

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Caractérisation de la diversité bactérienne d'un biofilm
contaminant une usine de pâtes et papiers**

Par
Julie DISNARD

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Rolf MOROSOLI, Ph.D INRS- Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Simon BARNABÉ, Ph.D. Centre de recherche en pâtes et papiers, UQTR
Directeur de recherche	Richard VILLEMUR, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

L'usine de production de pâte et papier de Domtar située à Windsor, Québec, produit plusieurs tonnes de papier par année et utilise l'eau d'une rivière adjacente pour la totalité de ses procédés. L'eau blanche résultante subit des traitements physique et biologique avant d'être rejetée dans la rivière afin de respecter les normes environnementales. Dans le but de réduire le volume d'eau devant être traité, elle est réutilisée par recirculation dans la machine à papier. Une biomasse bactérienne diversifiée s'y développe car l'eau blanche contient une quantité importante de cellulose, d'hémicelluloses et d'adjuvants divers. Il y a par conséquent formation de biofilms sur l'acier inoxydable à une température variant de 35 à 50°C. En altérant la qualité du papier en formation, en accélérant la corrosion du métal et en bloquant les tuyaux, ces biofilms réduisent le rendement des machines à papier. Des biocides sont utilisés pour contrer le problème du développement bactérien ; cependant, cela engendre des coûts économiques et environnementaux importants, et n'apporte pas les résultats escomptés.

Par une collaboration de Carole Beaulieu et Ryszard Brzezinski de l'Université Sherbrooke ainsi que Richard Villemur de l'INRS-Institut Armand-Frappier, l'objectif général de ce projet est d'isoler des microorganismes indigènes capables d'inhiber l'attachement des microorganismes primaires (initialement responsables de la formation des biofilms). La contribution du laboratoire du Dr Villemur est de caractériser et de faire un suivi de la diversité bactérienne du biofilm.

L'hypothèse de départ était que le suivi de la diversité bactérienne pourrait être effectué à l'aide d'outils de biologie moléculaire basé sur l'ARNr 16S. Les objectifs spécifiques de ce projet étaient les suivants. Il s'agissait d'abord d'évaluer la diversité bactérienne des biofilms de l'usine de pâte et papier de Domtar, Windsor par la méthode du PCR-DGGE pendant une période d'un an. Ensuite, une génothèque des gènes de l'ARNr 16S devait être construite pour permettre la conception de sondes spécifiques aux groupes bactériens d'intérêt. Finalement, un protocole de CARD-FISH devait être optimisé afin d'observer et de quantifier ces bactéries dans les biofilms de l'usine.

Par la méthode du PCR-DGGE, nous avons noté le caractère très complexe de la flore bactérienne des biofilms de l'usine de P&P de Domtar à Windsor. Globalement, les différents échantillons ont montré qu'il y avait une forte diversité de la flore bactérienne

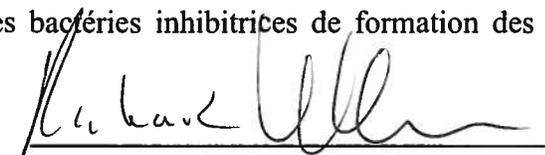
avec des dominances sporadiques illustrées par l'intensité des bandes sur DGGE. Nous avons aussi recherché *Meiothermus* sp., un genre bactérien dominant une génothèque faite sur l'eau blanche de l'usine. Les PCR spécifiques ont montré que *Meiothermus* sp. était présent dans 7 échantillons sur 33 quoiqu'absent de la génothèque. Si *Meiothermus* sp. est une bactérie primaire, il est possible qu'elle ne puisse pas survivre au cours de la maturation du biofilm. Sa présence imprévisible pourrait ainsi être expliquée. Le séquençage des gènes de l'ARNr 16S de 77 clones représentatifs des 178 clones criblés de notre génothèque a permis de les classer en 15 catégories appartenant à différents niveaux taxonomiques. Les Chloroflexi, représentant près du cinquième des clones (21,3%), pourraient contribuer, par leur agencement en filaments, à maintenir la structure visqueuse des biofilms.

La diversité bactérienne de 3 autres usines de P&P du Québec n'utilisant pas le même procédé qu'à Windsor a été étudiée par PCR-DGGE. Cependant, comme pour l'usine de Windsor, le profil bactérien n'était pas typique d'une usine mais plutôt de l'emplacement dans une usine.

À partir des résultats des génothèques faites sur l'eau blanche en 2006 par Véronique Prince de l'Université de Sherbrooke et les biofilms, nous avons conçu 8 sondes spécifiques. Un protocole de CARD-FISH (Rapporteur de dépôts catalytiques en hybridation fluorescente *in situ*) a été optimisé et chaque cible bactérienne a pu être visualisée par CARD-FISH. La quantification par pixel des images de microscopie confocale nous a permis de comparer nos résultats de génothèque (janvier 2007) à des biofilms récoltés en juillet 2008. Les Chloroflexi étaient aussi dominants dans nos analyses de CARD-FISH (20%).

Dans une perspective d'avenir, la méthode développée au cours de ce projet pourrait permettre de mesurer l'impact des microorganismes compétiteurs étudiés à l'Université de Sherbrooke sur des biofilms de laboratoire et des biofilms des usines. D'autres sondes pourraient être développées et des expériences de CARD-FISH permettraient d'étudier la flore affectée par ces bactéries inhibitrices de formation des biofilms.


Étudiante


Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Pr Richard Villemur, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir toujours fait preuve de disponibilité et de souplesse à mon égard. Je veux également le remercier de m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès nationaux et internationaux.

Ensuite, je remercie chaleureusement tous les étudiants que j'ai côtoyés lors de ma maîtrise, particulièrement mes collègues de laboratoire Julie Auclair, Sébastien Bigras, Ariane Bisailon, Philippe Constant et Randa Kortbaoui. Leur amitié et leur support m'ont été plus que bénéfiques. Un merci tout particulier à M. Marcel Desrosiers, du laboratoire d'imagerie confocale, pour ses conseils, son temps, sa patience et son humour.

J'aimerais manifester ma reconnaissance envers Pr Carole Beaulieu de l'Université de Sherbrooke et ses étudiants Sandra Allen, François Chabot et Véronique Prince.

Finalement, je désire souligner l'encouragement et le support de ma famille et particulièrement de mon conjoint, Luigi Boccanfuso, sans qui je n'aurais pas entamé chaque journée avec optimisme.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
REMERCIEMENTS	III
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	VIII
1. INTRODUCTION	1
2. REVUE DE LITTÉRATURE	5
2.1 TECHNIQUES DE FABRICATION DE LA PÂTE ET DU PAPIER.....	5
2.1.1 <i>Caractéristiques du bois</i>	5
2.1.2 <i>Procédé thermomécanique (TMP) de réduction de la pâte</i>	5
2.1.3 <i>Procédé chimique KRAFT de réduction de la pâte</i>	6
2.1.4 <i>Blanchiment</i>	6
2.1.5 <i>Fabrication du papier</i>	7
2.2 USINE DE PÂTES ET PAPIERS DE DOMTAR, WINDSOR, QUÉBEC.....	8
2.2.1 <i>Eau</i>	9
2.3 BIOFILMS.....	10
2.3.1 <i>Description</i>	10
2.3.2 <i>Incidence et composition des biofilms contaminants dans l'industrie des P&P</i>	12
2.3.3 <i>Traitements utilisés</i>	15
2.3.4 <i>Approche de la lutte biologique</i>	16
2.4 ÉTUDE DES MICROORGANISMES NON CULTIVABLES	18
2.4.1 <i>Caractéristiques</i>	18
2.4.2 <i>Génothèque 16S et électrophorèse sur gel à gradients d'agents dénaturants (DGGE)</i>	19
2.4.3 <i>Hybridation fluorescente in situ (FISH)</i>	20
2.5 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU PROJET	22
3. MATÉRIEL ET MÉTHODE	25
3.1 TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	25
3.1.1 <i>Extraction de l'ADN du biofilm et de souches pures</i>	25
3.1.2 <i>Électrophorèse sur gel d'agarose</i>	26
3.1.3 <i>Réaction de polymérase en chaîne (PCR)</i>	26
3.1.4 <i>Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)</i>	27
3.1.5 <i>Extraction d'ADN sur gel de polyacrylamide</i>	27
3.2 ÉLABORATION D'UNE GÉNOTHÈQUE DU GÈNE DE L'ARN RIBOSOMAL 16S	28
3.2.1 <i>Échantillonnage des biofilms</i>	28
3.2.2 <i>Purification des produits de PCR, ligature et transformation</i>	28
3.2.3 <i>Sélection des clones, extraction plasmidique et criblage</i>	29
3.2.4 <i>Séquençage et analyse phylogénique</i>	30
3.3 TECHNIQUE DE RAPPEUR DE DÉPÔTS CATALYTIQUES EN HYBRIDATION FLUORESCENTE IN SITU (CARD-FISH)	31
3.3.1 <i>Fixation des cellules</i>	31
3.3.2 <i>Préparation de cellules pour essais de CLONE-FISH</i>	31
3.3.3 <i>Perméabilisation membranaire et inactivation des peroxydases endogènes</i>	32
3.3.4 <i>Hybridation, lavage et amplification</i>	33
3.3.5 <i>CARD-FISH multicolore et contre-coloration de l'ADN</i>	34
3.3.6 <i>Visualisation des lames au microscope et quantification</i>	35

4. RÉSULTATS	41
4.1 SUIVI DE LA FLORE BACTÉRIENNE DES BIOFILMS DE L'USINE DE WINDSOR	41
4.1.1 <i>Suivi de la flore bactérienne par PCR-DGGE</i>	41
4.1.2 <i>Recherche de Meiothermus sp.</i>	46
4.2 ANALYSE PHYLOGÉNIQUE DE SÉQUENCES OBTENUES D'UNE GÉNOTHÈQUE 16S.....	47
4.3 ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ BACTÉRIENNE DE DIFFÉRENTES USINES DE P&P DU QUÉBEC	51
4.4 CORRESPONDANCE DE BANDES EXTRAITES DE DGGE.....	54
4.5 ÉTUDE DE LA FLORE BACTÉRIENNE DU BIOFILM PAR CARD-FISH.....	57
4.5.1 <i>Optimisation des sondes sur des cultures pures</i>	57
4.5.2 <i>Utilisation des sondes sur les biofilms</i>	59
5. DISCUSSION.....	63
5.1 SUIVI DE LA FLORE BACTÉRIENNE DE L'USINE DE WINDSOR PAR PCR-DGGE	63
5.2 RECHERCHE DE MEIOTHERMUS SP.....	64
5.3 ANALYSE PHYLOGÉNIQUE DE SÉQUENCES OBTENUES D'UNE GÉNOTHÈQUE 16S.....	65
5.4 ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ BACTÉRIENNE DE DIFFÉRENTES USINES DE P&P DU QUÉBEC	68
5.5 CORRESPONDANCE DE BANDES EXTRAITES DE DGGE.....	69
5.6 VISUALISATION DE LA FLORE BACTÉRIENNE DU BIOFILM PAR CARD-FISH.....	71
6. CONCLUSION	75
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.I	Affiliation phylogénique de clones provenant de l'eau de la caisse d'arrivée d'une machine à papier canadienne en février et en juillet 2006	18
Tableau 3.I	Amorces utilisées lors de ce projet	37
Tableau 3.II	Concentration de sel dans le tampon de lavage en relation avec le pourcentage de formamide utilisé dans le tampon d'hybridation	38
Tableau 3.III	Sondes utilisées lors de ce projet et pourcentage de formamide utilisé dans le tampon d'hybridation	39
Tableau 4.I	Description des 33 échantillons de biofilms collectés à l'usine de Domtar, Windsor, au cours de l'année 2007	43
Tableau 4.II	Affiliation la plus probable des 178 clones	47
Tableau 4.III	Description des usines échantillonnées (sauf Domtar, Windsor) et des échantillons collectés le 28 avril 2008	52
Tableau 4.IV	Affiliation phylogénique, par séquençage d'une partie du gène de l'ARNr 16S, de bandes découpées sur DGGE	56
Tableau 4.V	Quantification, sur 2 machines à papier, des cibles bactériennes spécifiques	59

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Vue d'ensemble des courants de masses d'une usine de P&P	8
Figure 2.2	Schéma simplifié d'une machine à papier	8
Figure 2.3	Schéma de formation d'un biofilm multi-espèces	11
Figure 3.1	Vecteur pGEM®-T Easy Vector de Promega utilisé pour la conception d'une génothèque du gène de l'ARNr 16S	40
Figure 3.2	Transformation de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) avec le plasmide pGEM®-T Easy Vector de Promega contenant comme insert un gène de l'ARNr 16S provenant du biofilm	40
Figure 4.1	Profil de la diversité bactérienne dans les 16 échantillons de biofilms prélevés sur la machine 7 lors de l'année 2007	44
Figure 4.2	Profil de la diversité bactérienne dans les 17 échantillons de biofilms prélevés sur la machine 8 lors de l'année 2007	44
Figure 4.3	Similarité entre les profils de migration de bandes des DGGE des figures 4.1 et 4.2	45
Figure 4.4	Produits de PCR amplifiés avec des amorces spécifiques au genre <i>Meiothermus</i>	46
Figure 4.5	Localisation des séquences des clones dans un arbre phylogénique des gènes de l'ARNr 16S	48
Figure 4.6	Profil de la diversité bactérienne dans 9 échantillons de biofilms prélevés dans 3 usines de P&P, situées à Kingsey Falls, QC, Clermont, QC et Drummondville, QC	53
Figure 4.7	Similarité entre les profils de migration de bandes du DGGE de la figure 4.6.	53
Figure 4.8	Profil de la diversité bactérienne dans 9 échantillons de biofilms représentatifs prélevés à l'usine de P&P de Domtar, Windsor, au cours de l'année 2007	55
Figure 4.9	Hybridations spécifiques aux concentrations de formamide optimales propres à chaque sonde	58
Figure 4.10	Visualisation, dans le biofilm, des souches bactériennes ciblées par les sondes spécifiques par CARD-FISH	60

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

°C :	Degrés Celcius
ADN :	Acide désoxyribonucléique
amp :	Ampicilline
ARDRA :	Analyse du profil de restriction d'ADN ribosomal amplifié
ARNr 16S :	Acide ribonucléique, sous-unité de 16 Svedberg
BSA :	Albumine sérique bovine
CARD-FISH :	Rapporteur de dépôts catalytiques en hybridation fluorescente <i>in situ</i>
DGGE :	Électrophorèse sur gel à gradient d'agents dénaturants
Da :	Dalton
dNTP :	désoxynucléotide triphosphate (contient une concentration égale de désoxyadénosine triphosphate, désoxyguanosine triphosphate, désoxycytidine triphosphate et désoxythymidine triphosphate)
EDTA :	Acide éthylène-diamine-tétracétique
F :	Pour le nom d'une paire amorce, signifie <i>forward</i> ou 5'→3'
FISH :	Hybridation fluorescente <i>in situ</i>
g :	gramme
GC (pince) :	Courte séquence d'ADN, sur une amorce, composée exclusivement de guanines et de cytidines
HRP :	Peroxydase du raifort
IPTG :	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
L :	Litre
LB :	Luria-Bertani
m :	mètre
M :	Mole
M7 et M8 :	Machines à papier 7 et 8 de l'usine de Domtar, Windsor
P&P :	Pâtes et papiers
p/v :	poids/volume
pb :	paire de bases
PBS :	Tampon salin phosphaté
PCR :	Réaction de polymérase en chaîne
R :	Pour le nom d'une paire amorce, signifie <i>reverse</i> ou 3'→5'
RNase :	Enzyme dégradant l'ARN
rpm :	Révolutions par minute
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
TAE :	Tampon Tris-HCl – acide acétique – EDTA
Taq :	Polymérase isolée de la bactérie <i>Thermus aquaticus</i>
TE :	Tampon Tris-HCl – EDTA
TEMED :	Tétraméthyléthylènediamine
TEN :	Tampon Tris-HCl – EDTA – NaCl
TMP :	Thermomécanique
V :	Volt
V3 :	Une des régions variables du gène de l'ARNr 16S
v/v :	volume/volume
Xgal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

1. INTRODUCTION

La réduction du bois en pâte, par un processus chimique ou mécanique, a pour objectif la libération des fibres du bois et leur dispersion dans l'eau, afin de les reformer en couche très mince sur une toile. Bien que le bois soit une ressource naturelle, le rendement du procédé choisi doit être le plus élevé possible. Au Canada, le renouvellement de la forêt ne se fait malheureusement pas de façon proportionnelle à la coupe de bois. Ainsi, les compagnies de pâtes et papiers ont suivi de gré ou de force le mouvement écologique des dernières années et se voient soumises à des normes serrées.

Un procédé de mise en pâte chimique émet une pollution aérienne considérable, mais récupère néanmoins certains produits chimiques pour les réutiliser à la ronde suivante. Les rejets aquatiques sont aussi surveillés et la plupart des usines sont aujourd'hui munies de système de récupération des eaux dites *blanches*, qui sont les eaux usées de la fabrication du papier. Le principal avantage de cette pratique est l'augmentation du rendement ; les eaux blanches contiennent encore de la pâte. Des systèmes de tuyauterie complexes gèrent donc les transferts d'eau d'une étape à l'autre (réduction en pâte, blanchiment, formation de la feuille,...).

Dans l'optique d'optimiser la consommation d'énergie, le bois n'est pas réduit en pâte au fur et à mesure que la machine à papier se libère. Au contraire, la pâte est fabriquée en grande quantité et est emmagasinée dans des cuiviers conçus à cet effet. Elle est même parfois vendue à d'autres usines. De la sorte, c'est la partie dite humide de la machine à papier qui est la plus utilisée de l'usine. L'eau blanche en circulation peut atteindre de 35 à 60°C (dépendamment de la saison), surtout à cause de la chaleur provenant de la section du séchage du papier.

La fabrication du papier pourrait ne se dérouler pas en condition stérile. Les sources de contamination microbienne de la pâte sont variées et difficiles à contrôler : l'eau utilisée pour disperser les fibres provient le plus souvent d'une rivière à proximité. La pâte est emmagasinée dans des cuiviers qui deviennent des incubateurs favorables à la croissance microbienne. Plusieurs additifs différents sont ajoutés à la pâte et aucun d'eux n'est vendu stérilement. Les sources de contamination microbienne à l'intérieur de l'usine pullulent : travailleurs, planchers, véhicules, etc. La partie humide d'une machine à papier

devient un lieu idéal pour la croissance microbienne : pH, humidité, température et apport régulier en source de carbone. La réutilisation constante de l'eau ne fait qu'augmenter sa charge microbienne.

Mais est-ce vraiment problématique d'avoir de 10^2 à 10^3 bactéries par mL d'eau blanche ? Pour ces compagnies, qui ne visent pas la stérilité absolue, les bactéries deviennent problématiques lorsqu'elles affectent la production ou les travailleurs. Ces bactéries sont capables d'adhérer à l'acier inoxydable des machines à papier, croître grâce au métabolisme de la cellulose et engendrer la formation de biofilms dans lesquels de multiples espèces pourront vivre.

Ce sont donc les biofilms et non les bactéries libres de l'eau blanche qui génèrent des complications. Même si les nettoyages sont fréquents, les biofilms se développent très rapidement et peuvent tomber sur la pâte et la tacher ou encore bloquer les tuyaux. Chaque minute d'arrêt de la machine à papier se transforme en dollars perdus pour la compagnie.

Pour contrer la formation des biofilms, de nombreux biocides sont vendus sur le marché. Toutes ces molécules sont des composés organiques toxiques lorsque relâchés dans l'environnement. Ces produits sont ajoutés à la pâte au même titre que les additifs visant à améliorer des qualités du papier. L'usine à l'étude possède un traitement secondaire biologique des eaux usées ; la dose de biocide doit rester faible pour ne pas affecter la flore microbienne des bassins de traitement. De plus, après un certain temps, on remarque une baisse d'efficacité des biocides allant jusqu'à l'augmentation de la formation des biofilms en présence de biocides. Les usines de pâtes et papiers doivent donc changer régulièrement de molécule s'ils veulent que leur procédé soit rentable.

Les recherches qui démontrent la faible efficacité des biocides ou antibiotiques sur les biofilms sont nombreuses. Une nouvelle stratégie est donc nécessaire : même si une nouvelle molécule biodégradable était découverte, cela ne changerait rien au fait que les bactéries des biofilms sont protégées par leur milieu et deviennent rapidement résistantes. Puisque la machine à papier ne doit pas devenir un milieu stérile, une tactique envisageable pourrait être le contrôle de la *formation* des biofilms par la flore bactérienne de l'eau blanche et non l'élimination de celle-ci. C'est cette avenue qui a été considérée dans ce projet.

L'idée de l'équipe de Carole Beaulieu et Ryszard Brzezinski, professeurs-chercheurs de l'Université Sherbrooke, est de trouver des compétiteurs naturels au sein même de la flore bactérienne. En isolant de multiples souches bactériennes des biofilms de l'usine de pâtes et papiers de l'usine de Domtar, Windsor, ils ont pu tester si une telle capacité de compétition existait dans la flore indigène. Ces compétiteurs devaient être en mesure d'empêcher la formation des biofilms en se liquant contre les espèces dites primaires. Les espèces primaires ont la capacité d'utiliser la source de carbone disponible et de générer des sous-produits pour une panoplie d'espèces bactériennes. Une collaboration a été établie avec Richard Villemur, professeur-chercheur à l'INRS-Institut Armand-Frappier. Sa contribution consiste en la caractérisation et le suivi de la diversité bactérienne des biofilms. Ce volet du projet global du Pr Beaulieu devient les objectifs généraux du projet de maîtrise présenté dans ce mémoire.

