappier

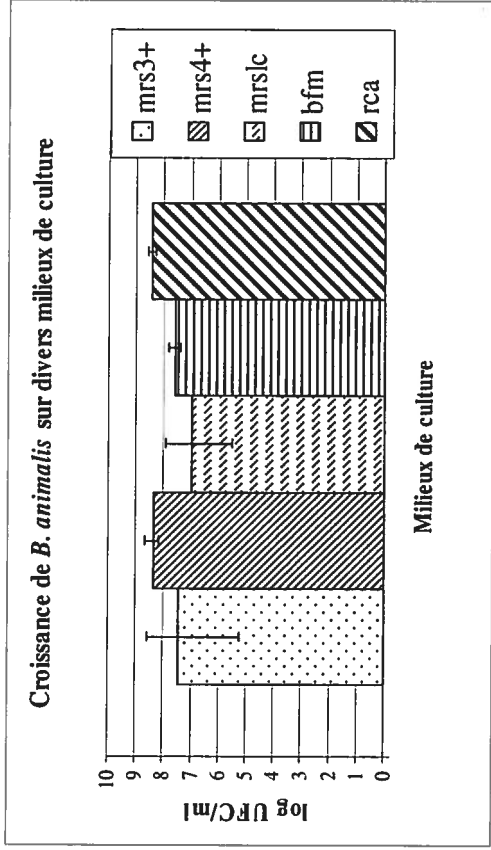
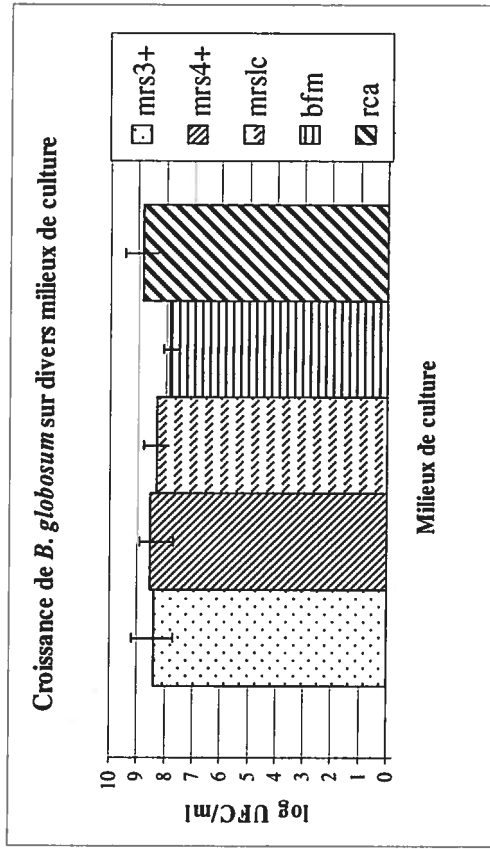
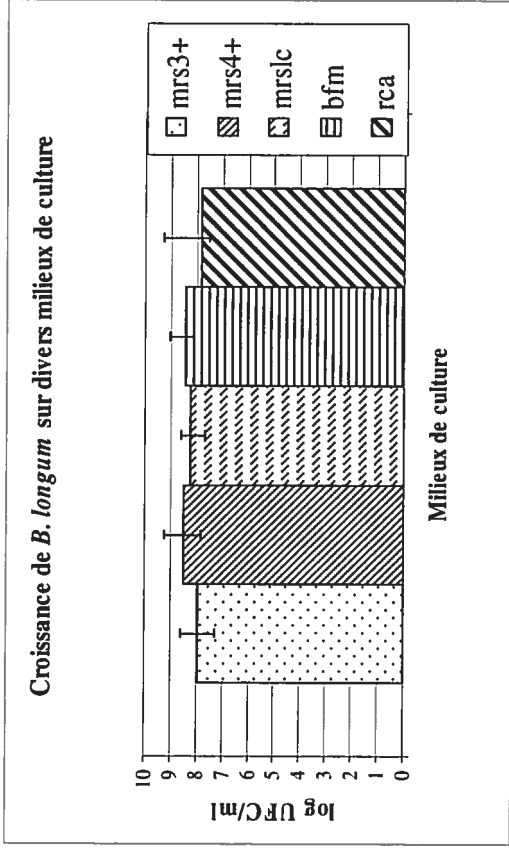
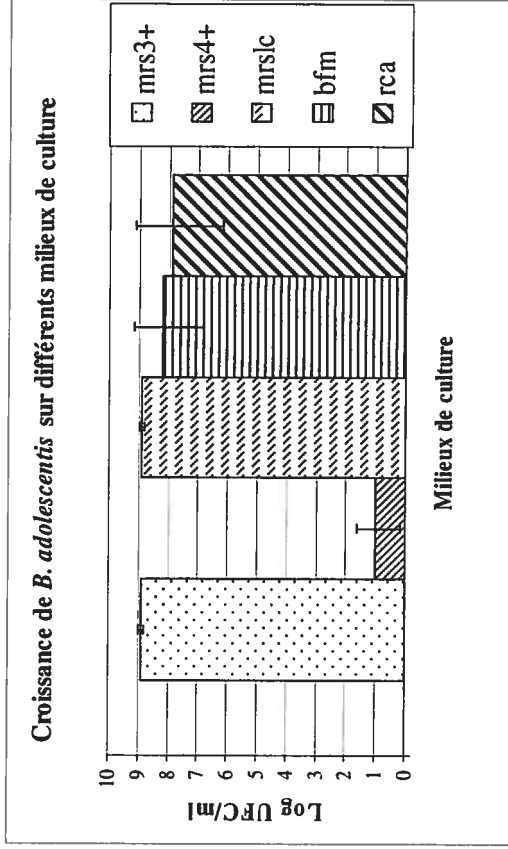


Site 3 : Rivière des Prairies, face à l'Institut Armand-Frappier



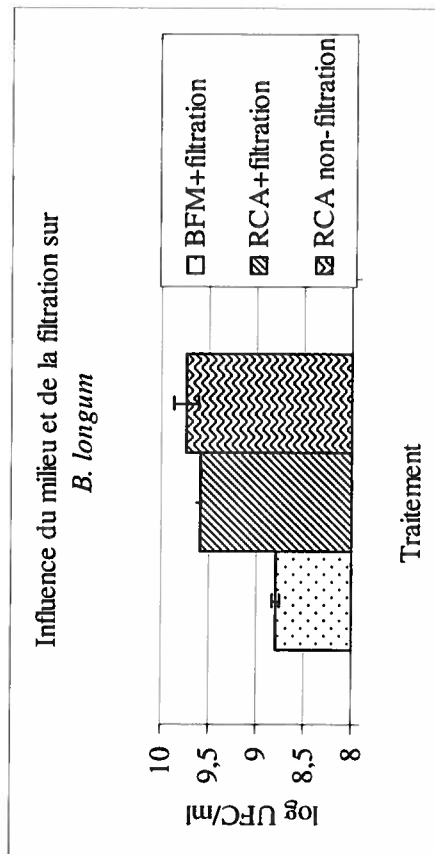
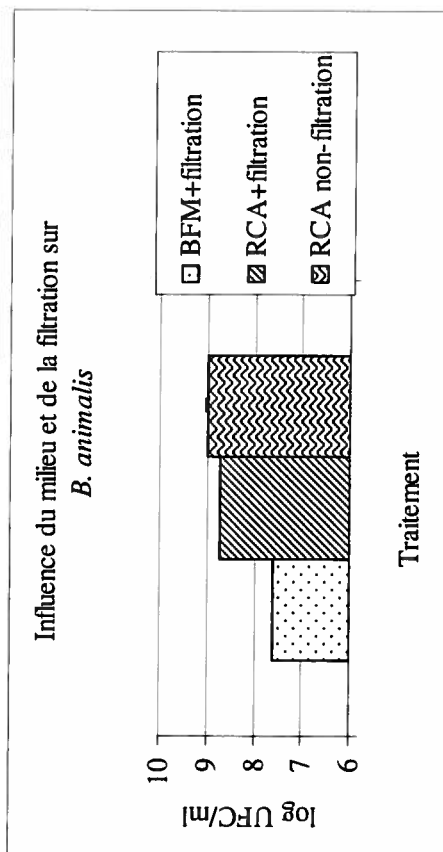
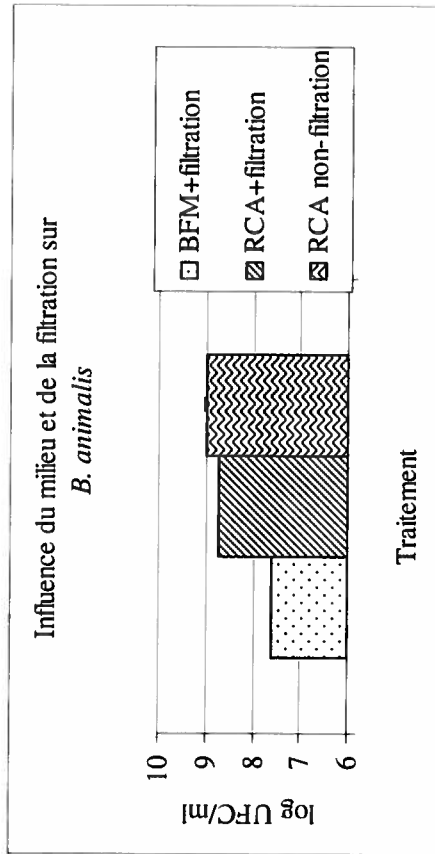
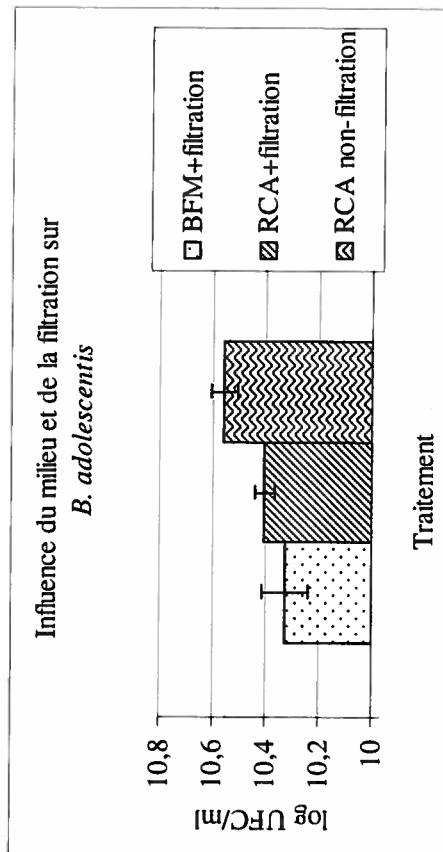
**Site 4: Ruisseau St-Jean, arrière du 420 chemin du ruisseau St-Jean  
(St-Roch-de-l'Achigan)**