L'hypothèse de départ était que le suivi de la diversité bactérienne pourrait être effectué à l'aide d'outils de biologie moléculaire basé sur l'ARNr 16S. Les objectifs spécifiques de ce projet étaient les suivants. Il s'agissait d'abord d'évaluer la diversité bactérienne des biofilms de l'usine de pâte et papier de Domtar, Windsor par la méthode du PCR-DGGE pendant une période d'un an. La biodiversité de biofilms d'autres usines de pâtes et papiers du Québec a aussi été évaluée pour fins de comparaison. Ensuite, une génothèque des gènes de l'ARNr 16S devait être construite pour déterminer quels groupes de bactéries se trouvaient dans les biofilms. Finalement, un protocole de CARD-FISH a été optimisé afin d'observer et de quantifier certains des groupes de bactéries d'intérêt dans les biofilms de l'usine.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Techniques de fabrication de la pâte et du papier

2.1.1 Caractéristiques du bois

Lors de la fabrication de la pâte, plusieurs caractéristiques variables du bois déterminent de la qualité du papier résultant. Entre autres, il faut considérer l'espèce de bois utilisée, son pourcentage d'humidité, sa gravité spécifique, ses propriétés de forces de tension et de compression, la dimension de ses copeaux et sa susceptibilité au pourrissement lors de l'entreposage. De plus, l'écorce est un contaminant pour la fabrication de pâte puisqu'elle contient peu de fibres utilisables, consomme les produits chimiques lors des étapes de réduction en pâte et de blanchiment et cause des taches dans le papier. Cependant, le paramètre le plus conséquent est la composition chimique du bois : contenu en cellulose, hémicelluloses, lignine et produits d'extraction du bois. Ces critères varient selon l'espèce d'arbre utilisée. Cependant, selon le type de procédé de réduction de la pâte employé, tous les types de bois peuvent être utilisés pour le papier conventionnel (Biermann, 1996).

Selon Biermann (1996), « la pâte consiste en du bois, ou autre matériau lignocellulosique, qui a été dégradé physiquement et/ou chimiquement de façon à ce que des fibres plus ou moins distinctes soient libérées, puissent être dispersées dans l'eau et reformées sur une toile. » Cette dégradation se fait en général selon 2 types de procédés, soit TMP (pâte thermomécanique) et KRAFT. La description de ces procédés sera suivie du processus de blanchiment de la pâte et de la fabrication du papier.

2.1.2 Procédé thermomécanique (TMP) de réduction de la pâte

Comme son nom l'indique, ce procédé utilise seulement l'eau et la force mécanique pour dégrader les copeaux de bois en pâte. Celle-ci est fabriquée dans des raffineurs pressurisés à la vapeur. La première phase promeut la libération des fibres par une température (110-130°C) et une pression (207 kPa) (Smook, 1998) très élevée. Les raffineurs sont ensuite laissés au repos jusqu'à abaissement de la température, après quoi les fibres sont séparées des débris. Étant donné l'absence de produits chimiques pour la

dissoudre, la lignine est conservée dans la pâte (ce qui donne un meilleur rendement à ce procédé). La présence de lignine dans le papier cause le jaunissement de celui-ci après de longues expositions à l'air et au soleil. Le papier journal et le papier à magazine sont fabriqués selon le procédé TMP (Biermann, 1996).

2.1.3 Procédé chimique KRAFT de réduction de la pâte

La réduction de la pâte KRAFT est le processus dominant le domaine des pâtes et papiers. On y utilise du sulfure de sodium (Na_2S) et de l'hydroxyde de sodium (NaOH) à un pH de 12 et à une température de 160-180°C pendant 0,5 à 3 heures pour dissoudre efficacement la lignine (Biermann, 1996). Ensuite, la pâte est séparée de la liqueur blanche résiduaire (composés actif NaOH et Na_2S) et de la liqueur noire (lignine alcaline, sels d'hydrolyse, produits de sulfonation) pour être lavée. Les usines KRAFT récupèrent et régénèrent les produits chimiques et l'énergie contenus dans la liqueur noire. Celle-ci sera concentrée puis incinérée pour former un salin inorganique. Le salin dilué dans l'eau formera la liqueur verte qui sera soumise à une caustification avec de la chaux récupérée. Le résultat sera la liqueur blanche qui pourra réduire de nouveaux copeaux en pâte (Smook, 1998). Bien que cette technique soit dominante, elle entraîne des désavantages comme la difficulté à blanchir la pâte et les mauvaises odeurs engendrées par les émissions de soufre (figure 2.1) (Biermann, 1996). Le rendement est faible dû à la perte de lignine ; cependant, la présence de lignine donne un papier de mauvaise qualité comme dans le cas du papier fait avec la pâte TMP.

2.1.4 Blanchiment

La pâte, en particulier celle de type KRAFT, doit être blanchie avant d'être acheminée vers les presses. En effet, la pâte KRAFT a une couleur encore plus foncée que le bois d'origine à cause des groupements chromophores de la lignine qui ont été libéré lors de la cuisson. Ainsi, le but de cette étape est d'atteindre l'objectif entamé à la cuisson, soit la délignification.

Les étapes classiques du blanchiment sont le « CEDED » soit chloration, extraction alcaline, dioxyde de chlore, extraction alcaline et dioxyde de chlore. Cependant, de moins en moins d'usines appliquent l'étape de chloration au Cl_2 à cause du

caractère toxique et cancérigène des dioxines, furanes et composés organochlorés qui y sont engendrés (figure 2.1). Le Cl_2 peut être remplacé par le dioxyde de chlore (ClO_2), le peroxyde (H_2O_2) ou l'oxygène (O_2) (Smook, 1998).

2.1.5 Fabrication du papier

Avant d'arriver à la toile où la feuille sera formée, la pâte doit être préparée. Elle est fortement diluée (2 à 5%) dans l'eau et triturée, puis de multiples adjuvants y sont ajoutés. En effet, on aurait tort de penser que la cellulose est le seul composé organique de la pâte. Par exemple, des acides et des bases contrôlant le pH, des agents de collage, des charges qui améliorent les qualités optiques et l'imprimabilité, des colorants, de l'amidon, des gommes, des agents de rétention, des défloculants, des désémulsifiants et des biocides ne sont que quelques exemples des polymères naturels ou artificiels qui y sont mélangés (Smook, 1998).

Une machine à papier peut être divisée en 2 grandes sections : la partie humide et la partie sèche (figure 2.2). La pâte est entreposée et maintenue en suspension dans l'eau dans les cuiviers de tête et de pâte et poussée à un débit contrôlé par la vanne de grammage. Les adjuvants sont ensuite ajoutés à dose contrôlée au niveau de la pompe de mélange. Des épurateurs et des classeurs éliminent les impuretés et débris et empêchent la floculation de la pâte. Un répartiteur assure une distribution uniforme de la pâte dans la caisse d'arrivée sous pression, qui la distribue sur la toile en mouvement. La feuille formée est égouttée de son eau dans la section des presses puis séchée par évaporation. Avant d'être enroulée, la feuille est lissée par des rouleaux métalliques (Smook, 1998).

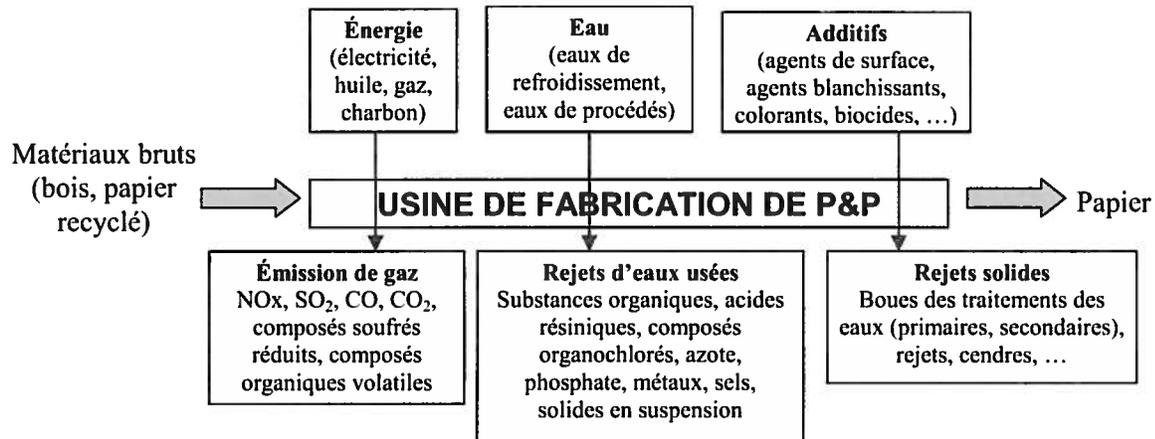


Figure 2.1 : Vue d'ensemble des courants de masses d'une usine de P&P. La présence de certaines substances dépend des matériaux bruts, du procédé de fabrication et des additifs utilisés, ainsi que de la source d'énergie de l'usine (Lacorte *et al.*, 2003).

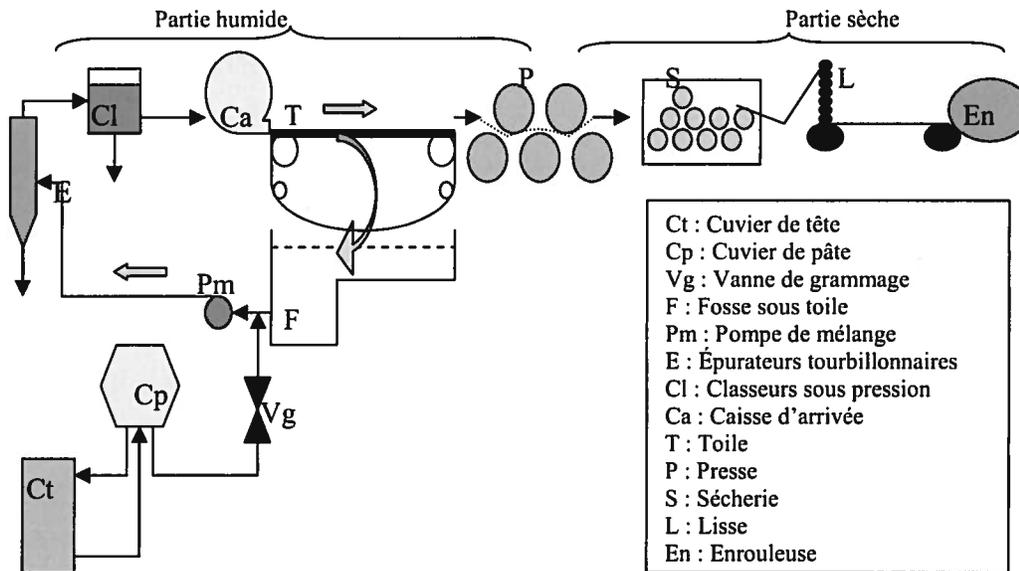


Figure 2.2 : Schéma simplifié d'une machine à papier. Adapté de Smook, 1998, p.244.

2.2 Usine de pâtes et papiers de Domtar, Windsor, Québec

La compagnie Domtar se situe parmi les 3 plus grands producteurs et distributeurs de papier en Amérique du Nord et a une capacité de production annuelle de 2,3 millions de tonnes de papier (Domtar, novembre 2006). L'usine située à Windsor, dans la région de

l'Estrie, Québec, a une capacité de production annuelle de 670 000 tonnes de papier (Domtar, 2008).

L'usine de Windsor produit, avec 2 presses (machines « 7 » et « 8 »), du papier de type impression (Domtar, 2008) à partir de feuillus divers (Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune, 2006). Leur pâte est fabriquée selon le procédé KRAFT et blanchie au ClO_2 . Ils utilisent environ 85 m^3 d'eau par tonne de papier produit (Domtar, novembre 2006).

2.2.1 Eau

L'alimentation en eau est le facteur clé de l'implantation d'une usine de pâte et papier. Il est impossible d'envisager la purgation de l'eau à chaque étape parce qu'elle est utilisée à toutes les étapes de fabrication. Ainsi, l'eau est redirigée dans le circuit de fabrication du papier (figure 2.2)., L'eau de la zone humide oscille entre 35 et 60°C à cause de la très haute température de la zone de séchage.

Dans le cas de l'usine de Domtar à Windsor, l'eau est pompée de la rivière St-François et subit un traitement sommaire visant la réduction des matières en suspension. Utilisée à tous les points de fabrication de la pâte et du papier, il est primordial de récupérer l'eau et l'énergie sous forme de chaleur. Un des exemples les plus simples est la récupération de l'eau sous la toile de la presse (figure 2.2) pour diluer la pâte au niveau de la pompe de mélange. L'eau peut aussi être récupérée à n'importe quelle étape pour servir lors des « bouissages » alcalins (du savon et un agent caustique sont ajoutés à de l'eau chauffée qui circulera dans la machine sous haute pression).

Une pression importante est appliquée sur les industries des pâtes et papiers pour réduire leur impact environnemental. Ainsi, des normes sévères régissent la quantité de polluants pouvant être rejetés dans la rivière. Puisque c'est l'usine, et non la municipalité, qui est responsable du traitement de ses effluents industriels, il est tout à son avantage de réduire le volume d'eau à traiter. C'est une des raisons pour lesquelles l'eau est utilisée et réutilisée de façon mesurée. De plus, lors de la formation de la feuille, seulement de 60 à 70% de la pâte est retenue sur la feuille. La balance est égouttée dans la fosse ; cette eau doit être retournée dans le procédé pour assurer un maximum de productivité (Lacorte *et al.*, 2003).

L'effluent industriel de Domtar, Windsor, subit divers traitements avant son rejet dans la rivière St-François. Les eaux résiduelles sont d'abord séparées dans un décanteur primaire. Le surnageant est neutralisé par les effluents de l'atelier de blanchiment (réutilisation du ClO_2) puis dirigé vers un bassin de sédimentation, une tour de refroidissement et enfin un bassin d'aération où il subit un traitement secondaire biologique. Les boues résultant de ce traitement biologique sont envoyées à un site d'enfouissement (EnvironnementCanada, 1996).

Cependant, la réutilisation de l'eau apporte des conséquences indésirables. Diverses sources de contaminants assurent la présence perpétuelle d'une flore microbienne dans les eaux blanches (eaux en recirculation). Les éclaboussements de pâte sur les parois en acier inoxydable des machines à papier permettent une sédentarisation de certaines espèces bactériennes présentes dans l'eau blanche et engendrent la formation de biofilms problématiques.

2.3 Biofilms

2.3.1 Description

Un biofilm est une communauté structurée de cellules bactériennes enclavées dans une matrice polymérique qu'elle a produite et adhérant à une surface inerte ou vivante. Les biofilms sont sessiles, mais peuvent libérer des cellules planctoniques qui se disperseront. Les cellules planctoniques sont susceptibles aux agents de stress de leur environnement, comme un antibiotique, un biocide ou prédateur. Ainsi, contrairement aux cellules sessiles du biofilm, il est plus aisé de les éliminer (Costerton *et al.*, 1999).

La plupart des microbiologistes sont d'accord avec le concept que la majorité des populations bactériennes de l'environnement sont retrouvées selon le phénotype de biofilm (Costerton *et al.*, 1995). La formation d'un biofilm est illustrée à la figure 2.3.

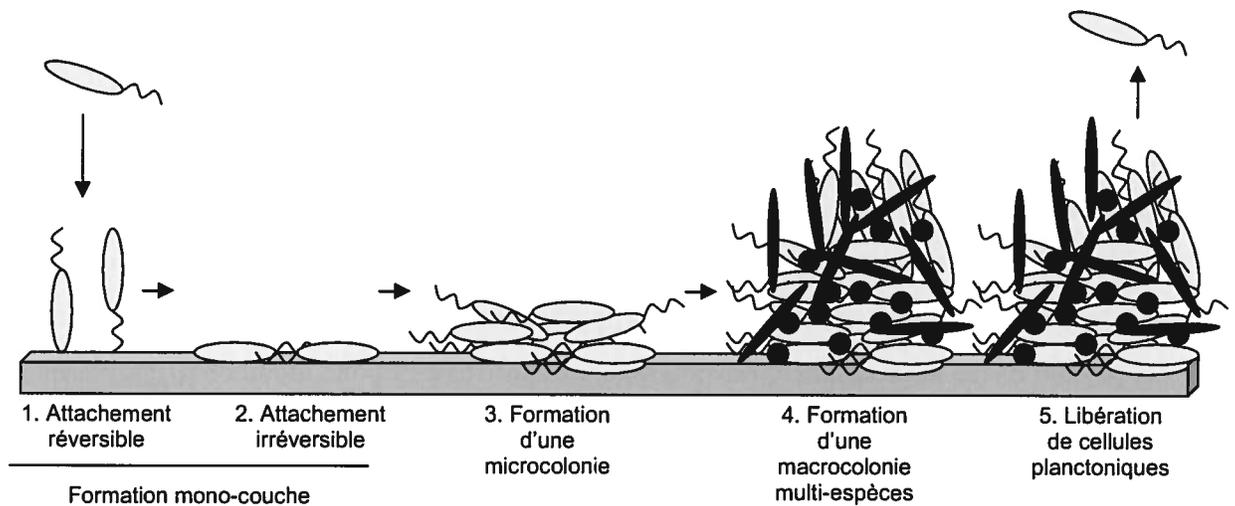


Figure 2.3 : Schéma de formation d'un biofilm multi-espèces. Adapté de Caiazza et O'Toole (2004) et Sauer *et al.* (2002).

Un biofilm peut se former lorsque des cellules planctoniques rencontrent des nutriments organiques. Ces cellules sont en état de famine ou de stress et sont présentes dans tous les écosystèmes (Costerton, 2007). Elles ne présentent pas le même profil de protéines produites que les cellules enclavées dans un biofilm (Sauer et Camper, 2001). L'attachement peut se faire sur une grande variété de surfaces et par une grande variété de types bactériens, mais une proportion importante de ces cellules se détachera de la surface quelques secondes après leur adhésion initiale. Même si les raisons pour lesquelles certaines cellules demeurent attachées et d'autres non restent nébuleuses dans les cas de biofilm multi-espèces (Costerton, 2007), des auteurs mentionnent que certains gènes modulent l'attachement irréversible chez *Pseudomonas aeruginosa* en culture pure, par exemple SadB, une protéine dont la fonction précise est inconnue à ce jour (Caiazza *et al.*, 2007, Caiazza et O'Toole, 2004). Les conditions environnementales modifient aussi le comportement des bactéries. Sheng et ses collaborateurs (2008) ont déterminé que la présence de nutriments dans le milieu diminuait les interactions bactéries-métal, tandis que l'augmentation de la force ionique et le passage de pH 7 à pH 9 augmentaient les interactions bactéries-métal.

La présence d'une source de carbone est le facteur déterminant à la croissance d'un biofilm et décidera de sa composition microbiologique et de sa physiologie. Si les cellules attachées de façon irréversible sont capables d'utiliser la source de carbone disponible pour leur croissance, elles pourront former une microcolonie. Ce sont les

souches bactériennes dites colonisatrices primaires. D'autres cellules planctoniques viendront enrichir le biofilm en coopérant métaboliquement avec les colonisatrices primaires ; les sources de carbones disponibles seront enrichies des sous-produits générés par la croissance bactérienne. Finalement, lorsque la source de carbone sera épuisée ou en présence d'un facteur de stress, des cellules retrouveront leur forme planctoniques et chercheront un nouvel emplacement opportun (Costerton, 2007). Lors de la formation du biofilm et de sa croissance, plusieurs gènes sont régulés pour moduler le comportement coordonné des bactéries lors de son cycle de vie, dans un processus reconnu sous le terme *quorum sensing* (De Kievit *et al.*, 2001).

Le mode de vie biofilm est répandu partout sur la planète, eaux et sols confondus. Plusieurs sont bénéfiques (la flore commensale du tractus gastro-intestinal, la biorémédiation de sols contaminés) mais certains sont à la source de problèmes anthropiques, comme les biofilms contaminant dans l'industrie agro-alimentaire et les ceux dans les poumons de patients souffrant de la fibrose kystique (De Kievit *et al.*, 2001). Une des caractéristiques les plus étudiées de ces biofilms problématiques est le niveau de résistance aux agents antimicrobiens des bactéries sessiles par rapport aux cellules planctoniques. Cela pourrait être expliqué par la grande diversité génétique retrouvée au sein d'un biofilm, même mono-espèce, qui assurerait la survie post-stress (Boles *et al.*, 2004). En effet, strictement parlant, les cellules d'un biofilm ne seraient pas plus résistantes que les cellules planctoniques, mais génèreraient des « cellules persistantes », de qui dépendrait cette tolérance nouvellement acquise (Spoering et Lewis, 2001). De plus, plusieurs agents antibactériens, entre autres des antibiotiques, ciblent les cellules en état de croissance rapide. Le fait que les cellules à l'intérieur d'un biofilm aient une vitesse de croissance lente joue sans doute un rôle dans la résistance des biofilms aux agents antimicrobiens (Lewis, 2001).

2.3.2 Incidence et composition des biofilms contaminants dans l'industrie des P&P

Les biofilms contaminants les machines à papier suscitent un intérêt car, comme pour les biofilms des autres industries, leur présence cause des pertes de productivité et une détérioration de la qualité du produit fini (odeur indésirable, coloration, contamination). Une machine à papier, plus particulièrement sa partie humide (figure

2.2), est un environnement favorable à la croissance bactérienne à cause de la température (35 à 60°C), de la présence de nutriments dans la pâte et des adjuvants utilisés (Blanco *et al.*, 1996, Vaisanen *et al.*, 1998). Puisque l'eau circule en circuit fermé et que la pâte est parfois entreposée pour une longue durée, l'activité biologique est accentuée au niveau de la partie humide (Chaudhary *et al.*, 1998).