**Annexe L : Croissance de *Bifidobacterium* sur divers milieux**





**Annexe M : Effet du milieu de culture et de la filtration sur *Bifidobacterium***



## BIBLIOGRAPHIE

ABD EL-GAWAD I.A., El-Sayed E.M., Hafez S.A., El-Zeini H.M., Saleh F.A. 2004. «Inhibitory effect of yoghurt and soya yoghurt containing bifidobacteria on the proliferation of Ehrlich ascites tumour cells in vitro and in vivo in a mouse tumour model». British Journal of Nutrition, vol. 92, 81–86.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY (ASM). 2005. «Microbial pollutants in our nation's water». Environmental and Public Health Issues. [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL:

[http://www.asm.org/ASM/files/CCPAGECONTENT/DOCFILENAME/0000005987/waterreport\[1\].pdf](http://www.asm.org/ASM/files/CCPAGECONTENT/DOCFILENAME/0000005987/waterreport[1].pdf)

ANNAN K. 2002. «Pour un avenir viable». Communiqué de presse SG/SM/8239. [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.un.org/News/fr-press/docs/2002/SGSM8239.doc.htm>

APAJALAHTI J.H., Kettunen A., Nurminen P.H., Jättilä H., Holben W.E. 2003. Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. Applied and Environmental Microbiology, vol. 69, p. 5731–5735.

ARRANGO C. 2000. «Evaluation and optimization of detection methods for *Rhodococcus coprophilus* and sorbitol-fermenting Bifidobacteria as source-specific indicator organisms for drinking water sources». Thesis submitted to graduate school of University of Massachusetts Amherst. Umi number :9988763

ASHBOLT N.J., Grabow W.O.K., Snozzi M. 2001. «Indicators of microbial water quality». *Water Quality: Guidelines, Standards and Health. Risk assessment and management for water-related infectious disease*, IWA Publishing, London, p. 289-316.

ATHERHOLT T., Feerst E., Hovendon B., Kwak J., Rosen J. D. 2003. «Evaluation of indicators of fecal contamination in groundwater». E-journal awwa. Volume 95, Number 10.

ATLAS SUR L'ÉTAT DE L'ENVIRONNEMENT AU QUÉBEC. 2005 a et b. «Variabilité spatiale de la qualité des eaux (suite). Médiane estivale 1998-2000 en coliformes». [Page consulté en ligne en février 2004]. Adresse URL: <http://www.menv.gouv.qc.ca/regards/atlas/coliformes.htm>

BACHTIAR T., Coakley J.P., Risk M.J. 1996. «Tracing sewage-contaminated sediments in Hamilton Harbour using selected geochemical indicators». Science of the Total Environment. Vol. 179, p. 3-16.

BAHAKA D., Neut C., Khattabi A., Monget D., Gavini F. 1993. «Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*». International Journal of Systematic Bacteriology, Vol 43, P. 565-573.

BERNHARD A.E., Field K.G., 2000. «Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes». Applied Environmental Microbiology, vol. 66, p.1587–1594.

BIFFI A., Coradini D., Larsen R., Riva L., Di Fronzo G. 1997. «Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line». Nutrition and Cancer, vol. 28, p. 93-9.

BIOVIR LABORATORIES INC. 2004. «Enteric Virus». [Page consulté en ligne en Février 2004]. Adresse URL: <http://www.biovir.com/Images/pdf024.pdf>

BLANCH A.R., Belanche-Munoz L., Bonjoch X., Ebdon J., Gantzer C., Lucena F., Ottoson J., Kourtis C., Iversen A., Kuhn I., Moce L., Muniesa M., Schwartzbrod J., Skraber S., Papageorgiou G., Taylor H.D., Wallis J., Jofre J. 2004. «Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme». Journal of Water and Health, vol. 2, p. 249-60.

BONJOCH X., Balleste E., Blanch A.R. 2004. «Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium spp.* to identify sources of fecal pollution». Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, p. 3171-5.

BUCHAN A., Alber M., Hodson R.E. 2001. «Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S–23S intergenic spacer region». FEMS Microbiology Ecology, vol. 35, p. 313-321.

BUERGE I.J., Poiger T., Müller M.D., Buser H-R. 2003.«Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters». Environmental Science & Technology. Vol. 37, p. 691-700.

BURKHARDT M.R. 1999. «Determination of submicrogram-per liter concentrations of caffeine in surface water and groundwater samples by solid-phase extraction and liquid chromatography». Journal of Association of analytical Communities International, vol. 82, p. 161-166.

CAMPER A.K., McFetters G.A., Characklis W.G., Jones W.L. 1991. «Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems». Journal of Applied Microbiology, vol. 57, p. 2233-2239.

CARRILLO M., Estrada E., Hazen T.C. 1985. «Survival and enumeration of fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed». Applied and Environmental Microbiology, vol. 50, p. 468-476.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION NATIONAL CENTER FOR ENVIRONMENTAL HEALTH. 2002. «A Survey of the Quality of Water Drawn from Domestic Wells in Nine Midwest States». [Page consulté en ligne en février 2004]. Adresse URL: <http://www.cdc.gov/nceh/emergency/WellWater/WellResults.htm>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2005. «Infectious Disease Information: Water-Related Diseases». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/water/drinking.htm>

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE (CEAEQ). 2000. «Méthodes d'analyses biologiques, microbiologiques et toxicologiques». ». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: [http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/bio\\_toxico\\_micro.htm](http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/bio_toxico_micro.htm)

CENTRE D'INNOVATION GÉNOME QUÉBEC ET UNIVERSITÉ MCGILL. 2005. [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL : <http://www.genomequebec.mcgill.ca/centre.php?&language=fr>

CHAN K.H., Lam M.H.W., Poon K.F., Yeung H.Y., Chiu T.K.T. 1998. «Application of sedimentary fecal stanols and sterols in tracing sewage pollution in coastal water». Water Research, vol. 32, p. 225-235.

CHARTERIS W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collin J.K. 1997. «Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial population». International Journal of Food Microbiology, vol. 35, p. 1-27.

CHARTERIS W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. 1998. «Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species». Journal of Food Protection. Vol. 61, p. 1636-43.

COMITÉ FÉDÉRAL-PROVINCIAL-TERRITORIAL SUR L'EAU POTABLE (CCME). 2002. «De la source au robinet. L'approche à barrière multiples pour une eau potable saine». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: [http://www.ccme.ca/assets/pdf/mba\\_fre.pdf](http://www.ccme.ca/assets/pdf/mba_fre.pdf)

COOKE M.D. 1976. «Antibiotic resistance among coliform and fecal coliform bacteria isolated from sewage, seawater, and marine shellfish». Antimicrobial Agents Chemotherapy, vol. 9, p. 879-884.

CORPORATION DE L'AMÉNAGEMENT DE LA RIVIÈRE L'ASSOMPTION. 2005. «Le bassin versant». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.cara.qc.ca/bassin.html>

CROCIANI F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C., Scardovi V. 1996. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries». International Journal of Systemic Bacteriology, vol. 46, p. 564-71.

DELCENSERIE V., China B., Gavini F., Beerens H., Daube G. 2002. «Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*». Annales de Médecine Vétérinaire, vol. 146, p. 279-293.

DOMBEK P.E., Johnson L.K., Zimmerley S.T., Sadowsky M.J. 2000. «Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, no. 6, p. 2572-2577.

EDBERG S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J. 2000. «*Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection». Journal of Applied Microbiology, vol. 88, p. 106S-116S.

ELMUND G.K., Allen M.J., Rice E.W. 1999. «Comparison of *Escherichia coli*, total coliform and fecal coliform populations as indicators of wastewater treatment efficiency». Water Environmental Research, vol. 71, p. 332-339.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2004. «TMDL Definition - What is a total maximum daily load (TMDL)?». [Page consulté en ligne en février 2004]. Adresse URL: <http://www.epa.gov/owow/tmdl/intro.html>

EUZÉBY, J.P. 2005. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacdico.net>

FARNLEITNER A.H., Kreuzinger N., Kavka G.G., Grillenberger S., Rath J., Mach R.L. 2000. Simultaneous detection and differentiation of *Escherichia Coli* populations from environmental freshwaters by means of sequence variations in fragment of beta-D-glucuronidase gene. Applied Environmental Microbiology, vol. 66, p. 1340–1346.