La configuration des usines et le fonctionnement général des machines à papier rendent impensable la fabrication du papier de manière stérile. D'ailleurs, la plupart des bactéries présentes dans les eaux blanches n'influencent pas la qualité du papier ou le fonctionnement des machines. Cependant, lorsqu'elles sont capables de s'attacher à la surface disponible, l'acier inoxydable ou des débris de pâte, elles peuvent engendrer la production d'un biofilm épais et visqueux, appelé *slime* dans le jargon industriel. Ils deviennent si consistants qu'ils peuvent rapidement bloquer des tuyaux ou tomber sur la pâte en formation. L'arrêt de machines pour le nettoyage et le retrait du papier endommagé ainsi que l'utilisation de biocides baissent la productivité des usines de façon importante (Blanco *et al.*, 1996, Vaisanen *et al.*, 1998) ; les coûts peuvent aller jusqu'à 30 000\$ de l'heure pour une machine moderne (Kolari *et al.*, 2003).

Quelques groupes de recherche ont étudié la composition bactérienne des biofilms au cours des 2 dernières décennies. Plus particulièrement, le groupe de la Professeure Mirja Salkinoja-Salonen, Ph.D., à l'Université de Helsinki, Finlande, a publié au cours des dernières années plusieurs articles à ce sujet. Ils ont d'abord isolé, à partir de biofilms échantillonnés sur des machines à papier, près de 400 souches bactériennes. Les souches bactériennes isolées au cours des années appartiennent à de multiples genres, dont *Bacillus*, *Ralstonia* et *Burkholderia* (Vaisanen *et al.*, 1998) ainsi que *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, *Leptothrix* et l'espèce *Pseudoxanthomonas taiwanensis* (Suihko *et al.*, 2004). Ils ont aussi isolé plusieurs genres bactériens comme *Aureobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* à partir d'additifs utilisés dans la fabrication du papier. Ils ont ainsi démontré que les additifs sont une source de contamination car ces genres bactériens sont aussi retrouvés dans les biofilms. Plusieurs caractéristiques ont été étudiées chez les souches isolées, comme le potentiel à dégrader des matériaux bruts de la fabrication de papier, l'adhérence à l'acier inoxydable et le potentiel de biorisques de ces bactéries. Ils ont élaboré une base de données permettant de suivre la route de contamination des

microorganismes et le suivi des espèces potentiellement dangereuses pour les travailleurs des usines de P&P.

Ils ont aussi remarqué la prévalence, dans la section de la toile et des presses (figure 2.2), de biofilm rose/orangé, causés par des espèces de *Deinococcus*, *Aureobacterium*, *Brevibacterium* (Vaisanen *et al.*, 1998) et *Meiothermus* (Kolari *et al.*, 2003). Ils ont démontré que la persistance de diverses espèces de *Bacillus* dans les biofilms de machines à papier pourrait être due à leur capacité à se développer dans un biofilm formé par d'autres bactéries, notamment les espèces produisant des pigments rose/orangé comme *Deinococcus geothermalis* (Kolari *et al.*, 2001). Ils se sont par la suite intéressés de plus près à la production de biofilm par les espèces du genre *Meiothermus*. Par des expériences de PCR en temps réel, ils ont constaté que les espèces du genre *Meiothermus* étaient dominantes dans les biofilms d'usines de pâte et papier de 4 pays européens ; de $\leq 10^4$ à 10^{11} copies du gène de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S de *Meiothermus* par gramme de dépôt de procédé ont été trouvés (Ekman *et al.*, 2007). La plupart des projets nommés précédemment se sont concentrés sur l'isolement de bactéries en culture pure et la recherche de sources de contamination des usines. Un autre volet de leur recherche a été l'étude de la capacité d'adhésion et de production de biofilm des bactéries dans l'industrie des P&P, avec comme modèle d'étude de *Deinococcus geothermalis*. Cette bactérie est capable de former des biofilms et s'attache solidement et durablement sur l'acier inoxydable par ses pili de type IV (Saarimaa *et al.*, 2006). Grâce à un revêtement de TiO₂ photocatalytique, ils ont pu provoquer le détachement des pili avec une exposition à la lumière (Raulio *et al.*, 2006), ce qui pourrait être une bonne alternative aux biocides. Cependant, les cellules détachées pourraient former un nouveau biofilm ailleurs sur la machine.

De nombreux autres groupes de recherche ont étudié la formation des biofilms des usines de P&P après en avoir isolé des microorganismes. Oponng et ses collaborateurs (2000, 2003) ont aussi isolé des souches bactériennes produisant un pigment rouge/rose/orangé, appartenant aux genres *Micrococcus*, *Methylobacterium*, *Roseomonas*, *Deinococcus* et *Flectobacillus*, ainsi que d'autres bactéries filamenteuses comme *Flavobacterium* et *Cytophaga* ou sporulées comme *Bacillus* et *Paenibacillus*. De nombreux autres genres bactériens ont été retrouvés dans différentes usines de P&P du

monde, comme *Sphaerotilus* (Pellegrin *et al.*, 1999), *Thiobacillus*, *Aeromonas*, *Clostridium* et plusieurs espèces de champignons, de levures et d'algues (Blanco *et al.*, 1996).

Lahtinen et ses collaborateurs (2006) ont été les premiers dans le domaine des P&P à publier une étude de la diversité bactérienne de biofilms d'usines de P&P par des méthodes de biologie moléculaire (section 2.4.2) : séquençage d'environ 70 clones et analyse de l'hétérogénéité de la longueur des gènes de l'ARNr 16S des souches présentes. Outre la diversité bactérienne variable d'un point d'échantillonnage à l'autre, ils ont déterminé que plus de la moitié des clones appartenaient aux Alphaprotéobactéries, et étaient plus précisément affiliés à *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Azorhizobium*.

2.3.3 Traitements utilisés

Pour dégager les biofilms, des « bouissages » alcalins sont appliqués. Ces derniers permettent de contrer la formation d'écailles et de dépôts inorganiques ainsi que de retirer les additifs lorsque l'on modifie le type de papier produit. De plus, des biocides organiques et inorganiques sont utilisés de la même manière que les autres additifs, c'est-à-dire par l'ajout constant de petits volumes à travers la pompe de mélange (figure 2.2). Les types de biocides les plus utilisés sont listés ci-dessous (Chaudhary *et al.*, 1998).

- Chlore et composés organochlorés
- Composés organosoufrés
- Composés organobromés
- Composés organophosphorés et phénoliques
- Composés d'ammonium quaternaire
- Isothazolones
- Mélange de différents biocides

L'usine de Domtar, Windsor, utilise présentement l'isothiazolin, le 2,2-dibromo-3-nitropropionamide (DBNPA) et l'hypochlorite de sodium (Véronique Prince, Nalco, communication personnelle). Cependant, les usines de P&P sont parfois contraintes de changer de biocides lorsque l'efficacité baisse et que les microorganismes développent une résistance. En effet, plusieurs souches productrices de biofilm isolées d'usines de P&P voient leur production de biofilm augmentées de 5 à 753% en présence de biocides, ce qui suggère que ces molécules accentuent la contamination des surfaces (Kolari *et al.*,

2003). Qui plus est, une concentration trop élevée de biocides entraîne des effets néfastes sur la microflore du traitement secondaire de l'effluent (Chaudhary *et al.*, 1998).

Même si plusieurs usines, dont celle de Domtar, Windsor, incluent un traitement secondaire pour l'eau avant de la rejeter dans un cours d'eau, des composés résiduels peuvent persister. Ceux-ci ne seront pas nécessairement détectés car on ne connaît pas tous les résidus pouvant être générés au cours du processus de fabrication du papier ; l'eau blanche est un mélange très complexe. Les biocides et les *slimicides* utilisés n'échappent pas à cette réalité. En effet, une fraction de ces molécules sera dégradée (chimiquement ou biologiquement), une fraction demeurera dans les eaux circulantes et une fraction sera ultimement présente dans l'effluent ou la matière solide à enfouir. Les effluents déchargés dans les eaux douces par les usines de P&P vont altérer les habitats aquatiques et éventuellement pourront avoir un impact sur la santé humaine (Lacorte *et al.*, 2003).

Une alternative complétant l'utilisation des biocides est l'ajout de levanases dissolvant la *slime*, c'est-à-dire la matrice exopolymérique sécrétée par les microorganismes. La fragilisation de la *slime* par ces enzymes permettrait d'exposer les cellules aux biocides qui seraient alors utilisés en moindres concentrations (Chaudhary *et al.*, 1998). Cependant, les résultats obtenus ne seraient pas constants (Klahre et Flemming, 2000). D'autres approches visant la diminution de l'utilisation des biocides doivent donc être explorées.

2.3.4 Approche de la lutte biologique

Spécialiste de la lutte biologique par les Actinomycètes, Carole Beaulieu, Ph.D., professeure titulaire à l'Université Sherbrooke, a utilisé cette stratégie pour solutionner le problème de la gale commune de la pomme de terre (Université de Sherbrooke, 2008). La recherche sur l'utilisation de microorganismes pour inhiber la croissance d'un autre microorganisme pathogène a fait un bond dans les dernières décennies, non seulement dans le domaine de la phytopathologie, mais aussi en industrie, comme par exemple pour inhiber la croissance de microorganismes induisant la corrosion du métal (Zuo, 2007) ou étant pathogènes pour l'humain (Zhao *et al.*, 2004).

Cette stratégie est appliquée à l'Université de Sherbrooke pour enrayer les problèmes de biofilms à l'usine de Domtar, Windsor. Depuis 2001, 6 étudiants ont contribué à ce projet. L'équipe du Pr Beaulieu a d'abord voulu connaître la composition microbiologique de ces biofilms par isolements en culture pure. Une centaine de souches bactériennes a été isolée par Élyse Desjardins. Les genres prédominant l'eau blanche et les biofilms étaient *Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Microbacterium* (Desjardins et Beaulieu, 2003). Ensuite, le profil métabolique des communautés bactériennes colonisant les caisses d'arrivée des deux machines à papier a été étudié par plaques Biolog Ecoplates pendant 1 an par Johnny Kashama. Une analyse à deux composantes a montré que le profil métabolique ne variait pas d'une machine à l'autre mais variait légèrement d'un mois à l'autre, avec une variation notable au mois de juillet.

La mise en culture d'échantillons environnementaux sélectionne les bactéries aptes à croître dans les conditions de l'expérience. Toutefois, il est reconnu qu'une vaste proportion des microorganismes ne peut être identifiée par les techniques de culture (section 2.4). Véronique Prince a utilisé la technique de l'ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) pour caractériser la communauté bactérienne de l'eau blanche de la caisse d'arrivée à deux moments de l'année. L'ADN total de la biomasse recueillie a été extrait, représentant ainsi la diversité microbienne à l'instant de l'échantillonnage. Ensuite, les gènes de l'ARNr 16S ont été amplifiés, clonés et séquencés afin de déterminer l'affiliation phylogénique la plus probable des bactéries de la caisse d'arrivée (tableau 2.1). Le genre dominant les eaux blanches à ces moments de l'année 2006 est clairement *Meiothermus*, avec plus de la moitié des clones. Les genres *Schlegelella/Leptothrix* suivent ensuite avec plus du tiers de clones. On remarque un pourcentage assez faible de *Pseudoxanthomonas* par rapport aux résultats préliminaires en culture pure (Desjardins et Beaulieu, 2003). Le genre *Tepidimonas* semble avoir subi une forte variation entre l'hiver et l'été.

Les travaux de Véronique Prince ont montré l'importance des organismes non cultivables lorsqu'un consortium environnemental est à l'étude. En effet, une grande proportion des clones représente des genres bactériens n'ayant pas encore été isolés en culture pure à partir d'échantillon de l'usine de Domtar, Windsor.

Tableau 2.I : Affiliation phylogénique de clones provenant de l'eau de la caisse d'arrivée d'une machine à papier canadienne en février et juillet 2006.

Genre bactérien	Proportion des clones (%)	
	Février 2006	Juillet 2006
<i>Geobacillus</i>	0,5	1,0
<i>Hydrogenophilus</i>	0,0	0,5
<i>Meiothermus</i>	44,0	34,5
<i>Pseudomonas</i>	13,0	9,0
<i>Pseudoxanthomonas</i>	3,5	10,0
<i>Rhizobium</i>	0,5	0,0
<i>Schlegelella/Leptothrix</i>	36,5	19,0
<i>Tepidimonas</i>	2,0	26,0

Source : Véronique Prince, Université de Sherbrooke

François Chabot a poursuivi ses travaux sur la lutte biologique. Il a déterminé, parmi les souches isolées par Élyse Desjardins et Johnny Kashama, lesquelles étaient des souches primaires capables d'attachement irréversible (section 2.3.1), et quel était leur niveau de production de biofilm. Il a ensuite recherché, toujours parmi la banque de souches, des souches dites antagonistes aux souches primaires. Ces souches sont capables d'inhiber l'attachement et la production de biofilms par les souches primaires. Il a déterminé que 86% des souches isolées sur la machine à papier produisent peu ou pas de biofilms mais que plusieurs de ces souches peuvent ralentir ou inhiber la croissance des 4 meilleures productrices primaires.

2.4 Étude des microorganismes non cultivables

2.4.1 Caractéristiques

La microbiologie est la branche de l'étude des êtres vivants ayant le plus évolué au cours du dernier siècle. Bien qu'autrefois la croyance générale voulût que la plupart des microorganismes puissent croître dans un bouillon ou sur une gélose, ce leurre est aujourd'hui disparu du milieu scientifique. On sait qu'en fait rares sont les

microorganismes cultivables ; des pourcentages de 0,001 à 15% ont été avancés pour plusieurs environnements comme l'eau, le sol et la terre (Amann *et al.*, 1995).

Lorsque les bactéries sont cultivées en conditions contrôlées, il y a perte de l'expression de certains gènes ; aucune souche de laboratoire ne donc peut être représentative de son espèce (Fux *et al.*, 2005), ce qui limite l'extrapolation des résultats obtenus en laboratoire. Cela devient particulièrement problématique dans le cas des biofilms, plus particulièrement dans la recherche de molécules pour les enrayer. La mise en culture de consortiums ou biofilms favorise non seulement la croissance d'un faible pourcentage des espèces présentes, mais pourrait éliminer, par exemple, les bactéries qui sont capables de l'adhésion à une surface (Ehrlich *et al.*, 2005).

Sachant qu'une mince proportion des microorganismes se reproduisent en conditions contrôlées et que le métabolisme « de laboratoire » peut grandement différer du métabolisme de survie, des efforts soutenus ont été mis en branle pour élaborer des méthodes alternatives aux cultures pures.

2.4.2 Génothèque 16S et électrophorèse sur gel à gradients d'agents dénaturants (DGGE)

Depuis plus de 2 décennies, les microbiologistes environnementaux se basent surtout sur l'ARNr pour analyser la diversité microbienne d'un échantillon donné. La sous-unité 16S du ribosome est un bon outil car ses ~1500 nucléotides permettent l'affiliation phylogénique du microorganisme (Amann *et al.*, 1995).

La création de génothèques du gène de l'ARNr 16S est devenue de routine pour plusieurs microbiologistes environnementaux. Grâce à la technique de PCR, il est possible d'amplifier le gène de l'ARNr 16S, de ligaturer l'amplicon obtenu sur un plasmide et de transformer une bactérie hôte, comme *Escherichia coli*. Il suffit ensuite d'isoler et de faire séquencer cet amplicon pour connaître la séquence exacte du gène de l'ARNr 16S. C'est de cette façon que plusieurs embranchements bactériens ont été créés (Hugenholtz *et al.*, 2001).

Dû au caractère fastidieux des banques de clones, des méthodes de suivi de la flore microbienne ont été développées. Une technique très utilisée est le DGGE (électrophorèse sur gel à gradient d'agents dénaturants). Une paire d'amorces ciblant des

séquences universelles bordant la région variable (V3) du gène de l'ARNr 16S (Muyzer *et al.*, 1993) est utilisée pour amplifier tous les gènes 16S de l'échantillon à l'étude. Une des amorces est munie d'une pince riche en GC. Les amplicons d'une même longueur n'auront toutefois pas la même composition en nucléotides. Ces amplicons seront ségrégués sur un gel de polyacrylamide à gradient de 2 agents dénaturant l'ADN, l'urée et le formamide. La capacité de l'amplicon à migrer dans le gel sans être complètement dénaturé devient dépendante, entre autres, de sa composition en GC. Ainsi, il est possible d'évaluer la diversité microbienne d'un échantillon donné en évaluant le nombre de bandes pour un même échantillon. Cette technique a été utilisée pour des projets très diversifiés, dont la recherche de mutations dans des gènes particuliers (Sheffield *et al.*, 1989), l'étude des picoeucaryotes marins (Diez *et al.*, 2001) et le suivi de la population bactérienne dans un bioréacteur au cours du temps (Labbe *et al.*, 2003).

2.4.3 Hybridation fluorescente in situ (FISH)

Quoique la détermination des gènes de l'ARNr 16S permette l'identification d'espèces bactériennes non cultivables, ces séquences ne donnent aucune indication de la forme des cellules, du contexte environnemental et de leur concentration dans le consortium où elles évoluent. Cependant, ces séquences 16S permettent le développement de sondes spécifiques à une souche, à son espèce, son genre ou aux niveaux taxonomiques supérieurs si désiré (Amann *et al.*, 1995).

La sonde est un oligonucléotide dont la séquence est complémentaire à une région de l'ARNr. L'oligonucléotide est couplé à une molécule fluorescente et est utilisé selon une technique dite d'hybridation *in situ* (FISH), qui permet de visualiser par microscopie fluorescente les bactéries ciblées par la sonde. Une base de données appelée probeBase (Loy *et al.*, 2007) a été mise sur pied. Elle divulgue la séquence de tous les oligonucléotides ayant été utilisés comme sonde aux cours de recherches précédentes. Il existe des sondes très spécifiques dans le cas où un organisme en particulier est recherché et des sondes à large spectre, utiles pour avoir une idée générale de la composition de l'échantillon.

Cette méthode a été utilisée dans de nombreuses études publiées pour identifier les différentes espèces d'un même genre (Amann *et al.*, 1990b), quantifier les différentes

bactéries présentes dans un échantillon donné (Juretschko *et al.*, 2002) ou encore évaluer la distribution des différents phylotypes à l'intérieur d'un biofilm (Nubel *et al.*, 2002).

La technique de FISH conventionnelle s'est grandement développée depuis qu'elle a vu le jour à la fin des années 80. Différentes équipes de recherche ont tenté de contourner ses principaux inconvénients, entre autres le fait que le signal obtenu est proportionnel à la quantité de ribosomes de la cellule, donc aux conditions de croissance auxquelles les microorganismes sont exposés. Une des conséquences de cet inconvénient est l'émission d'un signal par une proportion des cellules et non la totalité. De plus, le fait que certaines cellules puissent avoir un meilleur signal que d'autres impose obligatoirement une limite à la quantification.

Plusieurs idées ont été mises de l'avant pour esquiver la faiblesse du signal obtenu par rapport au bruit de fond, comme par exemple l'utilisation de plusieurs sondes ciblant des régions spécifiques différentes d'un même phylotype pour multiplier le signal (Amann *et al.*, 1990b) et l'ajout d'un traitement au chloramphénicol pour augmenter le contenu ribosomal (Ouverney et Fuhrman, 1997). Une autre complication rencontrée par plusieurs chercheurs est l'inaccessibilité du ribosome dû aux repliements des ARNr. Le signal a pu être amélioré en utilisant des sondes auxiliaires sans fluorochromes (*helper probe*) qui se lient à des sites adjacents (Fuchs *et al.*, 2000) et en tentant de prédire la conformation spatiale du ribosome procaryote pour mieux orienter la conception des sondes (Behrens *et al.*, 2003).

Le développement de la technique de CARD-FISH (rapporteur de dépôts catalytiques en hybridation fluorescente *in situ*) (Schonhuber *et al.*, 1997) a grandement facilité la détection de cellules au faible contenu ribosomal. Sa particularité est que l'oligonucléotide est couplé à l'enzyme HRP (peroxydase de raifort). Après son hybridation aux cellules fixées, la tyramide couplée à un fluorochrome, le substrat de l'enzyme, est ajouté à la préparation. La conséquence de la réaction enzymatique sera le dépôt de fluorochromes dans les cellules arborant sur le ribosome la séquence complémentaire à la sonde. Ces fluorochromes formeront des liens covalents, via la tyramide, avec les résidus protéiques de la cellule (Pernthaler et Pernthaler, 2007). Étant donné qu'une seule enzyme peut scinder plusieurs molécules de tyramide, le signal sera amplifié et par conséquent normalisé lorsque la préparation sera visualisée au microscope.

L'étape critique du CARD-FISH est la perméabilisation des cellules. En effet, le protocole utilisé doit permettre la diffusion de la HRP, une enzyme de 44 kDa, à laquelle est lié l'oligonucléotide. La façon conventionnelle de préparer les cellules pour une hybridation en CARD-FISH est une incubation dans une solution de lysozyme. Des variantes peuvent être apportées dépendamment du type de bactéries visualisées. Par exemple, l'on peut faire l'ajout d'achromopeptidase pour les bactéries à Gram-positif et de protéinase K pour les Archaea (Pernthaler et Pernthaler, 2007).

Bien que la méthode du FISH ait déjà été utilisée dans l'étude des biofilms contaminant les industries des P&P (Torres *et al.*, 2008), aucune publication ne décrit l'application d'un protocole de CARD-FISH pour quantifier des groupes phylogéniques bactériens.

2.5 Problématique, hypothèse et objectifs du projet

L'usine de production de pâte et papier de Domtar située à Windsor, Québec, produit plusieurs tonnes de papier par année et utilise l'eau d'une rivière adjacente pour la totalité de ses procédés. L'eau blanche résultante subit des traitements physique et biologique avant d'être rejetée dans la rivière, afin de respecter les normes environnementales. Dans le but de réduire le volume d'eau devant être traité, elle est réutilisée par recirculations dans la machine à papier. Une biomasse bactérienne diversifiée s'y développe car l'eau blanche contient une quantité importante de cellulose, d'hémicelluloses et d'adjuvants divers. Il y a par conséquent possibilité d'attachement à l'acier inoxydable et de formation de biofilms à une température variant de 35 à 50°C. En altérant la qualité du papier en formation, en accélérant la corrosion du métal et en bloquant les tuyaux, ces biofilms réduisent le rendement des machines à papier. Des biocides sont utilisés pour contrer le problème du développement bactérien ; cependant, cela engendre des coûts économiques et environnementaux importants, et n'apporte pas les résultats escomptés.

Par une collaboration de Carole Beaulieu et Ryszard Brzezinski de l'Université Sherbrooke et Richard Villemur de l'INRS-Institut Armand-Frappier, l'objectif général de ce projet est d'isoler des microorganismes indigènes capables d'inhiber l'attachement des microorganismes primaires (initialement responsables de la formation des biofilms).

La contribution du laboratoire du Pr Villemur est de caractériser et de faire un suivi de la diversité bactérienne du biofilm.

L'hypothèse de départ était que le suivi de la diversité bactérienne pourrait être effectué à l'aide d'outils de biologie moléculaire basé sur l'ARNr 16S. Les objectifs spécifiques de ce projet étaient les suivants. Il s'agissait d'abord d'évaluer la diversité bactérienne des biofilms de l'usine de pâte et papier de Domtar, Windsor par la méthode du DGGE pendant une période d'un an. Ensuite, une génothèque des gènes de l'ARNr 16S devait être construite pour permettre la conception de sondes spécifiques aux groupes bactériens d'intérêt. Finalement, un protocole de CARD-FISH devait être optimisé afin d'observer et de quantifier ces bactéries dans les biofilms de l'usine.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Techniques de biologie moléculaire

3.1.1 Extraction de l'ADN du biofilm et de souches pures

L'extraction de l'ADN a été faite par la même méthode pour les biofilms et les souches pures à quelques exceptions près.

Pour les biofilms, un échantillon d'environ 0,5 cm³ a été transféré dans un microtube de 1,5 mL contenant 0,250 g de billes de verre 0,25-0,50 mm de diamètre (*Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada*). Dans le cas des souches pures, 500 µL d'une suspension bactérienne très concentrée ont été transférés dans un microtube de 1,5 mL contenant aussi 0,250 mg de billes de verre. Environ 0,5 volume de TEN (Tris-HCl (*Fisher Scientific*) 50 mM, EDTA (*Fisher Scientific*) 100 mM, NaCl (*Fisher Scientific*) 150 mM, pH 8,0), 10 µL de sodium dodécyl sulfate (SDS) (*Fisher Scientific*) 20% et 1 volume de phénol (*Fisher Scientific*) : chloroforme (*Fisher Scientific*) : alcool isoamylique (*A&C Produits Chimiques Américains, Montréal, QC, Canada*) (25 : 24 : 1) ont été ajoutés.

Le contenu des tubes a été broyé dans un appareil FastPrep FP120 (*Thermo Savant, Holbrook, NY, É.-U.*) 2 fois à la vitesse 6 pendant 30 secondes. Après 15 minutes de centrifugation à 13 000 rpm, le surnageant a été transféré dans un autre tube. Pour les extractions d'ADN du biofilm, 250 µL de TEN ont été ajoutés aux tubes avec les billes de verre. Un deuxième broyage a été appliqué sur le biofilm, et après centrifugation de 15 minutes à 13 000 rpm, les surnageants ont été combinés.

Ensuite, 1 volume de chloroforme : alcool isoamylique (49 : 1) a été ajouté aux surnageants puis les tubes ont été agités par inversion. Après une centrifugation de 1 minute à 13 000 rpm, les surnageants ont été transférés dans un tube propre contenant 2 volumes d'éthanol (*Éthanol Greenfield Inc., Brampton, ON, Canada*) 100% et ¼ de volume d'acétate d'ammonium 10M (*A&C Produits Chimiques Américains*). Après agitation, les tubes ont été placés à -20°C pendant 1 à 16 heures.

Après 15 minutes de centrifugation à 13 000 rpm, le surnageant a été rejeté et le culot a été lavé avec de l'éthanol 70%. Après avoir décanté l'éthanol, les culots sont séchés sous hotte laminaire et sont dissous dans 50 µL d'eau. La concentration d'ADN a été estimée par 3 prises de densité optique par un appareil NanoDrop ND-1000

Spectrophotometer (*NanoDrop Products, Wilmington, DE, É.-U.*). Les extractions ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose (section 3.1.2).

3.1.2 Électrophorèse sur gel d'agarose

Toutes les extractions d'ADN et les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel de 0,5 à 2% d'agarose (*Invitrogen, Grand Island, NY, É.-U.*) dans un tampon TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, acide acétique 40 mM (*Fisher Scientific*), EDTA 1mM).

Pour les vérifications, 5 μ L du produit d'extraction d'ADN ou de produit de PCR ont été déposés par puits, sans égard à leurs concentrations. Un tampon de chargement a été utilisé à une concentration finale de 30% v/v glycérol (*Fisher Scientific*), 0,25% p/v xylène cyanol (*Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada*) et 0,25% p/v bleu de bromophénol (*Sigma-Aldrich*). Deux marqueurs d'ADN de poids moléculaire différents ont été utilisés, soit « Échelle de poids moléculaire de 100 pb » (*Promega, Madison, WI, É.-U.*) et l'ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme *StyI* (*Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada*). Les gels ont été colorés dans une solution de bromure d'éthidium (*Sigma-Aldrich*) d'environ 10 μ g/mL et visualisés sous rayons ultraviolets dans un appareil AlphaImager™3400 (*Alpha Innotec Corporation, San Leandro, CA, É.-U.*).

3.1.3 Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Chaque PCR contenait : 5 unités de Taq polymérase (*GE Healthcare, Chalfont St.Giles, UK*), 0,4 mg/mL de albumine sérique bovine (BSA) (*Sigma-Aldrich*), 200 μ M dNTP (*Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada*), une concentration variable d'amorces (voir tableau 3.1) et environ 2 ng/ μ L d'ADN, le tout dans le tampon « 1X PCR Buffer » (*GE Healthcare*). Toutes les amorces ont été synthétisées par la compagnie Alpha DNA (*Montréal, QC, Canada*). Les PCR ont été faits dans une machine GeneAmp®PCR System 2700 (*Applied BioSystems, Foster City, CA, É.-U.*) ou RoboCycler Gradient 96 (*Stratagene, La Jolla, CA, É.-U.*). Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (section 3.1.2).

3.1.4 Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)

Les gels ont été faits à partir d'une solution de polyacrylamide (acrylamide : bis N,N'-méthylène-bis-acrylamide ; 37,5 : 1) (*Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, É.-U.*) à 40% filtrée sur 0,45 µm (*Fisher Scientific*). Le gel à 0% de dénaturant contenait 8% de la solution de polyacrylamide dans un tampon TAE 1X, solution passée sur un filtre de 0,45 µm. Le gel à 100% de dénaturants contenait 8% de la solution de polyacrylamide, 40% (v/v) de formamide (*Fisher Scientific*) déionisé et 7M d'urée (*Bio-Rad Laboratories*) dans du tampon TAE 1X, solution filtrée sur 0,45 µm. Ces solutions ont servi à faire les solutions avec le gradient désiré pour le gel (par exemple, 20% à 70%). Elles ont été dégazées sous vide pendant 15 minutes avant que le gel à gradient de dénaturants ait été coulé. Avant de couler un gel, 5 µL de persulfate d'ammonium (*Bio-Rad Laboratories*) 10% (p/v) par mL de solution de gel et 0,5 µL de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (*Bio-Rad Laboratories*) par mL de solution de gel ont été ajoutés.

Pour déterminer le volume de produit de PCR fait avec les amorces 341F-GC et 534R (tableau 3.1) à charger dans le gel, le programme AlphaImager™3400 (*Alpha Innotec Corporation*) a été utilisé. Ainsi, le volume d'ADN à charger (entre 25 et 40 µL) a été relativisé en fonction de l'intensité de la bande de produit de PCR obtenue sur gel d'agarose. L'électrophorèse a été effectuée dans un tampon TAE 1X à 60°C et 100 V pendant 16 heures. Les gels ont été colorés et visualisés tel que décrit à la section 3.1.2.

3.1.5 Extraction d'ADN sur gel de polyacrylamide

Certaines bandes ont été extraites de gels de DGGE. Elles ont été découpées du gel de polyacrylamide sur un appareil « Electronic UV Transilluminator » (*UltraLum Incorporated, Claremont, CA, É.-U.*) et placées individuellement dans un tube de 1,5 mL.

Un volume de 500 µL de tampon d'éluion (0,5 M acétate d'ammonium, 10 mM acétate de magnésium tétrahydraté, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% SDS) a été ajouté à chaque tube puis les morceaux de polyacrylamide ont été écrasés à l'aide d'un pilon. Les tubes ont ensuite été placés dans un support rotatif à 37°C pendant 3 heures. Ensuite, ils ont été centrifugés 13 000 rpm pendant 1 minute et le surnageant a été retiré. Puis, 250 µL de tampon d'éluion frais ont été ajoutés aux morceaux de polyacrylamide. Après une brève agitation et centrifugation, les surnageants (le premier, 500 µL, et le deuxième,

250 µL) ont été combinés. L'équivalent de 2 volumes d'éthanol 100% a été ajouté et les tubes ont été placés à -20°C pendant 16 heures. Après 10 minutes de centrifugation à 13 000 rpm, le surnageant a été décanté et les culots ont été suspendus dans 200 µL d'eau milli-Q, 0,04 volume d'acétate de sodium 3M pH 5 et 2 volumes d'éthanol 100%. L'ADN a précipité pendant 1 heure à -80°C.

Après une centrifugation de 13 minutes à 13 000 rpm, le surnageant a été décanté, les culots ont séché sous hotte laminaire et l'ADN a été dissous dans 15 µL d'eau. Pour vérifier la présence d'ADN et en vue du séquençage, un PCR (section 3.1.3) avec les amorces 341F et 534R (tableau 3.1) a été fait sur chaque échantillon.

3.2 Élaboration d'une génothèque du gène de l'ARN ribosomal 16S

3.2.1 Échantillonnage des biofilms

Tous les échantillonnages qui ont été faits pour ce projet l'ont été selon le même protocole. François Chabot, de l'Université de Sherbrooke, s'est rendu à l'usine de Domtar plusieurs fois au cours de l'année 2007 et a procédé comme suit : prise de 2 échantillons par machine (machines 7 et 8), déposés dans des tubes de 1,5 mL puis dans la glace sèche et récolte de 2 ou plusieurs échantillons par machine déposés dans des tubes de 15 mL remplis de glycérol (*Fisher Scientific*) à 15% puis dans la glace sèche. La première série est pour extraction d'ADN (section 3.1.1) et la seconde pour fixation des cellules (section 3.3.1). La glacière contenant tous les tubes a été expédiée à Laval par courrier rapide et les échantillons ont été transférés à -80°C dès leur réception.

3.2.2 Purification des produits de PCR, ligature et transformation

L'ADN a été extrait de 4 échantillons récoltés au mois de janvier 2007, soit les échantillons J1(7.1), J2(7.2), J3(8j) et J4(8v), selon la méthode décrite à la section 3.1.1. Ensuite, un PCR avec les amorces 8F et 1541R (tableau 3.1) a été fait selon la méthode décrite à la section 3.1.3. Les produits de PCR ont été purifiés par une précipitation avec 0,1 volume d'acétate de sodium 10M et 2 volumes d'éthanol 100% pendant 16 heures à -20°C. Après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 15 minutes, le culot a été dissous dans 20 µL d'eau milliQ.

La ligature s'est faite avec le vecteur pGEM-T Easy Vector Systems (figure 3.1) selon les instructions du manufacturier (*Promega*). Dans un microtube stérile de 0,5 mL, 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase, 1 µL de pGEM Vector, 1 µL de T4 DNA Ligase (*Promega*) et 3 µL de produit de PCR décrit ci-haut ont été déposés. Après 1 heure à température pièce, les tubes ont été placés à 4°C pendant 20 heures. Ensuite, 3 µL de cette solution de ligature a été ajoutée à 50 µL de cellules compétentes DH5α (*Escherichia coli* DH5α F-Φ80/*lacZ*ΔM15Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (*r_k⁻, m_k⁺*) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-*) (*Invitrogen*). Après des transferts rapides commençant par 20 minutes sur glace, suivi de 45-50 secondes à 42°C puis 2 minutes sur glace, 950 µL de milieu Luria-Bertani (LB) (1% p/v Bactotryptone, 0,5% p/v Bactoyeast Extract, (*Bacto Laboratories, New South Wales, Australia*) 0,5% p/v NaCl) ont été ajoutés. Après 90 minutes à 37°C avec agitation, 100 µL ont été déposés sur gélose LB/amp/IPTG/Xgal (ampicilline (*ICN Biomedicals, Orsay, France*) 0,1 mg/mL, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (*Fisher Biotech*) 0,05M, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (*Fisher Scientific*) 0,004%) à raison de 4 géloses par échantillon (7.1, 7.2, 8j et 8v).

3.2.3 Sélection des clones, extraction plasmidique et criblage

Parmi les 4 géloses par échantillon, 46 colonies blanches (transformants avec insert) et 2 colonies bleues (transformants sans insert) ont été repiquées pour croissance en milieu liquide LB afin d'en extraire les plasmides. Après 16 à 18 heures de croissance à 37°C avec agitation, 1,5 mL ont été transférés dans un microtube et centrifugés à 13 000 rpm pendant 1 minute. Les culots ont été suspendus dans 100 µL de tampon TE (Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 10mM). Ensuite 200 µL d'une solution de lyse (NaOH (*Fisher Scientific*) 0,2M, SDS 1%) ont été ajoutés et les tubes ont été mélangés 10 fois par inversion. Enfin, 150 µL d'acétate de potassium 3M pH 5,5 ont été ajoutés et les tubes ont été mélangés 5 fois par inversion.

Les tubes ont ensuite été centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm. Un traitement au phénol : chloroforme : isoamyl (25 : 24 : 1) a permis la séparation des protéines des acides nucléiques. Un traitement subséquent à la RNase (*USB, Cleveland, OH, É.-U.*) (concentration finale de 10 µg/mL) de 15 minutes à température pièce a permis

l'élimination de l'ARN. Finalement, l'ADN a été précipité dans 2 volumes d'éthanol 100% pendant 15 minutes à -20°C. Après une centrifugation à 13 000 rpm de 10 minutes et le séchage du culot, les plasmides ont été dissous dans 50 µL d'eau milliQ. L'extraction a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (section 3.1.2) pour s'assurer que toutes les colonies blanches soient porteuses d'un insert dans leur plasmide.

Avant de faire séquencer les inserts, un criblage a été fait pour savoir lesquels étaient identiques. Dans un microtube, 1 µL de tampon 10X, 1 µL de BSA, 0,5 µL des enzymes de restriction *EcoRI* 12 U/µL et *AfaI* 10 U/µL (*Amersham Biosciences*) et 7 µL d'ADN extrait des clones ont été incubés à 37°C pendant 16 heures. L'enzyme *EcoRI* a servi à dégager l'insert du plasmide (voir figure 3.1) et l'enzyme *AfaI* à couper dans l'insert. Le résultat de la digestion a pu être visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (section 3.1.2).

3.2.4 Séquençage et analyse phylogénique

Les clones représentatifs, sélectionnés par criblage, ont été envoyés au Centre d'Innovation Génome Québec (*Montréal, QC, Canada*) pour que leurs inserts soient séquencés. Tout d'abord, un PCR avec les amorces SP6 et T7 a été fait sur ces clones (section 3.1.3, tableau 3.1). Ces amorces ont été sélectionnées puisque leurs séquences complémentaires se trouvaient aux abords de l'insert dans le plasmide utilisé (figure 3.1).

Les séquences générées par Génome Québec ont été analysées et corrigées avec le logiciel *Chromas Lite* version 2.01 (www.technelysium.com.au). Des alignements ont été générés par le logiciel *BioEdit* (Hall, 1999) et le site *Chustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/>). Les séquences révisées ont pu être comparées à celles retrouvées dans les banques de données du logiciel Nucleotide BLAST disponible sur le site du *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et du *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Ensuite, des études phylogéniques ont été accomplies grâce au logiciel ARB (Ludwig *et al.*, 2004). L'alignement a été fait par rapport à des milliers de séquences disponibles dans la littérature. Les arbres ont été peaufinés avec le logiciel CorelDraw version 8.369 (*Corel Corporation, Ottawa, ON, Canada*).

3.3 Technique de rapporteur de dépôts catalytiques en hybridation fluorescente *in situ* (CARD-FISH)

3.3.1 Fixation des cellules

Les cellules utilisées pour les expériences de CARD-FISH étaient les biofilms échantillonnés tels que décrit à la section 3.2.1 et des cellules provenant d'une culture pure. Les cultures pures ont crû sur géloses R2A (*BD, Mississauga, ON, Canada*) à partir de souches conservées dans le glycérol 15% à -80°C. Dans tous les cas, les cellules ont d'abord été lavées et dispersées 2 fois au « Phosphate Buffer Saline » (PBS) 1X (NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 0,1 M, KH₂PO₄ 0,02 M, pH 7,6) avant d'être fixées au para-formaldéhyde (*Bio-Rad Laboratories*) 4% pendant 2,5 heures à 4°C. Deux lavages au PBS 1X ont suivi cette fixation puis les cellules ou les biofilms ont été entreposés dans du PBS 1X : éthanol 100% (1 : 1) à 4°C.

Avant de subir les traitements subséquents, les biofilms ont été défaits à l'aide d'un homogénéisateur de type Potter, afin d'homogénéiser la suspension cellulaire sans briser les cellules. Cette homogénéisation s'est faite dans un tampon PBS 1X.

3.3.2 Préparation de cellules pour essais de CLONE-FISH

Pour tester la spécificité d'une sonde, il a été nécessaire d'avoir un contrôle positif qui permettait d'optimiser les conditions dans lesquelles une sonde peut s'attacher au ribosome. Or, aucune espèce en culture pure du genre *Paenibacillus* (tableau 3.III) possédant la séquence complémentaire à la sonde sélectionnée n'était disponible. La méthode décrite par Schramm et ses collaborateurs (2002) a donc été utilisée. Le vecteur pGEM-T Easy isolé du clone 7,1-3, dont l'insert séquencé a été identifié comme appartenant au genre *Paenibacillus*, a été utilisé pour la transformation de *Escherichia coli* BL21(DE3) - F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*. Cette souche contient une copie génomique de la polymérase du phage T7. Le répresseur LacI empêche la transcription de la polymérase T7. L'IPTG se liera à LacI induire la transcription. La polymérase pourra ensuite transcrire le gène inséré dans le plasmide pGEM-T Easy (Figure 3.2).

La souche BL21(DE3) a été inoculée sur gélose LB. Après une croissance de 16 à 18 heures à 37°C, une colonie a été repiquée dans 3 mL de bouillon LB. Une nouvelle

incubation de 16 à 18 heures à 37°C a permis la croissance d'une importante biomasse dans les tubes. Ensuite, un volume de 1,5 mL de culture bactérienne a été culotté et lavé 2 fois au sucrose 300 mM puis suspendu dans un total d'environ 150 µL de sucrose 300 mM. Deux microlitres de plasmides isolés du clone 7,1-3 de la génothèque 16S ont alors été ajoutés à la suspension bactérienne puis le tout a été soumis à une électroporation de 1500V dans un appareil Electroporator 2510 (*Eppendorf Canada, Mississauga, ON, Canada*). Après une incubation dans 1 mL de bouillon LB de 1 heure à 37°C, la suspension bactérienne a été transférée sur une gélose LB-ampicilline 0,1 mg/mL pour une incubation de 16 à 18 heures à 37°C. Afin de s'assurer du succès de la transformation, une extraction plasmidique a été réalisée selon la méthode décrite à la section 3.2.3.

La transcription du gène de la polymérase T7 de la souche BL21(DE3) transformée a ensuite été induite (figure 3.2). Une culture liquide de 16 à 18 heures a été diluée 300 fois dans du LB et la croissance s'est poursuivie à 37°C avec agitation jusqu'à obtention d'une densité optique de 0,5 à 600 nm. Pour induire la transcription de la polymérase T7, une concentration finale de 1 mM d'IPTG a été introduite et la croissance s'est poursuivie dans les mêmes conditions. Ensuite, une concentration finale de 170 mg/mL de chloramphénicol a été additionnée pour arrêter la synthèse protéique et ainsi engendrer l'accumulation des transcrits ; la culture s'est poursuivie 4 heures dans les mêmes conditions. Les cellules ont ensuite été lavées et fixées selon la méthode décrite à la section de 3.3.1.