FASOLI S., Marzotto M., Rizzotti L., Rossi F., Dellaglio F., Torriani S. 2002. «Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis». International Journal of Food Microbiology. vol. 26, p. 59-70.

FEDERICI F., Vitali B., Gotti R., Pasca M.R., Gobbi S., Peck A.B., Brigidi P. 2004. «Characterization and heterologous expression of the oxalyl coenzyme A decarboxylase gene from *Bifidobacterium lactis*». Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, p. 5066–5073.

FLETCHER M. Verity P.G., Frischer M. E., Maruya K.A., Scott G.I. 1999. «Microbial indicators and phytoplankton and bacterial communities as evidence of contamination caused by changing land use patterns». The South Atlantic Bight Land Use Coastal Ecosystem Study, South Carolina Sea Grant Consortium. [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.lu-ces.org/documents/SOKreports/microbialindicators.pdf>

GAVINI F., Pourcher A.-M., Neut C., Monget D., Romond C., Oger C., Izard D. 1991. «Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 41, p. 548-557

GLIPIN B.J., Gregor J.E., Savill M.G. 2002. «Identification of the source of faecal pollution in contaminated rivers». Water Science and Technology, vol. 46, p. 9-15.

GILPIN B.J., James T., Nourozi F., Saunders D., Scholes P., Savill M. 2003. «The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification». Water Science and Technology. Vol. 47, p. 39-43.

GOVERNMENT OF BRITISH COLUMBIA. 2001. «Understanding Non-Point Source Pollution in BC». [Page consulté en ligne en février 2004]. Adresse URL: [http://wlapwww.gov.bc.ca/wat/wq/nps/NPS\\_Pollution/NPS.htm](http://wlapwww.gov.bc.ca/wat/wq/nps/NPS_Pollution/NPS.htm)

HA G.Y., Yang C.H., Kim H., Chong Y. 1999. «Case of sepsis caused by *Bifidobacterium longum*». Journal of Clinical Microbiology, vol. 37, p. 1227-1228.

HAIRSTON J.E., Beck J.M. 1997 «Water disinfection with chlorine: Is it safe?». Environmental education seriestimely information Agriculture & Natural Resources Agronomy and soils Auburn University, Alabama. [Page consulté en ligne en février 2004]. Adresse URL: <http://www.aces.edu/crd/publications/wtrqlty/wq-water-disinfection.pdf>

HARMSEN H.J.M., Gibson G.R., Elfferich P., Raangs G.C., Wildeboer-Veloo A.C., Argai A., Roberfroid M.B., Welling G.W. 1999. «Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria». FEMS Microbiology Letters, vol. 183, p. 125-129.

HARSHARNJIT S.G. 2003. «Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract». Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, Vol. 17, p. 755-773.

HERIGSTAD B., M. Hamilton M., Heersink J. 2001. «How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria». Journal of Microbiological Methods, vol. 44, p. 121-129.



HURST C.J., Crawford R. L., Knudsen G. R., McInerney M. J., Stetzenbach L. D. 2002. Manual of Environmental microbiology, second edition, ASM Press.

INSTITUT NATIONALE DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC. 2003. «Coliformes Fécaux». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/198-CartableEau/ColiformesFecaux.pdf>

INSTITUT PASTEUR DE LILLE. 2005. «Le ribotypage des bactéries : l'obtention d'une empreinte génétique». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: [http://www.pasteur-lille.fr/fr/expertises/hygiene\\_hosp/pdf/ribotypage2.pdf](http://www.pasteur-lille.fr/fr/expertises/hygiene_hosp/pdf/ribotypage2.pdf)

JOHNSON L.K., Brown M.B., Carruthers E.A., Ferguson J.A., Dombek P.E., Sadowsky M.J. 2004. «Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different Animals Influence Accuracy of Determining Sources of Fecal Pollution». Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, p. 4478-4485.

KAUFMANN P.A., Teuber P.M., Meile L. 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 1268-1273.

KRZEWINSKI F. 1997. Phd Thesis. Université des sciences et techniques de Lille (France). [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.inra.fr/bifid-project/Bifidobacteria.htm>

LAINING R.D. 2002. «Report of the Commission of Inquiry into matters relating to the safety of the public drinking water in the City of North Battleford, Saskatchewan».». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.northbattlefordwaterinquiry.ca/>

LECHEVALLIER M.W., Norton W.D., Lee R.G. 1991. «Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies». Applied and Environmental Microbiology, vol. 57, p. 2610-2616.

LECHEVALLIER M.W., Welch N.J., Smith D.B. 1996. «Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water». Journal of Applied Microbiology, vol. 62: 2201-2211.