3.3.3 Perméabilisation membranaire et inactivation des peroxydases endogènes

Pour les sections 3.3.3 à 3.3.5, la méthode a été modifiée de Pernthaler et Pernthaler, 2007. Toutes les étapes suivant la fixation des cellules dans le paraformaldéhyde se faisaient directement sur lame. Des lames de 25 X 75 X 1 mm (*VWR International, Fontenay, France*) ont été trempées dans une solution de gélatine (*BD*) 3 mg/mL et $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (*A&C Produits Chimiques Américains*) 0,5 mg/mL de 60°C et séchées à 37°C pendant un minimum de 4 heures. Un volume de 200 µL (biofilms) ou de 50 µL (souche pure) a été déposé sur lame ; le tout a séché à 37°C pendant toute une nuit dans le cas des biofilms et pendant 1 à 2 heures dans le cas des souches bactériennes pures.

Lors de l'étape de perméabilisation membranaire, les lames ont été incubées dans une solution de lyzosome (*EMD, Gibbstown, NJ, É.-U.*) 10 mg/mL (solubilisée dans EDTA 0,05 M et Tris-HCl 0,1 M pH 8) pendant 40 minutes à 37°C. Une solution de protéinase K (*Fisher Biotech*) à une concentration finale de 0,1 µg/mL (solubilisée dans EDTA 0,05M et Tris-HCl 0,1M pH 8) a été ajoutée et l'incubation s'est prolongée 20 minutes. Les lames ont ensuite subi 3 lavages de 10 minutes à l'eau milliQ avec agitation.

Il est nécessaire d'inactiver les peroxydases endogènes pour minimiser le bruit de fond. En effet, le signal obtenu est dépendant de la présence d'une sonde à laquelle est liée la peroxydase du raifort. L'étape d'inactivation des peroxydases endogènes s'est faite par une incubation des lames à température pièce dans une solution de HCl (*Fisher Scientific*) 0,01 M pendant 20 minutes. Les lames ont ensuite été lavées 2 fois pendant 10 minutes à l'eau milliQ avec agitation, puis déshydratées par un trempage de quelques secondes dans l'éthanol 100%. Lorsque bien sèches, elles ont été entreposées à -20°C jusqu'à utilisation.

3.3.4 Hybridation, lavage et amplification

Un tampon d'hybridation de base, NaCl 0,9 M, Tris-HCl 20 mM pH 8, dextran sulfate (*Amersham Biosciences*) 10%, SDS 0,02%, réactif de blocage (« blocking reagent ») (*Roche Diagnosis, Laval, QC, Canada*) 1% et des concentrations variables de formamide (voir tableau 3.II) a été préparé à l'avance et entreposé à -20°C. Juste avant l'hybridation, la sonde-HRP (*Biomers, Ulm, Allemagne*) (tableau 3.III) a été ajoutée à une concentration de 0,28 ng/µL, sauf pour la sonde Meio4 qui a toujours été utilisée à 1 ng/µL, et la préparation a été déposée sur les lames. L'incubation à 35°C sur une plaque à hybridation Hybaid Omnislid (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, É.-U.*) s'est faite pendant 15 à 18 heures pour les sondes spécifiques et les contrôles négatifs, et pendant 5 heures pour la sonde EUB.

Ensuite, les lames ont été transférées dans un tampon de lavage (EDTA 5 mM pH 8, Tris-HCl 20 mM pH 8, SDS 0,01% et différentes concentrations de NaCl [tableau 3.II]) à 37°C pendant 5 minutes, dans un bain vertical Hybaid Omnislid Washmodule (*Hybaid*). Elles ont été rapidement transférées dans du tampon PBS 1X à température pièce pendant 15 minutes sans agitation pour équilibrer la sonde-HRP.

Les lames ont ensuite été transférées à 45°C en demeurant humides pour ne pas altérer l'enzyme HRP. L'amplification, d'une durée de 30 minutes, s'est faite dans un tampon d'amplification CARD (dextran sulfate 10%, NaCl 2M, réactif de blocage 0,1%, H₂O₂ 0,0015%, 1 µL/mL_{tampon CARD} de tyramide-fluorochrome (*Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, É.-U.*). Les fluorochromes utilisés étaient le Cy3 ou *cyanine3* (absorption à 550 nm, émission dans le rouge à 570 nm) et le FITC ou *fluorescein thiocyanate* (absorption à 490 nm et émission dans le vert à 520 nm). Dans le cas où la sonde Meio4 avait été utilisée, le tampon d'amplification contenait 2 µL/mL_{tampon CARD} de tyramide-fluorochrome. Par la suite, les lames ont été lavées au PBS 1X pendant 15 minutes sans agitation ainsi que 2 fois 10 minutes dans l'eau milliQ sans agitation. Après une déshydratation à l'éthanol 100%, les lames ont été séchées à l'air et étaient prêtes pour une deuxième hybridation ou une contre-coloration.

3.3.5 CARD-FISH multicolore et contre-coloration de l'ADN

Dans les cas où l'hybridation de plus d'une sonde était nécessaire, les lames ont subi une deuxième hybridation. Il a suffi de reprendre l'expérience à l'étape d'hybridation telle que décrite à la section 3.3.4.

Avant d'être visualisées au microscope, l'ADN des cellules a été contre-coloré avec le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (*Invitrogen*) dans le cas des tests d'optimisation. Le DAPI absorbe la lumière ultra-violette pour émettre une fluorescence bleue. Le DAPI a été mélangé à l'*antifading* Vectashield (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, É.-U.*) dans un ratio DAPI : Vectashield de 1 : 4,67 et à une concentration finale de DAPI de 3 µg/mL. Une goutte, protégée par une lamelle (*Fisher Scientific*), a été déposée directement sur spécimen et le tout a séché toute une nuit avant d'être scellé au vernis à ongle.

Dans le cas des hybridations sur des échantillons de biofilm, la contre-coloration s'est faite avec le Syto62 (*Invitrogen*), qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 649 nm et qui émet dans le rouge lointain à 680 nm. Une fois bien sèche, les lames ont été incubées dans une solution de Syto62 de 10 µM (dans l'eau milliQ) pendant 30 minutes à température pièce. Après 20 minutes de lavage dans l'eau milliQ à température pièce, les lames ont été séchées à l'air. Une goutte de Vectashield a alors été déposée sur le

spécimen avant d'y placer une lamelle. Après un séchage d'une nuit, les lamelles ont été fixées avec du vernis à ongle.

3.3.6 Visualisation des lames au microscope et quantification

Dans le cas des tests sur les cultures pures, les lames ont été visualisées à un grossissement de 1000X sur un microscope à épifluorescence (Nikon E-800) muni d'une caméra (Nikon CoolPix 990).

Dans le cas des analyses faites sur les biofilms de l'usine de P&P de Domtar, Windsor, la visualisation s'est faite sur un microscope confocal à balayage laser BioRad Radians 2000 (*Bio-Rad Laboratories inc.*) avec un objectif de 100X Nikon (ouverture numérique : 1.4).

Pour la quantification des microorganismes dans le biofilm, 4 échantillons, prélevés en juillet 2007 (tableau 4.1), ont été sélectionnés. Les échantillons ont été combinés par machine : « Machine 7 avant douches » et « Machine 7 après douches », ainsi que « Machine 8 avant douches » et « Machine 8 après douches ». Ces deux séries ont subi les mêmes traitements en parallèle. Chaque sonde a été testée en triplicata sur chaque échantillon de biofilm, avec à chaque fois les contrôles positif (la sonde spécifique sur son espèce cible en culture pure) et négatifs (la sonde NON et pas de sonde).

Pour chaque spécimen, de 13 à 25 photos ont été prises. Pour chacune de ces photos, la quantité de lumière (en pixels) émise par les sondes spécifiques a été comparée à la quantité de lumière émise par la sonde EUB (Eubactéries) par l'entremise du logiciel Daimé (*Daims et al., 2006*). Un ratio moyen (en pourcentage) a alors été établi pour chaque sonde, par machine à papier. Le bruit de fond a été réduit lors de la prise des photos en ajustant les paramètres du microscope. Néanmoins, certaines applications du logiciel Daimé ont aussi été utilisées. Le but de ces applications a été de faciliter le traitement subséquent des images.

Premièrement, un filtre médian a été appliqué sur chacune des images. L'utilité de celui-ci a été d'améliorer les images granuleuses en les adoucissant et en réduisant le bruit de fond. Ensuite, un filtre réducteur de bruit de fond a été appliqué. Les pixels gris ou blancs distribués au hasard dans l'image en ont alors été éliminés. Ces deux filtres ont facilité la segmentation des images (distinction, par l'ordinateur, des objets de l'arrière-

plan), étape essentielle précédant le calcul de la fraction biovolumique de la sonde spécifique.

La mesure de la fraction biovolumique d'une sonde spécifique a nécessité que la population ciblée soit aussi présente dans l'image jumelle montrant la population totale ; les objets devaient être congruents dans chaque paire d'images. Pour s'en assurer, l'outil de rejet des artefacts (*Artefact rejection tool*) du logiciel Daima a été utilisé. Pour ce projet, un seuil de congruence de 75% a été appliqué à chaque paire d'images. La congruence réelle des objets est ensuite indiquée dans les résultats. Les créateurs du logiciel suggèrent une congruence finale d'au moins 90% pour avoir une quantification fiable. Les données obtenues sont indiquées dans la section 4.3.2.

Tableau 3.II : Concentration de sel dans le tampon de lavage en relation avec le pourcentage de formamide utilisé dans le tampon d'hybridation.

% de formamide dans le tampon d'hybridation	Concentration NaCl dans le tampon de lavage (mM)
20	135
25	95
30	64
35	42
40	27
45	16
50	9
55	3
60	- ^a
65	- ^a
70	- ^a

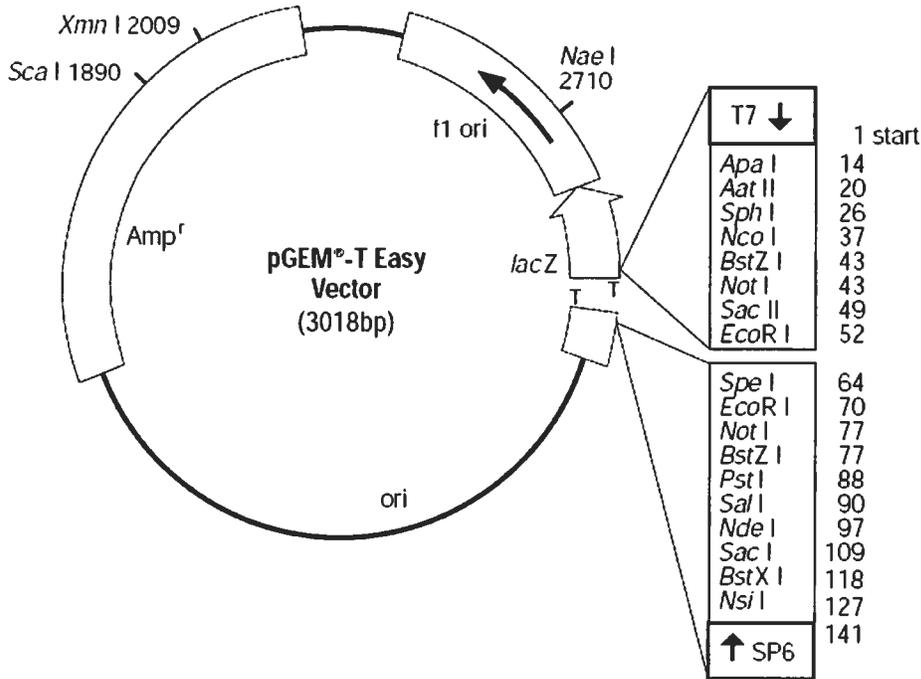
a : À ces concentrations de formamide, il n'y avait pas de NaCl dans le tampon de lavage.

Tableau 3.III : Sondes utilisées lors de ce projet et pourcentage de formamide utilisé dans le tampon d'hybridation.

Sonde	Microorganismes ciblés	Séquence	% formamide	Référence
EUB-I	Eubacteria	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	20-65 ^a	(Amann <i>et al.</i> , 1990a)
EUB-II	Planctomycetales	5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'	20-65 ^a	(Daims <i>et al.</i> , 1999)
EUB-III	Verrumicrobiales	5'-GCT GCC ACC CGT AGG TGT-3'	20-65 ^a	(Daims <i>et al.</i> , 1999)
NON338	Contrôle négatif	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3'	^b	(Wallner <i>et al.</i> , 1993)
Chl2	Chloroflexi	5'-CCA TTG TAG CGT GTG TGT-3'	35	(Bjornsson <i>et al.</i> , 2002)
Deino	<i>Deinococcus</i> sp.	5'-GTA TCC AGC CCA CTC CTG TG-3'	65	
Meio4	<i>Meiothermus</i> sp.	5'-CCT AGT TGT CCC AGA CTT TG-3'	65	
Paen	<i>Paenibacillus</i> sp.	5'-TTC GGC ACC GAG GGT ATC-3'	45	
Psd	<i>Pseudomonas</i> sp.	5'-CGG TTA GAC TAG CTA CTT CT-3'	60	Ce projet
Psx2	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	5'-TGT CAG TGT TGG CCC AGG TG-3'	65	
Sch	<i>Schlegelella</i> sp.	5'-CTA CGT TAC TGA TCC AGT GA-3'	30	
Tep	<i>Tepidimonas</i> sp.	5'-TTT CGC TGC GTT ATC CCC CAC CTC T-3'	65	

a : Les sondes EUB-I-II-III ont été utilisées ensemble, à une concentration de 0,28 ng/μL chaque. Le pourcentage de formamide utilisé pour une expérience donnée était celui de la sonde spécifique testée.

b : Étant un contrôle négatif, la sonde NON ne permet normalement pas l'obtention d'un signal.



Source : <http://www.promega.com/>

Figure 3.1 : Vecteur pGEM®-T Easy Vector de Promega utilisé pour la conception d'une génothèque du gène de l'ARNr 16S.

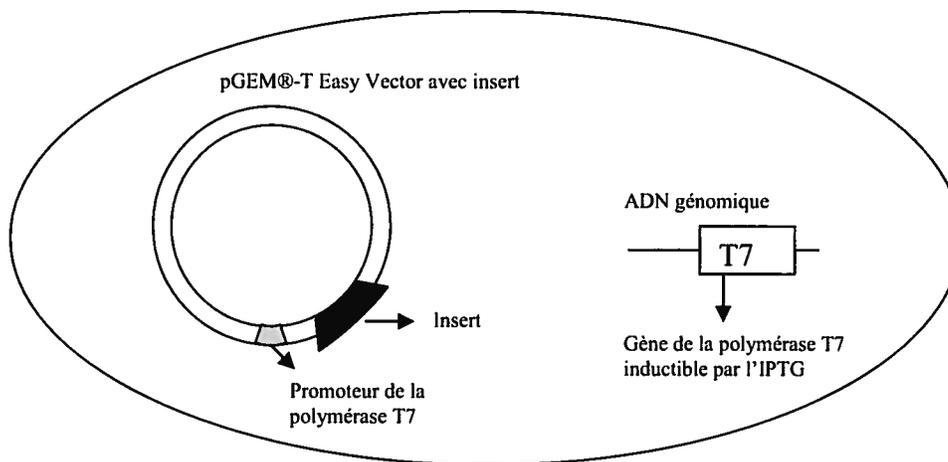


Figure 3.2 : Transformation de *Escherichia coli* BL21(DE3) avec le plasmide pGEM®-T Easy Vector de Promega contenant comme insert un gène de l'ARNr 16S provenant du biofilm. Après induction par l'IPTG, la polymérase T7 transcrit l'insert en de nombreuses copies.

4. RÉSULTATS

4.1 Suivi de la flore bactérienne des biofilms de l'usine de Windsor

4.1.1 Suivi de la flore bactérienne par PCR-DGGE

Lors de l'année 2007, 33 échantillons de biofilms ont été collectés à l'usine de Domtar (Windsor, QC) à l'occasion de 9 séances d'échantillonnages (tableau 4.1). Il est important de souligner que les opérateurs nettoient régulièrement (de façon hebdomadaire) les machines et que les biofilms s'y renouvellent donc sans arrêt. Tous les biofilms ont été collectés à des endroits aléatoires de la partie humide (figure 2.2), plus précisément sur les tuyaux aux environs de la caisse d'arrivée et la toile. Ils étaient tous en contact direct avec l'air ambiant ; aucun biofilm n'a été collecté à l'intérieur des cuiviers ou des caisses d'arrivée. Tous les biofilms, sauf exception, étaient de couleur rose, orangé ou rougeâtre. Lorsqu'un biofilm n'était pas rose, orangé ou rougeâtre, sa couleur est spécifiée dans le tableau 4.1. Tous les biofilms échantillonnés, sauf exception, avaient, selon l'œil de l'échantillonneur, la même viscosité, forme et taille. Les 4 biofilms récoltés en janvier, soit J1(7,1), J2(7,2), J3(8j) et J4(8v) ont servi à la conception d'une génothèque 16S.

La complexité de la flore bactérienne a été évaluée par PCR-DGGE. Pour chaque DGGE, un marqueur moléculaire a été utilisé pour évaluer la qualité du gel et de la migration. Il peut également servir à joindre les images de différents gels pour fins de comparaison des échantillons. Le marqueur utilisé lors de cette étude était constitué de l'ADN de 5 espèces en culture pure, soient *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans*. Ces ADN ont été amplifiés de la même façon que les échantillons et les produits de PCR ont été combinés pour former le marqueur.

Les gels des 33 échantillons collectés au cours de l'année 2007 sont présentés aux figures 4.1 et 4.2. Les profils de migration de la plupart des échantillons étaient très complexes, avec plus d'une vingtaine de bandes. Cela signifie que la diversité bactérienne était élevée dans les biofilms. Des analyses ont été faites pour déterminer la similarité entre les profils des échantillons (figure 4.3). Ces analyses ont montré qu'aucun des profils des échantillons provenant de la machine 7 n'étaient similaires à ceux provenant

de la machine 8. Nous avons constaté que les échantillons prélevés sur la même machine le même jour, mais à des endroits différents, présentaient le plus de similitude dans leur profil (par exemple A1 et A2, A5 et A6, M2 et M3). Dans certains cas, nous avons pu constater des similitudes dans une période de prélèvement (par exemple, en été : échantillons Jn3, J14 et Ao3). Cependant, en règle générale, les biofilms récoltés à des mois différents avaient des profils assez dissemblables.

Deux échantillonnages ont été effectués au mois d'avril 2007 (A1 à A8). Le but était de voir si la flore bactérienne avait subi des changements importants à l'intérieur d'un aussi court laps de temps (1 semaine). En une semaine, les échantillons de la machine 7 (A1, A2, A5 et A6 ; figures 4.1 et 4.3) ont conservé une certaine similarité puisque leur profil se retrouve dans le même grand embranchement de l'arbre de similitude. Par contre, ceux de la machine 8 (A3, A4, A7 et A8 ; figures 4.2 et 4.3) ont vu leur profil changer en une semaine car les échantillons A7 et A8 se regroupent dans un tout autre grand embranchement, suggérant que la flore bactérienne s'était complètement métamorphosée en une semaine.

Tableau 4.1 : Description des 33 échantillons de biofilms collectés à l'usine de Domtar, Windsor, au cours de l'année 2007.

Échantillon	Date d'échantillonnage	Numéro de machine et spécifications endroit/couleur
J1 (7,1)		Machine 7
J2 (7,2)	25 janvier 2007	Machine 7
J3 (8v)		Machine 8, biofilm « moins de 24 heures », blanc
J4 (8j)		Machine 8, biofilm « vieux », peu visqueux
M1		Machine 7
M2	19 mars 2007	Machine 8
M3		Machine 8
A1		Machine 7 jaune citron
A2	19 avril 2007	Machine 7 jaune citron
A3		Machine 8
A4		Machine 8
A5		Machine 7
A6	26 avril 2007	Machine 7
A7		Machine 8
A8		Machine 8
Jn1		21 juin 2007
Jn2	Machine 7, beige	
Jn3	Machine 8, beige	
Jn4	Machine 8	
Jl1	26 juillet 2007	Machine 7
Jl2		Machine 7
Jl3		Machine 8
Jl4		Machine 8
Ao2	23 août 2007	Machine 7
Ao3		Machine 8
N1	3 novembre 2007	Machine 7
N2		Machine 7
N3		Machine 8
N4		Machine 8
D1	10 décembre 2007	Machine 7
D2		Machine 7
D3		Machine 8
D4		Machine 8

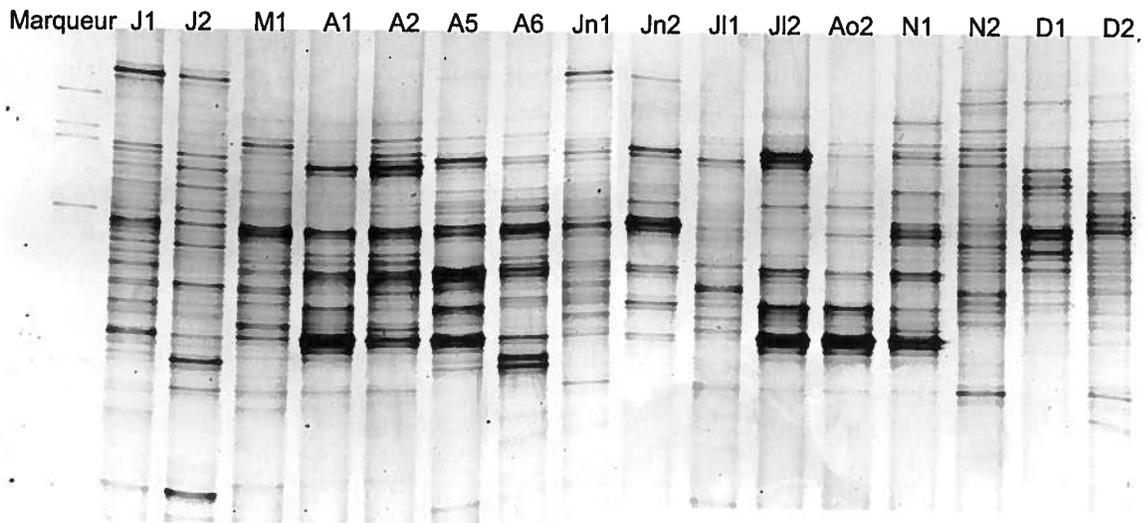


Figure 4.1 : Profil de la diversité bactérienne dans les 16 échantillons de biofilms prélevés sur la machine 7 lors de l'année 2007. Le gel était constitué d'un gradient d'agents dénaturants (urée et formamide) de 20% (haut) à 80% (bas). Les bandes du marqueur sont, du haut vers le bas, constitués de l'ADN de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. coli* et *S. lividans*.