LECLERC H. 2003. «Are there opportunistic bacterial infections from drinking water»? Journal Européen d'Hydrologie, tome 34, fasc. 1, p. 11 à 44.

LECLERC H. 2003. «Y a-t-il des infections bactériennes opportunistes transmises par les eaux d'alimentation ?». Journal Européen d'Hydrologie, tome 34, fasc. 1, p. 11 à 44.

LEEMING R., Nichols P.D. 1996. «Concentrations of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline». Water Research, vol. 30, issue 12, p. 2997-3006.

LEUNG K., Topp E. 2001. Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: Molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA. FEMS Microbiology Ecology, vol. 38, p. 169-177.

LÉVESQUE M.-J., La Boissière S., Thomas J.-C., Beudet R. et Villemur R., 1997. «Rapid method for detecting *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 in soil by the polymerase chain reaction». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 47, p. 719-725.

LIM K.S, Huh C.S., Baek Y.J. 1993. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. Journal of Dairy Science, vol. 76, p. 2168-2174.

LOI SUR LA QUALITÉ DE L'ENVIRONNEMENT, L.R.Q. Q-2. 2004. Les publications du Québec. [Page consulté en ligne en février 2004]. Adresse URL: [http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch//telecharge.php?type=2&file=/Q\\_2/Q2.HTM](http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch//telecharge.php?type=2&file=/Q_2/Q2.HTM)

LYNCH P.A., Gilpin B.J., Sinton L.W., Savill M.G. 2002. «The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution». Journal of Applied Microbiology, vol. 92, p. 526-533.

LYNCH PA, Gilpin BJ, Sinton LW, Savill MG.2002. «The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution». Applied and Environmental Microbiology, vol. 92, p. 526-33.

MACKIE R.I, Sghir A., Gaskins H.R. 1999. «Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract». American Journal of Clinical Nutrition, vol. 69, p. 1035S-1045S.

MALAKOFF D. 2002. «Microbiologists on the Trail of Polluting Bacteria». Science, vol. 295, Issue of 29 Mar 2002, p. 2352-2353.

MARA D.D., Oragui J.I. 1983. «Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human fecal pollution». Journal of Applied Bacteriology, 55, 349-357.

MASCO L., Huys G., Gevers D., Verbruggen L., Swings J. 2003. «Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting». Systematic and Applied Microbiology, vol. 26, p. 557-63.

MATSUKI T., Watanabe K., Tanaka R., Oyaizu H. 1998. «Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers». FEMS Microbiology Letters, vol. 167, p. 113-121.

MATSUKI T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H. 1999. «Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-Genetargeted Species-Specific Primers». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 4506–4512.

MATSUKI T., Watanabe K., Fujimoto J., Miyamoto Y., Takada T., Matsumoto K., Oyaizu H., Tanaka R. 2002. «Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces». Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 5445-51.

MATSUKI T., Watanabe K., Fujimoto J., Kado Y., Takada T., Matsumoto K., Tanaka R. 2004. «Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria». Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, p. 167-73.

MAWDSLEY L., Bardgett R.D., Merry R.D., Pain B.F., Theodorou M.K. 1995. «Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution». Applied Soil Ecology, vol. 2, p.1-15.

MEAYS C.L., Broersma K., Nordin R., Mazumder A. 2004. «Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods». Journal of Environmental Management, vol. 73, p. 71-79.

McLELLAN S.L., Daniels A.D., Salmore A.K. 2003 «Genetic characterization of Escherichia coli populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting». Applied and Environmental Microbiology, vol. 69, p. 2587-2594.

MELNICK J.L., Rennick V. 1980. Infectivity titers of enterovirus as found in human stool. Journal of Medical Virology, vol. 5, issue3, p. 205-220.

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, ENVIRONNEMENT ET PARCS (MDDEP). 2002a. «Bassin versant de la rivière l'Assomption (1997)». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL:

[http://www.menv.gouv.qc.ca/milieu\\_agri/pratiques-agri/assomption/partena.htm](http://www.menv.gouv.qc.ca/milieu_agri/pratiques-agri/assomption/partena.htm)

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, ENVIRONNEMENT ET PARCS (MDDEP). 2002b. «Portrait régional de l'eau : Laval (Région administrative 13)». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL : <http://www.menv.gouv.qc.ca/eau/regions/region13/13-laval.htm#31>

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, ENVIRONNEMENT ET PARCS (MDDEP). 2002c. «La gestion intégrée de l'eau par bassin versant... au cœur de l'application de la Politique de l'eau». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.mddep.gouv.qc.ca/chronique/2004/fevrier-avril/040223-bassin-versant.htm#definition>

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, ENVIRONNEMENT ET PARCS. 2002d. «La gestion intégrée de l'eau par bassin versant». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/bassinversant/index.htm>

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, ENVIRONNEMENT ET PARCS. 2005. «Politique nationale de l'eau du Québec». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/politique/>

MITZI R.B., Paster B.J., Leys E.J., Moeschberger M.L., Kenyon S.G., Galvin J.L., Boches S.K, Dewhirst F.E., Griffen A.L. 2002. «Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries». Journal of Clinical Microbiology, vol. 40, p. 1001-1009.

MOSSEL D. A. A. 1958. «The suitability of bifidobacteria as part of a more extended bacterial association indicating faecal contamination of foods». In 7th International Congress of Microbiology abstracts of papers. Almquist & Wikesells, Uppsala, Sweden, p. 440-441.

MULLIE C., Odou M.F., Singer E., Romond M.B., Izard D. 2003. «Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin». FEMS Microbiology Letters. Vol. 222, p. 129-36.

MUNOA F.J., Pares R. 1988. «Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium spp.*». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54, p. 1715-8.

N.PAL ANALYTICAL LABORATORIES. 1999. «Comparaison of four media for the selection of bifidobacteria in fecal samples». *Anaerobes* vol. 5, p. 123-127. [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.ralstonanalytical.com/FileUploads/Information/Bifido%2002.pdf#search='Comparison%20of%20four%20media%20for%20the%20selection%20of%20bifidobacteria'>

NEBRA Y., Blanch A.R. 1999. «A new selective medium for *Bifidobacterium spp*». *Applied Environmental Microbiology*. vol. 65, p. 5173-6.

NEBRA Y., Jofre J., Blanch A.R. 2002. «The effect of reducing agents on the recovery of injured *Bifidobacterium* cells». *Journal of Microbiological Methods*, vol. 49, p. 247-54.

NEBRA Y., Bonjoch X., Blanch A.R. 2003. «Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution». *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 69, p. 2651-6.

OFFICE OF THE AUDITOR GENERAL OF BRITISH COLUMBIA. 1998. «Report 5: Protecting Drinking-Water Sources». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.oag.bc.ca/pubs/1998-99/report-5/sec-1-h.htm>

ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES (OCDE). 2004. Développement durable. [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: [http://www.oecd.org/topic/0,2686,fr\\_2649\\_37425\\_1\\_1\\_1\\_1\\_37425,00.html](http://www.oecd.org/topic/0,2686,fr_2649_37425_1_1_1_1_37425,00.html)

PARVEEN S., Murphree R.L., Edminston L., Kaspar C.W., Portier K.M., Tamplin M.L. 1997. «Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, p. 2607-2612.

PARVEEN S., Portier K.M., Robinson K., Edmiston L., Tamplin M.L. 1999. «Discriminant Analysis of Ribotype Profiles of *Escherichia coli* for Differentiating Human and Nonhuman Sources of Fecal Pollution». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 3142-3147.

PAYMENT P. 1991ab. Wastewater chlorination from a public health microbiology perspective. Report for Her Majesty the Queen of Canada, p. 14-18

PIPES W.O. 1982. «Bacterial indicators of pollution». Florida, CRC Press, 174 pages  
Pitt R., Lalor M., Easton J. 2001. «Potential human health effects associated with pathogens in urban wet weather flows». University of Alabama publication.

POZIO E. 2003. «Foodborne and waterborne parasites». Acta Microbiol Pol., vol. 52 Suppl:83-96.

RADA V., Dlebal J. 1998. «Susceptibility of *Bifidobacteria* to nisin». Letters in Applied Microbiology, vol. 26, p. 123-125.

REQUENA T., Burton J., Matsuki T., Munro K., Simon M.A., Tanaka R., Watanabe K., Tannock G.W. 2002. «Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. Applied and Environmental Microbiology. vol. 68, p. 2420-7.

RÉSEAU DES DONNÉES SUR L'EAU DU BASSIN RHÔNE MÉDITERRANÉE CORSE. 2005. [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: [http://www.environnement.gouv.fr/rhone-alpes/bassin\\_rmc/rdbrmc/glossaire/Poldif.htm](http://www.environnement.gouv.fr/rhone-alpes/bassin_rmc/rdbrmc/glossaire/Poldif.htm)

RESNICK I.G., Levin M.A. 1981a. «Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution». Applied and Environmental Microbiology, vol. 42, p. 433-8.

RESNICK I.G., Levin M.A. 1981b. «Quantitative procedure for enumeration of bifidobacteria». Applied and Environmental Microbiology, vol. 42, p. 427-32.

RHODES M.W., Kator H. 1999. «Sorbitol-fermenting bifidobacteria as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watershed». Journal of Applied Microbiology, vol. 87, p. 528-535.

RICE E.W., Clark R.M., Johnson C.H. 1999. «Chlorine inactivation of *Escherichia coli* O157:H7». Emerging Infectious Diseases, vol. 5 issue 3, p. 461-463. [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol5no3/rice.htm>

RODERICK I Mackie, Abdelghani Sghir and H Rex Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 69, No. 5, 1035S-1045S.