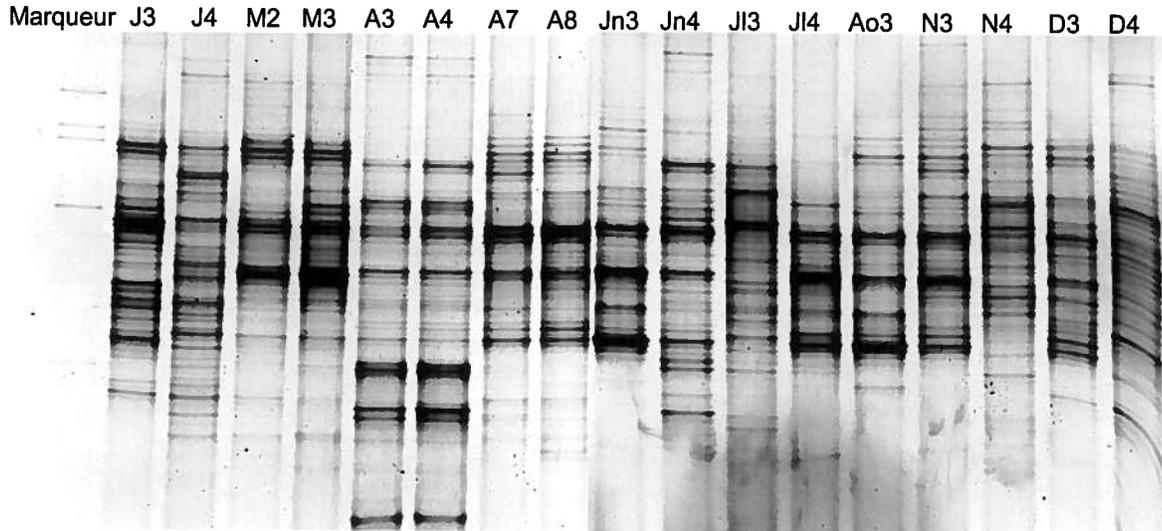


Figure 4.2 : Profil de la diversité bactérienne dans les 17 échantillons de biofilms prélevés sur la machine 8 lors de l'année 2007. Le gel était constitué d'un gradient d'agents dénaturants (urée et formamide) de 20% (haut) à 80% (bas).

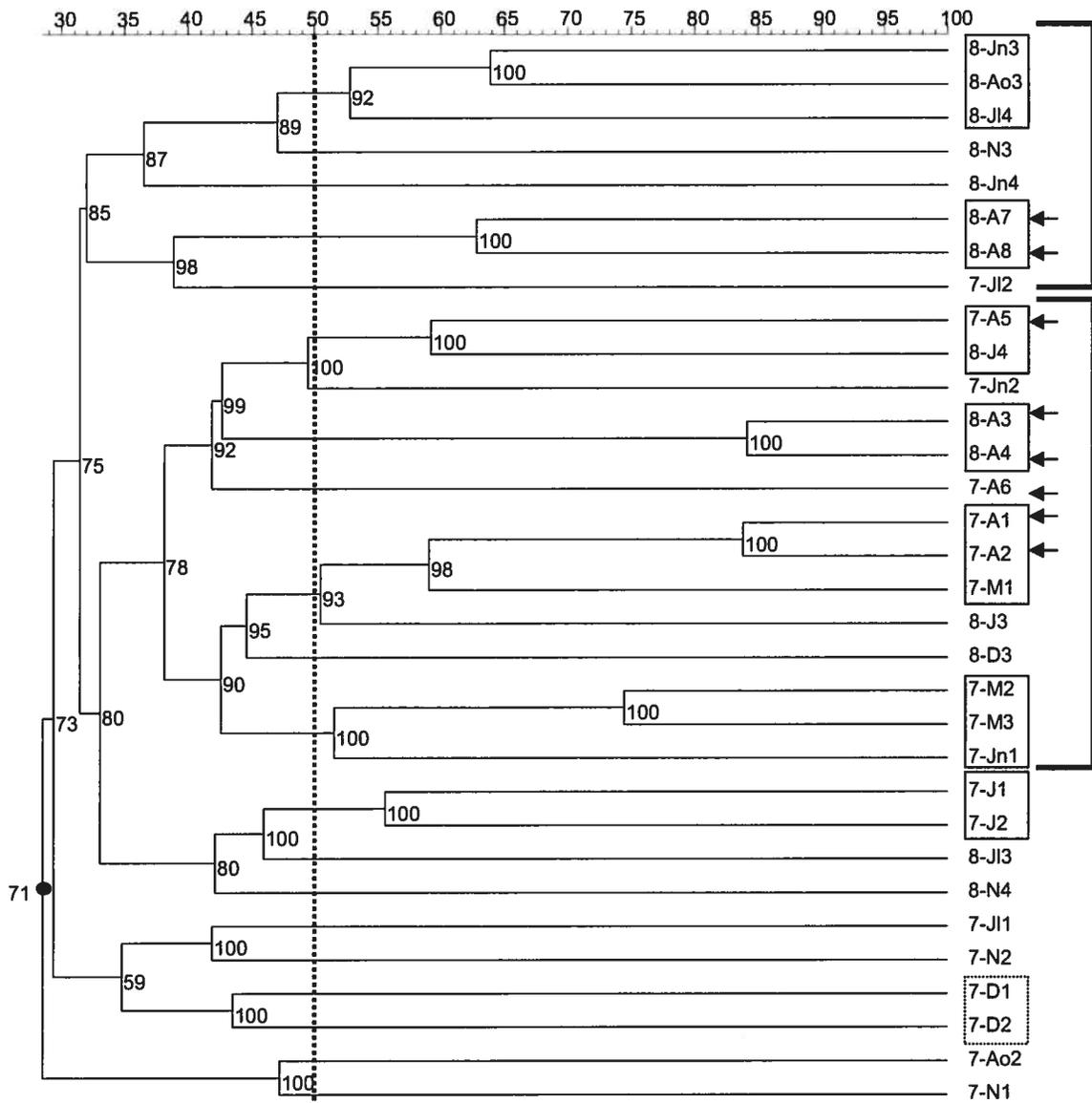


Figure 4.3 : Similarité entre les profils de migration de bandes des DGGE des figures 4.1 et 4.2. Les profils des DGGE des figures 4.1 et 4.2 ont été alignés et comparés en les regroupant avec le coefficient de corrélation de Jaccard avec une tolérance de position de 0,59% tel que défini dans le logiciel GelCompar II (*Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgique*) et avec UPGMA (*unweighted-pair group method with arithmetic mean*) comme méthode de construction de l'arbre. L'échelle représente le pourcentage de similitude entre les profils. Les chiffres aux embranchements représentent le calcul de la probabilité (pourcentage) que l'embranchement est significatif (corrélation cophénétique). Les regroupements les plus similaires ont été encadrés. 7 : Machine 7. 8 : Machine 8. Voir légende des figures 4.1 et 4.2 pour la nomenclature.

4.1.2 Recherche de *Meiothermus* sp.

Étant donné l'importance des bactéries du genre *Meiothermus* dans la génothèque faite à partir de l'eau blanche en 2006 par Véronique Prince (tableau 2.I) et de son implication dans des biofilms d'usines de P&P européennes (Ekman *et al.*, 2007), des PCR ciblant spécifiquement ce genre ont été faites sur les 33 échantillons d'ADN afin d'y vérifier sa présence. Pour ce faire, les amorces publiées en 2007 par Ekman et ses collaborateurs ont été utilisées.

La figure 4.3 montre que le genre *Meiothermus* était clairement présent dans 7 échantillons sur 33 (J4, A3, A4, A5, A6, Jn4 et J14), dont 4 au mois d'avril 2007. Les échantillons J1, J3 et N3 ont également produit une amplification, mais beaucoup plus faible, suggérant une moindre concentration des *Meiothermus* sp. dans ces biofilms. Les produits d'amplification ont été séquencés pour confirmer leur appartenance à ce genre. L'amplicon avait 100% d'identité avec la partie correspondante du gène de l'ARNr 16S de *Meiothermus* sp.

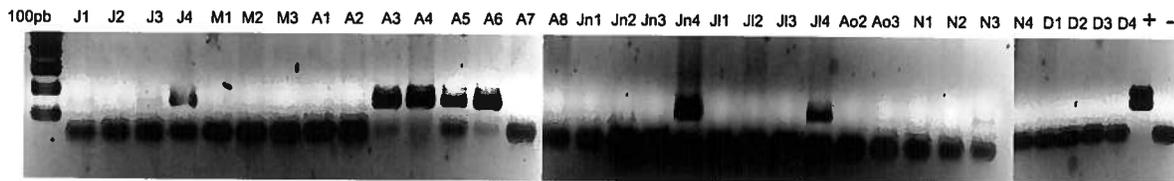


Figure 4.4 : Produits de PCR amplifiés avec des amorces spécifiques au genre *Meiothermus*. La migration s'est faite sur un gel d'agarose à 2% à 90V pendant 60 minutes. L'amplicon du contrôle positif (+) est d'environ 140 paires de bases et a été obtenu par l'amplification de l'ADN de *Meiothermus silvanus* DSM 9946. Le contrôle négatif est une solution pour PCR sans ADN.

4.2 Analyse phylogénique de séquences obtenues d'une génothèque 16S

La génothèque 16S a été construite à partir de 4 échantillons collectés au mois de janvier 2007, soient J1(7,1), J2(7,2), J3(8j) et J4(8v) (tableau 4.I). Quatre génothèques ont été construites en parallèle car le profil bactérien de ces 4 échantillons sur DGGE (figures 4.1 et 4.2) différait. Les 178 clones sélectionnés aléatoirement ont été criblés en déterminant leur profil de restriction avec l'enzyme *AfaI*. Au moins un clone représentant chacun des profils a été choisi pour que la séquence complète de leurs inserts soit identifiée. Des analyses comparatives des banques de données ont pu regrouper les 178 clones en 15 catégories appartenant à différents niveaux taxonomiques (tableau 4.II) et ont permis de les placer dans un arbre phylogénique (figure 4.4). Près de 50% des clones étaient apparentés à trois catégories, soit l'embranchement des Chloroflexi, l'ordre des Clostridiales et le genre *Paenibacillus*. Ces résultats ont été analysés de façon plus exhaustive dans la section Discussion.

Tableau 4.II : Affiliation la plus probable des 178 clones

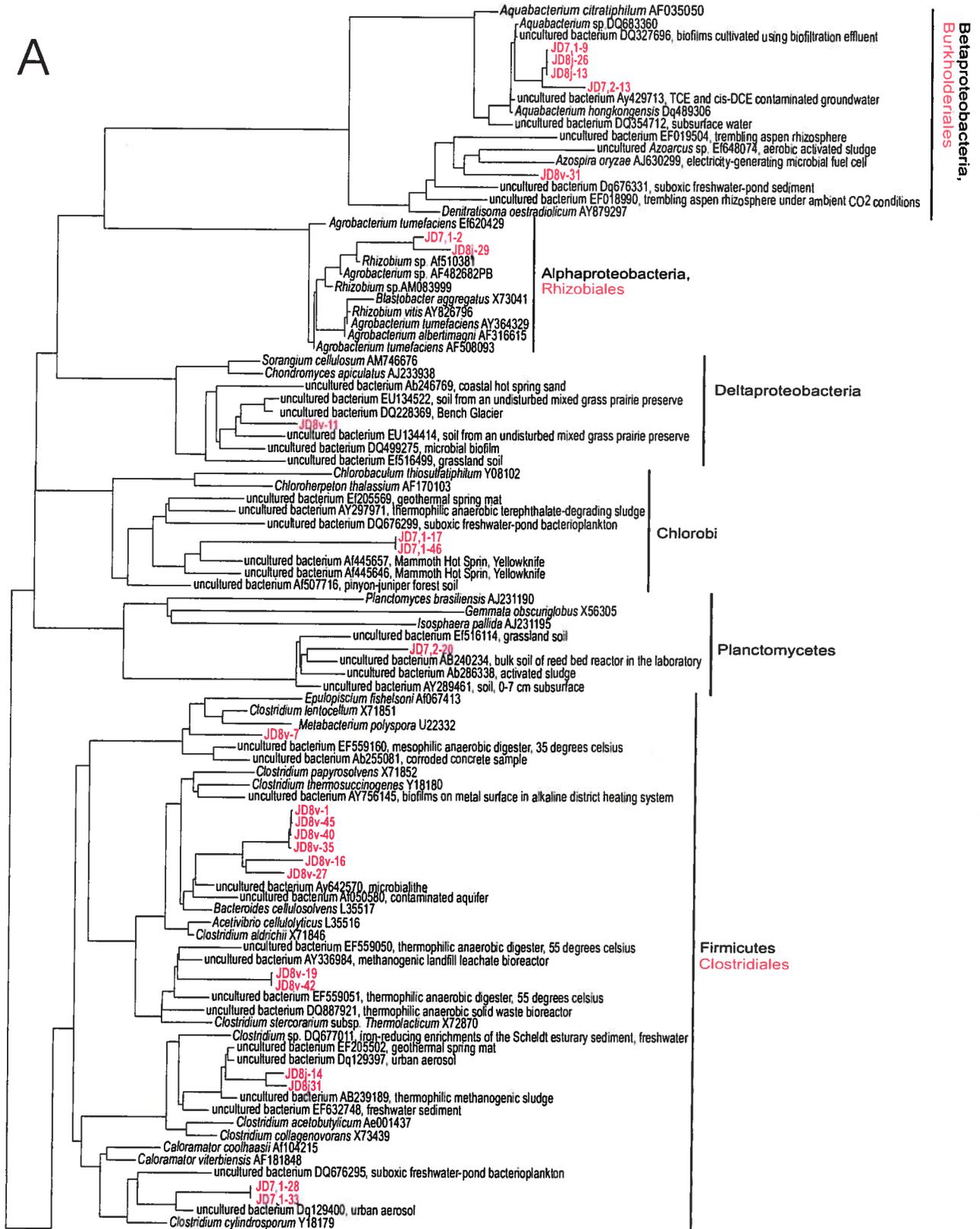
	Nombre de clones par échantillon de biofilm				Total de clones séquencés	Total de clones représentés	% des clones
	J1(7,1)	J2(7,2)	J3(8j)	J4(8v)			
^a Chloroflexi	4	14	-	2	20	38	21,3
Clostridiales	2	-	2	9	13	31	17,4
<i>Paenibacillus</i>	3	-	3	1	7	22	12,4
^b OP10	2	1	-	3	6	21	11,8
Burkholderiales	1	1	2	1	5	18	10,1
<i>Deinococcus</i>	2	-	1	2	5	17	9,6
<i>Exiguobacterium</i>	2	1	1	-	4	11	6,2
^b TM7-OD1-OP11-WS6	3	2	-	-	5	8	4,5
Chlorobi	2	-	-	-	2	2	1,1
Rhizobiales	1	-	1	-	2	2	1,1
<i>Bacillus</i>	-	-	1	-	1	1	0,6
Cyanobacteria	-	-	-	1	1	1	0,6
Deltaproteobacteria	-	-	-	1	1	1	0,6
Planctomycetes	-	1	-	-	1	1	0,6
^c Veillonellaceae	-	-	-	1	1	1	0,6
Non classifiables	1	2	-	-	3	3	1,7
Totaux	23	22	11	21	77	178	100

a : Embranchement des bactéries vertes non-sulfureuses

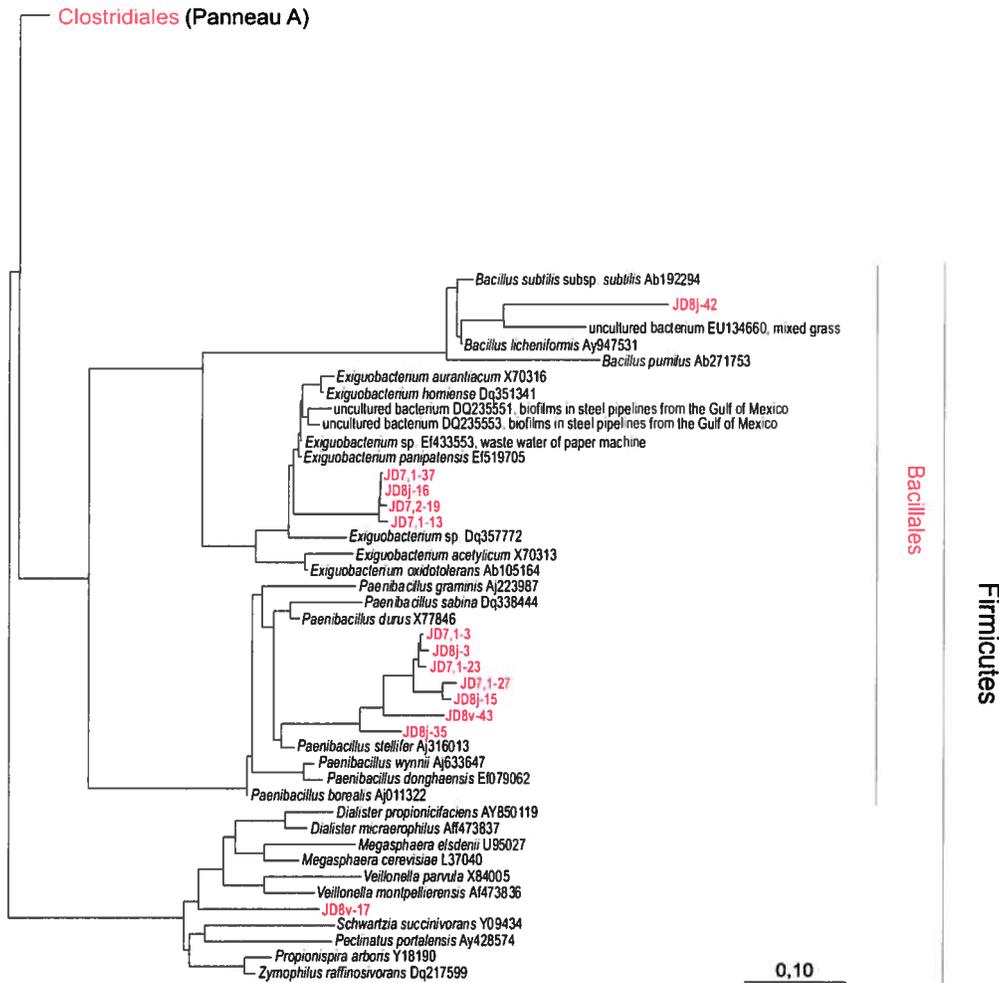
b : Embranchements candidats

c : Famille appartenant à l'embranchement des Firmicutes

A



B



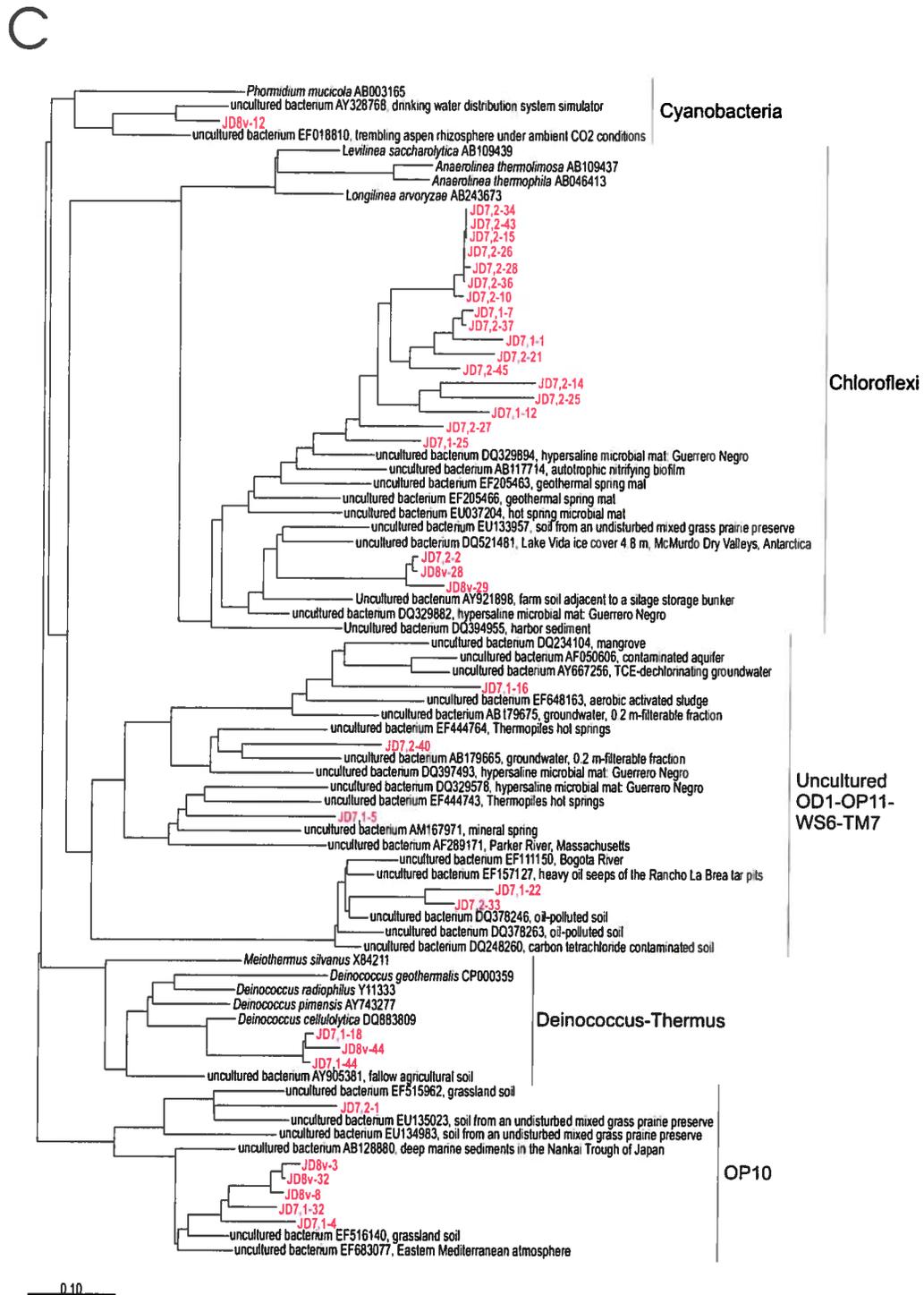


Figure 4.4 : Localisation des séquences des clones dans un arbre phylogénique des gènes de l'ARNr 16S. Cet arbre a été produit par le logiciel ARB. Les panneaux A, B et C présentent les séquences les plus représentatives des 15 catégories. Elles ont été choisies pour illustrer les affiliations les plus probables des clones (en orange dans l'arbre). Échelle : nombre de substitutions par nucléotide.