ROSE B. R., Epstein P.R., Lipp E. K., Sherman B. H., Bernard S. M., Patz J. A. 2001. «Climate variability and change in the United States: Potential impacts on water- and foodborne diseases caused by microbiologic agents». Environmental Health Perspectives, Volume 109, Supplement 2.

ROY D., Sirois S. 2000. «Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene». FEMS Microbiology Letters, vol. 191, p. 17-24.

ROY D. 2001. «Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products». International Journal Food Microbiology, vol. 28, p. 167-82.

ROY D., Sirois S. 2001. «Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of *ldh* gene». FEMS Microbiology Letters, vol. 191, p. 17-24.

RUSIN P.A., Rose J.B., Haas C.N., Gerba C.P. 1997. «Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water». Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 152, p. 57-83.



SAINT-LAURENT VISION 2000. 1997. «La problématique de la pollution diffuse d'origine agricole». Bulletin d'information Saint-Laurent vision 2000, vol. 7, numéro 2.

SANTÉ CANADA. 2003ab. «La qualité virologique de l'eau potable». Document pour commentaires publics du Comité Fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable, p. 10-17.

SCARDOVI V. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. volume II.

SCARDOVI V., Crociani F. 1974. «*Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 24, p. 6-20.

SCOTT T.M., Rose J.B., Jenkins T.M., Farrah S.R., Lukasik J. 2002. «Microbial source tracking: current methodology and future directions». Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 5796-803.

SCOTT M.T., Parveen S., Portier K.M., Rose J.B., Tamplin M.L., Farrah S.R., Koo A., Lukasik J. 2003. «Geographical variation in ribotype profiles of *Escherichia coli* isolates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida». Journal of Applied and Environmental Microbiology, vol. 69, p. 1089–1092

SHAH N.P. 1999. «Probiotic Bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods». Journal of Dairy Science, vol. 83, p. 894-907.

SHELL M. A, Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M.-C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore D. R., Arigoni F. 2002. «The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract». PNAS, vol. 99, no. 22, 14422-14427.

SINTON L.W., Finlay R.K., Hannah D.J. 1998. «Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review». New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, vol. 32, p. 323-348.

SOUTH DAKOTA DEPARTMENT OF ENVIRONMENT & NATURAL RESOURCES. 2004. «get the facts... Volume 1». [Page consulté en ligne en Février 2004].

Adresse

URL:

<http://www.state.sd.us/denr/DFTA/WatershedProtection/getfacts.htm>

STANDLEY L.J., Kaplan L.A., Smith D. 2000. «Molecular tracer of organic matter sources to surface water resources». Environmental Science and Technology, vol. 34, p. 3124-3130.

TEMMERMAN R., Masco L., Vanhoutte T., Huys G., Swings J. 2003. «Development and validation of a nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities». Applied and Environmental Microbiology, vol. 69, p. 6380–6385.

VENTURA M., Elli M., Reniero R., Zink R. 2001. «Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)». FEMS Microbiology Ecology, vol. 36, p. 113-121.

VENTURA M., Reniero R., Zink R. 2001. «Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined Multiplex PCR approach». Applied and Environmental Microbiology, vol. 67, p. 2760-2765.

VENTURA M., Zink R. 2002. «Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*». Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 6429–6434.

WANG R.-F., Cao W.-W., Cerniglia C.E., 1996. «PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, p. 1242-1247.

WASHINGTON UNIVERSITY. 1990. «Method: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)». [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: [http://hg.wustl.edu/hdk\\_lab\\_manual/dgge/dgge1.html](http://hg.wustl.edu/hdk_lab_manual/dgge/dgge1.html)

WELIKALA N., Chester P.I., Matisoo-Smith E.A., Tannock G.W., Flenley J.R. 2001. «Molecular Evidence for Human Presence». Proceedings of the Australasian Archaeometry Conference, Auckland, February 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2003a. «Microbial aspects». Guidelines for drinking water quality, third edition : chap. 7. [Page consulté en ligne en septembre 2005]. Adresse URL: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_7.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_7.pdf)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2003b. «Water supply, sanitation and hygiene development».[Page consulté en ligne en février 2004]. Adresse URL: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/hygiene/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/hygiene/en/)

YAZID A.M., Ali A.M., Shuhaimi M., Kalaivaani V., Rokiah M.Y., Reezal A. 2000. «Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria». Letters in Applied Microbiology. vol. 31, p. 57-62.

YILDIRIM Z., Johnson MG. 1998. «Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454». Journal of Food Protection, vol. 61, p. 47-51.

YUSOF R.M., Haque F., Ismail M., Hassan Z. 2000. «Isolation of Bifidobacteria infantis and its antagonistic activity against ETEC 0157 and *Salmonella typhimurium* S-285 in weaning foods». Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, vol. 9, p. 130.