4.3 Étude de la diversité bactérienne de différentes usines de P&P du Québec

La diversité bactérienne de 3 autres usines de P&P du Québec a été étudiée. Ces trois usines n'utilisent pas le même type de fibre ni le même type de procédé de mise en pâte (tableau 4.II) que l'usine de Domtar à Windsor. Tous ces échantillons ont été collectés le 28 avril 2008 par Véronique Prince. L'ADN a été extrait de ces échantillons et le profil bactérien a été évalué par PCR-DGGE.

Les figures 4.6 et 4.7 montrent que le profil bactérien n'était pas caractéristique d'une usine mais de l'emplacement dans une usine, comme l'ont indiqués les résultats obtenus pour l'usine de Domtar (section 4.1.1). Ainsi, à l'usine de Kingsey Falls (série KF), les échantillons KF1 et KF2 provenant de la même machine avaient des profils très similaires avec toutefois des changements importants dans l'intensité de plusieurs bandes. Par contre, les biofilms provenant des machines 1 (KF3), 2 (KF4) et 3 (KF1, KF2) avaient des profils différents.

Dans le cas de KF, nous avons bien vu la différence entre les machines. Ce n'est pas le cas de l'usine de Clermont. Ces échantillons ont été récoltés à des endroits variés de la machine 4. Des profils variables ont été observés, avec une faible diversité pour C3, caractérisé par la présence d'une bande (étiquetée « 10 ») dominant singulièrement les autres. Les profils bactériens des échantillons D1 et D2 (Drummondville) provenant tous deux du turbodrain sont très semblables entre eux, mais également avec celui de l'échantillon KF3.

Tableau 4.III : Description des usines échantillonnées (sauf Domtar, Windsor) et des échantillons collectés le 28 avril 2008

Ville	Compagnie	Production	Type de fibre	Eaux de complément	pH*	T°C*	Nom de l'échantillon	Lieu d'échantillonnage	
Kingsey Falls, QC	Cascades	Papier tissus brun (machine 1)	Fibre recyclée	Rivière Nicolet	7,3	34	KF1	Boîte de rejet du tamis de tête machine 3	
		Papier tissus blanc (machines 2 et 3)					KF2	Douche d'eau clarifiée Saturn et douche d'eau fraîche machine 3	
								KF3	Douche d'eau clarifiée Saturn et douche d'eau fraîche machine 1
							KF4	Douche d'eau clarifiée Saturn et douche d'eau fraîche machine 2	
Clermont, QC	Technocell	Papier Décor	Pâte Kraft d'eucalyptus (90% Aracruz et 10% Cacia) + 32% cendre (titane et ansilex)	Aqueduc municipal	5,9	38	C1	Retour de toile foudrinier machine 4	
							C2	Douche d'eau chaude conditionneur 2 ^{ème} presse machine 4	
							C3	machine 4	
Drummondville, QC	Abitibi Bowater	Papier journal	Pâte thermomécanique 100% résineux	Rivière Malbaie	4,5	50	D1	Turbodrain	
							D2	Douche d'eau clarifiée Turbodrain	

* du procédé, donc des eaux blanches circulantes de la partie humide.

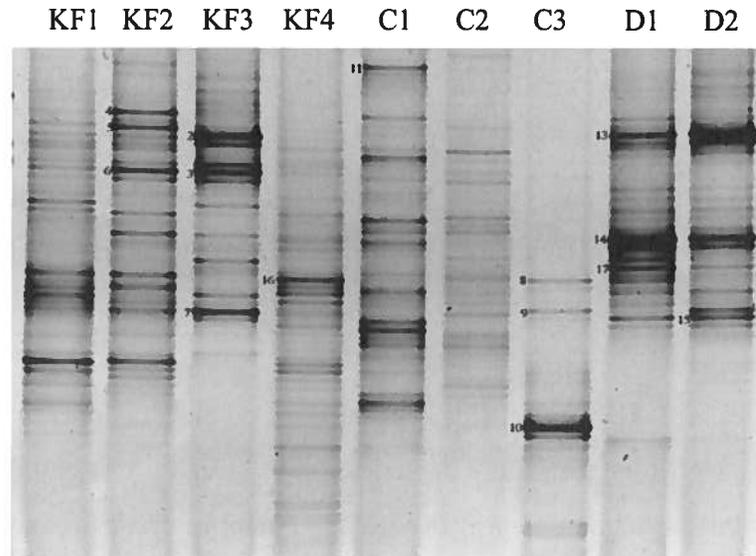


Figure 4.6 : Profil de la diversité bactérienne dans 9 échantillons de biofilms prélevés dans 3 usines de P&P, situées à Kingsey Falls, QC (KF1, 2, 3, 4), Clermont, QC (C1, 2, 3) et Drummondville, QC (D1, 2) (voir tableau 4.II). Le gel est constitué d'un gradient d'agents dénaturants (urée et formamide) de 30% (haut) à 70% (bas). Les bandes numérotées sont celles dont l'ADN a été extrait et séquencé (section 4.4)

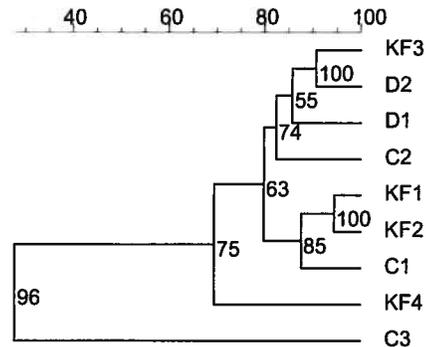


Figure 4.7 : Similarité entre les profils de migration de bandes du DGGE de la figure 4.6. Les profils des DGGE de la figure 4.4 ont été alignés et comparés en les regroupant avec le coefficient de corrélation de Jaccard avec une tolérance de position de 6,8% et une optimisation de 0,85% tel que défini dans le logiciel GelCompar II (*Applied Maths*) et avec UPGMA comme méthode de construction de l'arbre. L'échelle représente le pourcentage de similitude entre les profils. Les nombres aux embranchements représentent le calcul de la probabilité (pourcentage) que l'embranchement est significatif (corrélation cophénétique). Voir légende de la figure 4.6 pour la nomenclature.

4.4 Correspondance de bandes extraites de DGGE

Des bandes ont été extraites de DGGE dans le but d'identifier certaines bandes récurrentes ou particulièrement intenses et de comparer les résultats obtenus pour 4 usines de P&P, soient Windsor, Kingsey Falls, Clermont et Drummondville. Ainsi, l'ADN de 40 bandes provenant de 2 gels (figures 4.5 et 4.6) a été extrait, ré-amplifié avec les mêmes amorces puis séquencé. L'affiliation phylogénique de ces ADN est présentée au tableau 4.IV.

Quatre des sept ADN extraits des échantillons de biofilms provenant de l'usine de Kingsey Falls s'affilient à des bactéries appartenant à l'embranchement des Bacteroidetes, plus particulièrement à l'ordre des Flavobacteriales (bandes 3, 4, 5 et 6). Les autres bandes correspondent aux Protéobactéries (α , β et γ). Les 4 bandes découpées dans les puits des échantillons de l'usine de Clermont contenaient de l'ADN s'affilient à 3 embranchements bactériens distincts, soient Bacteroidetes, Firmicutes (Clostridia) et Acidobactéries. Quant à l'usine de Drummondville, les bandes extraites appartiennent aux Protéobactéries (α , β et γ).

Vingt-cinq bandes ont été extraites des échantillons provenant de l'usine de Domtar (figure 4.5). Les différents embranchements rencontrés étaient les suivants : Protéobactéries (7 β - et 1 δ -), Bacteroidetes (5), Bacteroidetes ou Chlorobi (la séquence ne permet pas l'identification) (5), Firmicutes (Bacilli) (3), Chloroflexi (2), Spirochaetes (2) et Deinococcus-Thermus (1).

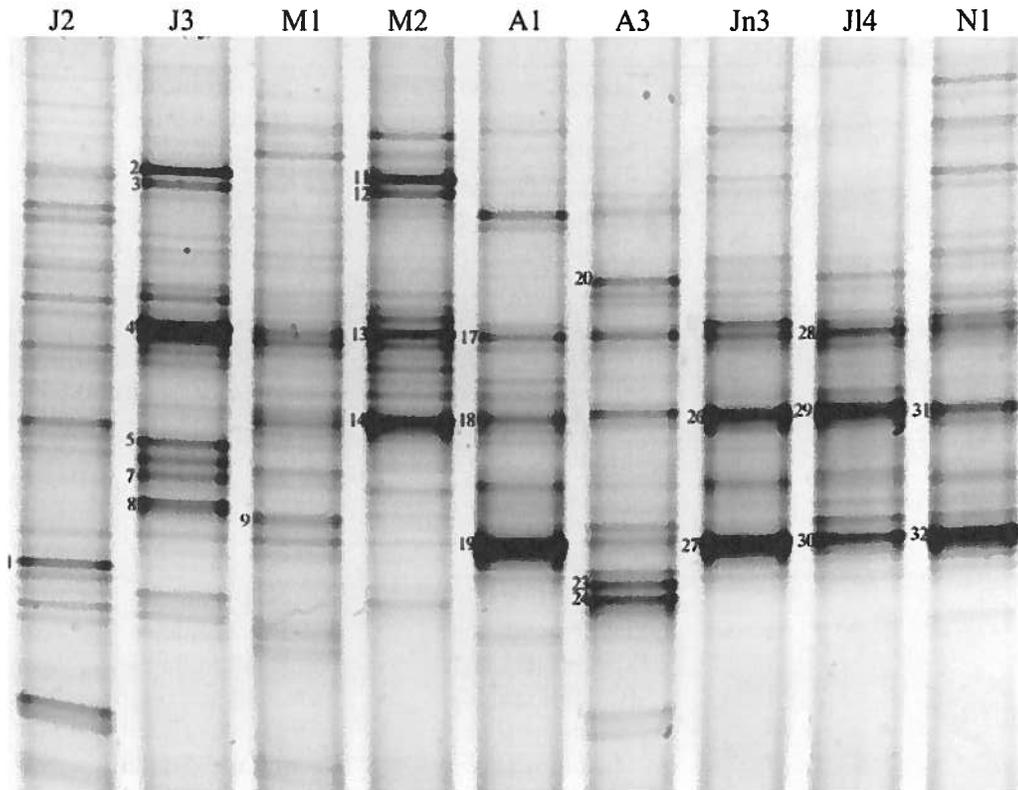


Figure 4.8 : Profil de la diversité bactérienne dans 9 échantillons de biofilms représentatifs prélevés à l'usine de P&P de Domtar, Windsor, au cours de l'année 2007 (voir tableau 4.I). Le gel est constitué d'un gradient d'agents dénaturants (urée et formamide) de 30% (haut) à 70% (bas). Les bandes numérotées sont celles dont l'ADN a été extrait et séquencé.

Tableau 4.IV : Affiliation la plus probable des séquences nucléotidiques d'une partie du gène de l'ARNr 16S provenant de bandes découpées sur DGGE. Les séquences obtenues avaient environ 150 paires de bases et l'affiliation la plus probable s'est faite à partir du logiciel *Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*. Le pourcentage d'identité est par rapport à des séquences de bactéries non cultivées.

Nom de l'échantillon	Usine	no de la bande	Affiliation (BLASTn)	Embranchement (Classe)	% identité
KF2	Kingsey Falls	4	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes	98
		5	<i>Chryseobacterium</i>	Bacteroidetes	97
		6	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes	99
KF3	Kingsey Falls	2	<i>Acinetobacter</i>	Proteobacteria (γ)	98
		3	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes	96
		7	<i>Tepidimonas</i>	Proteobacteria (β)	99
KF4		16	Rhizobiaceae	Proteobacteria (α)	96
C1	Clermont	11	<i>Chryseobacterium</i>	Bacteroidetes	93
C3		8	<i>Thermoanaerobacterium</i>	Firmicutes (Clostridia)	98
		9	<i>Thermoanaerobacterium</i>	Firmicutes (Clostridia)	96
		10	Acidobacteriaceae	Acidobacteria	99
D1	Drummond ville	13	<i>Acinetobacter</i>	Proteobacteria (γ)	99
		14	<i>Acidovorax</i>	Proteobacteria (β)	100
		17	<i>Comamonas</i>	Proteobacteria (β)	94
D2		15	Rhizobiaceae	Proteobacteria (α)	98
J2(7,2)		1	Chloroflexi	Chloroflexi	86
J3(8j)		2	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes	98
		3	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes	89
		4	Burkholderiales	Proteobacteria (β)	98
		5	<i>Paenibacillus</i>	Firmicutes (Bacilli)	92
		7	<i>Paenibacillus</i>	Firmicutes (Bacilli)	80
		8	<i>Exiguobacterium</i>	Firmicutes (Bacilli)	96
M1		9	Deltaprotéobactérie	Proteobacteria (δ)	86
M2	Windsor	11	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes	98
		12	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes	95
		13	Burkholderiales	Proteobacteria (β)	98
		14	Bêtaprotéobactérie	Proteobacteria (β)	94
A1	Windsor	17	Spirochaetaceae	Spirochaetes	95
		18	Bacteroidetes-Chlorobi	Bacteroidetes-Chlorobi	80
		19	<i>Tepidimonas</i>	Proteobacteria (β)	98
A3	Windsor	20	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes	93
		23	Chloroflexi	Chloroflexi	90
		24	<i>Meiothermus</i>	Deinococcus-Thermus	93
		26	Bacteroidetes-Chlorobi	Bacteroidetes-Chlorobi	80
		27	<i>Tepidimonas</i>	Proteobacteria (β)	98
J14	Windsor	28	Spirochaetaceae	Spirochaetes	93
		29	Bacteroidetes-Chlorobi	Bacteroidetes-Chlorobi	80
		30	<i>Tepidimonas</i>	Proteobacteria (β)	97
N1	Windsor	31	Bacteroidetes-Chlorobi	Bacteroidetes-Chlorobi	80
		32	<i>Tepidimonas</i>	Proteobacteria (β)	98

4.5 Étude de la flore bactérienne du biofilm par CARD-FISH

En concertation avec l'équipe du Pr Beaulieu de l'Université de Sherbrooke, nous avons sélectionné 8 embranchements ou genres bactériens à cibler avec des sondes : *Chloroflexi*, *Deinococcus*, *Meiothermus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Schlegelella*, *Pseudoxanthomonas* et *Tepidimonas*. Ils ont été sélectionnés parce qu'ils sont les plus abondants dans les génothèques faites sur l'eau blanche et sur les biofilms.

4.5.1 Optimisation des sondes sur des cultures pures

Les conditions d'hybridation, de lavage et d'amplification de chaque sonde ont été optimisées avant que des analyses aient été entamées sur les échantillons de biofilm de l'usine de P&P. Des souches des genres *Schlegelella*, *Deinococcus*, *Pseudoxanthomonas* et *Tepidimonas* isolées de l'usine de P&P par l'équipe de l'Université de Sherbrooke ont été utilisées respectivement pour les sondes Sch, Dei, Psx2 et Tep. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 a été utilisé pour l'optimisation de la sonde Psd, *Anaerolinea thermophila* UNI-1 pour l'optimisation de la sonde Chloro2, et *Meiothermus silvanus* DSM9946 pour l'optimisation de la sonde Meio4. Un clone d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimant le gène de l'ARNr 16S de *Paenibacillus* sp. a été utilisé pour la sonde Pae.

Dans chaque cas, des hybridations successives avec des concentrations croissantes de formamide ont d'abord été faites. Lorsqu'était atteinte la concentration de formamide pour laquelle une perte de signal significative avait été observée, une concentration qui lui était inférieure de 5% était alors déterminée comme optimale pour la sonde donnée. Pour chaque expérience, le contrôle positif était l'hybridation de la sonde EUB I-II-III sur la même espèce bactérienne que celle testée. Les contrôles négatifs étaient : la sonde NON pour le bruit de fond généré par l'hybridation non-spécifique et un contrôle sans sonde pour le bruit de fond généré par l'étape d'amplification.

Pour s'assurer de la spécificité des sondes dans les conditions utilisées, chacune des sondes a été testée seule (figure 4.9) ou en combinaison contre chacune des souches servant de contrôle positif. Ces tests n'ont montré aucun signal non-spécifique (données non illustrées).

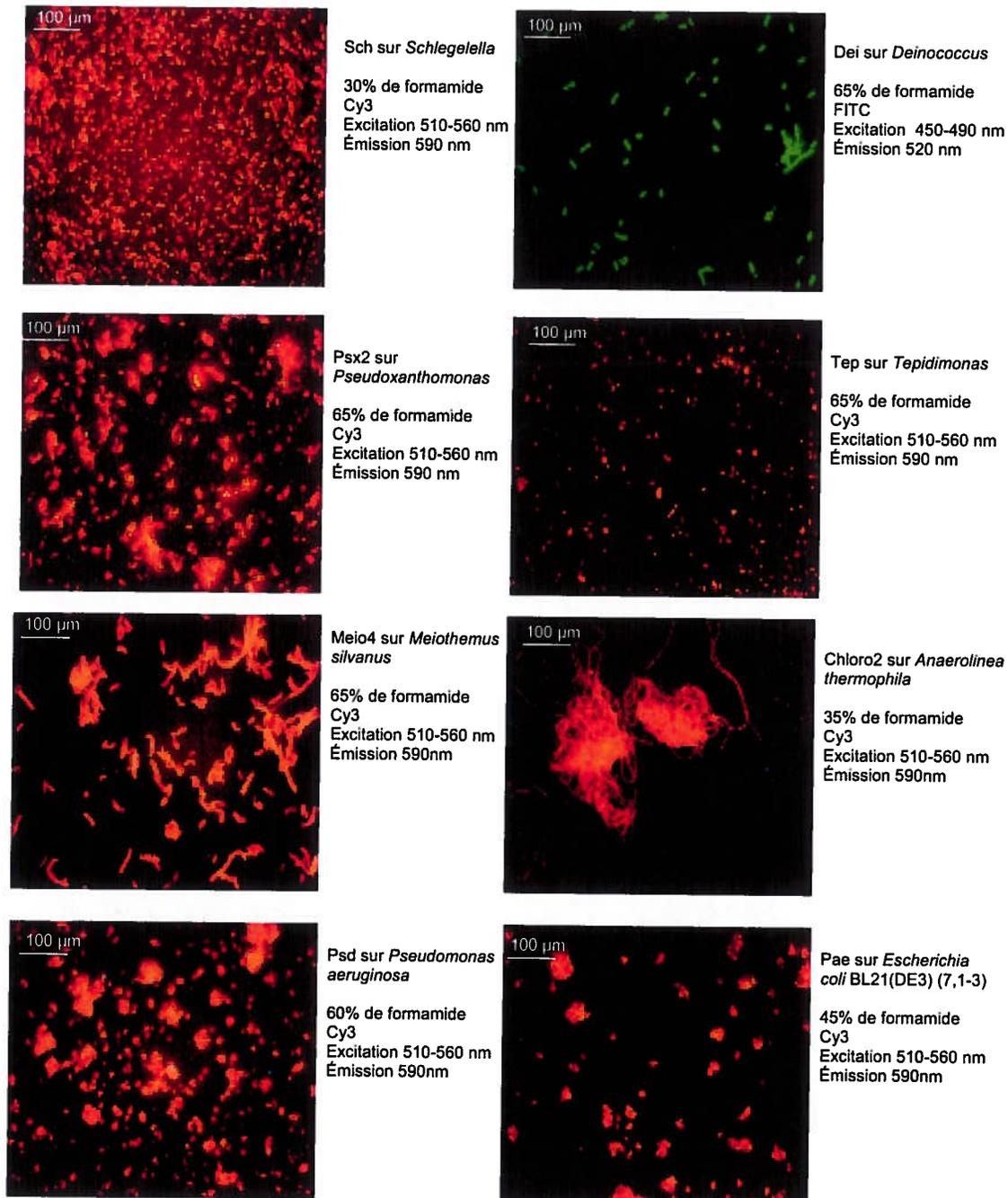


Figure 4.9 : Hybridations spécifiques aux concentrations de formamide optimales propres à chaque sonde. Les photos ont été prises avec une caméra Nikon CoolPix 990 sur un microscope à épifluorescence Nikon E-800.

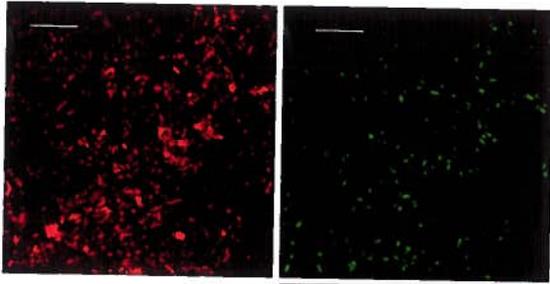
4.5.2 Utilisation des sondes sur les biofilms

Quatre biofilms, récoltés au mois de juillet 2007 sur les machines 7 et 8, ont été sélectionnés pour l'utilisation des sondes spécifiques. Un exemple de photo pour chacune des sondes est présenté à la figure 4.10. Les sondes Chloro2, Tep, Sch et Pxs2 ont générés des signaux à chaque plan focal de chaque échantillon testé. Ainsi, les bactéries ciblées étaient présentes en grand nombre dans les biofilms. Cependant, il a été ardu de trouver des plans focaux permettant la prise d'une photo pour les sondes Meio4, Dei, Psd et Pae.

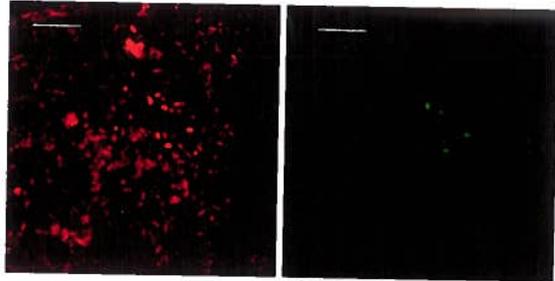
Le tableau 4.V présente les résultats de quantification dans le biofilm, indiqués en ratios. Il s'agit du ratio de la quantité de pixels émis par la sonde spécifique (vert) par rapport à la quantité de pixels émis par la sonde générale (rouge). Ceux-ci n'ont pas été indiqués pour les sondes Dei (*Deinococcus*), Psd (*Pseudomonas*), Meio4 (*Meiothermus*) et Pae (*Paenibacillus*) parce que le ratio était inférieur à 1%. La somme des ratios par machine est indiquée dans la dernière ligne du tableau et montre que ces 4 groupes bactériens sont loin de représenter la totalité de la population des biofilms, ce qui concorde avec les résultats de la gènothèque. Une comparaison entre les résultats de quantification et ceux de la gènothèque est discutée dans la section 5.

Tableau 4.V : Quantification, sur 2 machines à papier, des cibles bactériennes spécifiques. La congruence finale est le degré de chevauchement des pixels émis par le FITC par rapport à ceux émis par le Cy3.

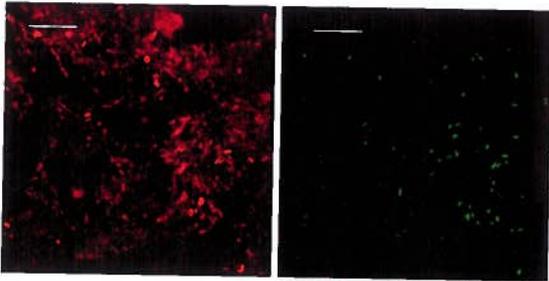
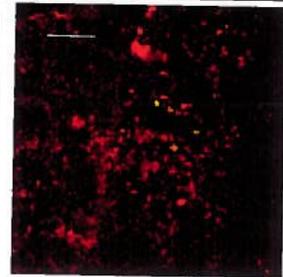
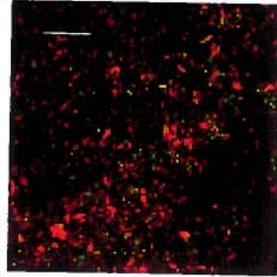
Groupe bactérien	Machine	Ratio (%)	Congruence finale	Nbre de champs analysés
Chloroflexi	7	20,8 ± 10,7	95%	25
	8	22,2 ± 11,1	98%	19
<i>Tepidimonas</i>	7	17,3 ± 5,8	95%	19
	8	7,0 ± 3,9	99%	17
<i>Schlegelella</i>	7	13,1 ± 4,6	95%	19
	8	7,8 ± 2,9	99%	21
<i>Pseudoxanthomonas</i>	7	2,4 ± 2,0	98%	13
	8	2,5 ± 3,0	99%	14
Total	7	53,6 ± 23,1		
	8	39,5 ± 20,9		



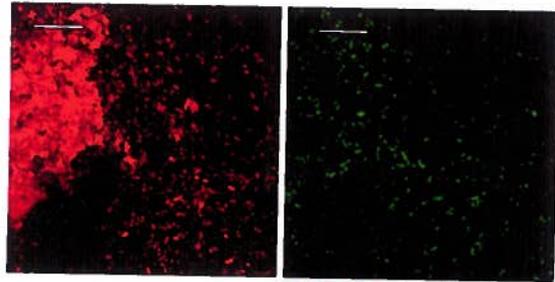
Rouge : EUB (Cy3)
Vert : sonde ciblant
Schlegelella (FITC)
Machine 7



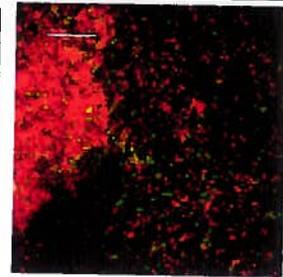
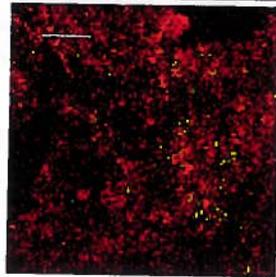
Rouge : EUB (Cy3)
Vert : sonde ciblant
Deinococcus (FITC)
Machine 7



Rouge : EUB (Cy3)
Vert : sonde ciblant
Pseudoxanthomonas
(FITC)
Machine 8



Rouge : EUB (Cy3)
Vert : sonde ciblant
Tepidimonas (FITC)
Machine 7



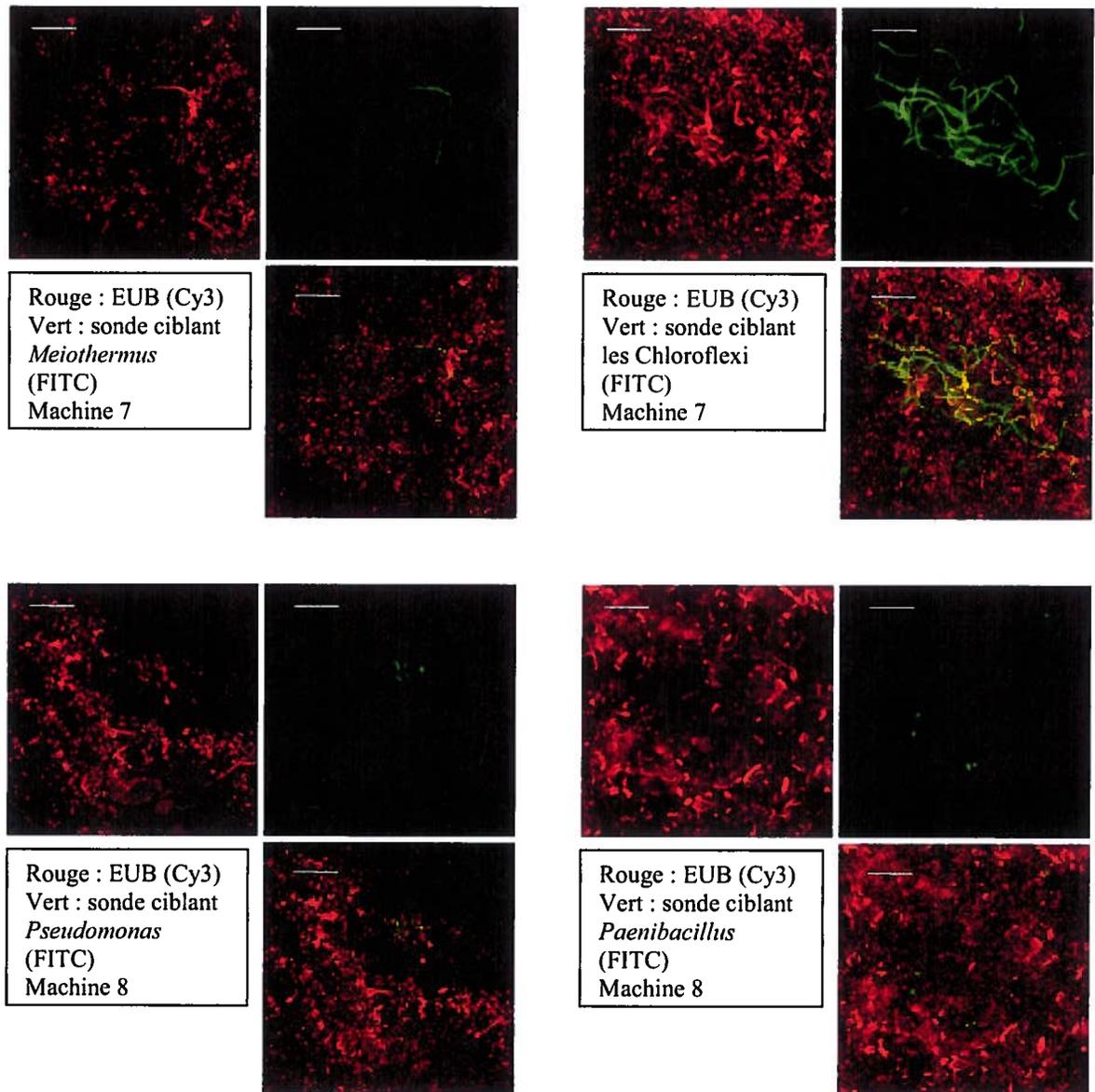


Figure 4.10 : Visualisation, dans le biofilm, des souches bactériennes ciblées par les sondes spécifiques par CARD-FISH. L'image du bas est la fusion de l'image en rouge (excitation : 568 nm, émission : 600/40 nm) et de l'image en vert (excitation : 488 nm, émission : 515/30 nm). Les photos ont été prises avec un microscope à balayage confocal BioRad Radians 2000. Échelle : 15 nm.

5. DISCUSSION

L'objectif global du projet mené à l'Université de Sherbrooke par l'équipe de Carole Beaulieu et Ryszard Brzezinski était de trouver des compétiteurs naturels au sein même de la flore bactérienne d'un biofilm de l'usine de P&P de Domtar à Windsor, QC. En isolant de multiples souches bactériennes des biofilms et de l'eau blanche, ils ont pu tester si une telle capacité de compétition existait dans la flore indigène. Ces compétiteurs devaient être en mesure d'empêcher la formation des biofilms en se ligant contre les espèces dites primaires. Une collaboration a été établie avec Richard Villemur, professeur-chercheur à l'INRS-Institut Armand-Frappier. Sa contribution consistait en la caractérisation et le suivi de la diversité bactérienne des biofilms, ainsi que l'optimisation d'une méthode de visualisation et de quantification des différentes bactéries du biofilm.

5.1 Suivi de la flore bactérienne de l'usine de Windsor par PCR-DGGE

En analysant des échantillons récoltés à des endroits et à des moments différents de l'année 2007 par PCR-DGGE, nous voulions examiner si la flore bactérienne se développant après chaque nettoyage des machines était toujours la même. Dès le premier échantillonnage en janvier 2007 (J1 à J4, figures 4.1 et 4.2), nous avons tout de suite constaté que l'endroit échantillonné était un paramètre influençant fortement la flore bactérienne présente. D'ailleurs, en observant l'arbre de similarité à la figure 4.3, nous avons constaté que même si les profils migratoires des bandes de DGGE de J1 et J2 étaient assez semblables, les profils des échantillons de la machine 8, J3 et J4, étaient différents l'un par rapport à l'autre et par rapport aux échantillons de la machine 7. Cela était attendu vu les caractéristiques particulières de chacun des échantillons (tableau 4.1).

Nous avons poursuivi notre investigation de la même façon au mois de mars 2007. Nous avons tout de suite constaté, comme le montre la figure 4.3, que les profils migratoires étaient différents d'une machine à l'autre pour un même moment d'échantillonnage (M1 et M2). Cette différence s'est aussi avérée vraie pour tous les autres échantillonnages. Au mois d'avril, nous avons échantillonné à deux reprises, à une semaine d'intervalle, pour mieux étudier la variation de la flore bactérienne. Ceux de la machine 7 (A1, A2, A5 et A6) ont semblé avoir conservé une certaine similarité

puisqu'ils se retrouvent dans le même grand embranchement de l'arbre de similarité (figure 4.3). Pourtant, ce ne fut pas le cas pour A3, A4, A7 et A8 (machine 8).

Nous avons donc noté le caractère très complexe de la flore bactérienne des biofilms de l'usine de P&P de Domtar à Windsor. Globalement, les différents échantillons ont montré qu'il y avait une forte diversité de la flore bactérienne avec des dominances sporadiques illustrées par l'intensité des bandes sur DGGE. Certaines bandes étaient présentes chaque mois tandis que d'autres disparaissaient ou s'atténaient avec le temps. Ces variations mensuelles notables pourraient être dues à des changements apportés à l'approvisionnement d'eau fraîche de la rivière ou au type d'additif utilisé pour le papier en cours de production. Cependant, cette hypothèse n'explique pas les différences marquées que nous avons observées parfois pour 2 échantillons prélevés sur la même machine le même jour (par exemple, N3 et N4). Dans ces cas particuliers, il est possible que ce soit des biofilms à des stades différents de leur croissance, stade favorisant plus ou moins certaines espèces particulières.

5.2 Recherche de *Meiothermus* sp.

Les bactéries du genre *Meiothermus* étaient dominantes dans la génothèque faite à partir de l'eau blanche en 2006 par Véronique Prince (tableau 2.I) et sont impliquées dans les biofilms de plusieurs usines de P&P européennes (Ekman *et al.*, 2007). Cependant, elles sont absentes de notre génothèque faite sur les échantillons de biofilm du mois de janvier 2007. Nous avons donc voulu vérifier sa présence par PCR spécifique sur tous les échantillons de l'année 2007. Les résultats ont montré que *Meiothermus* sp. était présent de façon claire dans 7 échantillons sur 33 (figure 4.4) (J4, A3, A4, A5, A6, Jn4 et JI4). Une faible amplification a aussi été notée dans 3 autres échantillons (J1, J3 et N3).

Une étude sur plusieurs souches de *Meiothermus ruber* a démontré que les membres de ce genre sont des bactéries primaires, c'est-à-dire capables de former un biofilm (Kolari *et al.*, 2003). Cela pourrait expliquer sa présence imprévisible ; les espèces primaires ne prédominent pas nécessairement dans le biofilm mature. D'autres espèces peuvent devenir majoritaires lorsque des métabolites des espèces primaires permettent la croissance des espèces secondaires. Si *Meiothermus* sp. a la capacité à survivre avec les nutriments disponibles dans l'eau blanche, cela expliquerait aussi sa dominance dans la

génothèque 16S faite sur l'eau blanche en 2006. Il doit donc y avoir d'autres facteurs modulant la présence ou l'absence de *Meiothermus*. Étant donné que c'est une espèce connue comme étant thermophile, il est possible qu'elle ait été affectée par des changements de température.

Il y a eu amplification PCR dans 3 des 4 échantillons de janvier 2007 (J1 à J4), quoique très faible pour J1 et J3. Pourtant, parmi les clones sélectionnés, dont 77 entièrement séquencés, aucun ne s'affiliait au genre *Meiothermus* (tableau 4.II). Nous aurions sans doute rencontré quelques clones s'affiliant à *Meiothermus* si nous avions sélectionné plusieurs centaines de clones ; il s'agit là d'une des limites des génothèques. Il n'est pas possible d'atteindre 100% de la diversité bactérienne par cette méthode, mais plutôt une bonne représentation de ce qui était le plus abondamment retrouvé dans le biofilm à ce moment précis.

Meiothermus sp. n'a pas pu être observé par microscopie dans deux échantillons de biofilms du mois de juillet 2007, soit un de la machine 7 et un de la machine 8. En se basant sur les hypothèses décrites précédemment, nous pensons qu'il est possible que les échantillons choisis étaient à un stade ou dans des conditions environnantes ne favorisant pas la croissance de ce genre bactérien. La couleur rose/orangé du biofilm de juillet 2007 n'était donc pas un signe de la présence de *Meiothermus* sp.

5.3 Analyse phylogénique de séquences obtenues d'une génothèque 16S

Le séquençage des gènes de l'ARNr 16S des 77 clones représentatifs des 178 clones criblés de notre génothèque a permis de les classer en 15 catégories appartenant à différents niveaux taxonomiques (tableau 4.II) et a permis de les placer dans un arbre phylogénique (figure 4.4).

Les Chloroflexi représentaient près du cinquième des clones (21,3%). L'embranchement des Chloroflexi est divisé en 4 sous-embranchements, dont le premier contient surtout des clones environnementaux, provenant d'environnements très variés. À titre d'exemple, ils ont été retrouvés dans des sources thermales, des boues issues du traitement des eaux usées, des zones aquifères contaminées et plusieurs autres. La première espèce bactérienne du 1^{er} sous-embranchement à avoir été isolée en culture pure est *Anaerolinea thermophila*, d'un réacteur sur lit de boues expansées traitant les eaux

usées d'une usine de tofu de soja au Japon. C'est un organisme anaérobie strict, hétérotrophe, formant de minces filaments, croissant à une température optimale de 55°C et incapable de croître sous 45°C. Leur agencement en filaments pourrait contribuer à maintenir la structure granulaire des boues et à préserver leur volume « bouffant » ou « gonflé » (Sekiguchi *et al.*, 2003). De plus, des études ont proposé qu'ils puissent être responsables de la dégradation de glucides complexes (Kragelund *et al.*, 2007) et d'autres composantes cellulaires comme les acides aminés dans les bioréacteurs (Yamada *et al.*, 2005). Comme le montre la figure 4.5, panneau C, le genre cultivé le plus près des clones est *Anaerolinea*. Si les bactéries vertes non-sulfureuses des biofilms partagent les caractéristiques d'*A. thermophila*, cela pourrait expliquer pourquoi elles n'ont pas été retrouvées dans les eaux blanches. En effet, une bactérie anaérobie stricte ne sera pas abondante dans un milieu très aéré (toujours en circulation), surtout *A. thermophila* qui croît très lentement ; son temps de génération est de 3 jours (Sekiguchi *et al.*, 2003). Leur structure filamenteuse, qui a été observée dans nos biofilms défaits vigoureusement (figure 4.10), pourrait contribuer à l'extrême viscosité des biofilms de l'usine de P&P de Windsor. Étant donné qu'il s'agit d'un environnement très riche en glucides complexes, les Chloroflexi seraient favorisées par rapport aux autres espèces.

Treize clones, ou 17,4% des clones, sont apparentés à l'ordre des Clostridiales. Comme le montre la figure 4.5, panneau A, ces clones sont apparentés à plusieurs espèces différentes, la plupart appartenant au genre *Clostridium*. Même si les Clostridiales sont parmi les clones les plus nombreux, ils n'ont pas été sélectionnés pour être recherchés par CARD-FISH. Cela peut s'expliquer par les caractéristiques de l'échantillon « vieux » (J4) duquel provenait la plupart (24/31) des clones affiliés à cet ordre. Cet échantillon n'était pas représentatif des biofilms problématiques de l'usine. En effet, le tableau 4.I rappelle que J4 était un biofilm sec avec une viscosité presque nulle et qu'il provenait d'un endroit retiré de la machine.

Les *Paenibacillus* sp. sont en troisième position du tableau 4.II avec 12,4% des clones. Membre de l'ordre des Bacillales, ces bactéries à Gram positif sont capables de former des spores. Ainsi, elles peuvent être retrouvées partout. On a pu l'isoler de piqûres de papier (*foxing* : détérioration biotique ou abiotique de la feuille) et démontrer sa capacité cellulolytique (De Paolis et Lippi, 2008). *Paenibacillus* sp. a aussi été retrouvé dans

des produits finis comme le carton (Suihko *et al.*, 2004, Suihko et Stackebrandt, 2003, Suominen *et al.*, 2003) et dans des additifs (Raaska *et al.*, 2002). *Paenibacillus stellifer* a été isolé d'un biofilm d'une usine de P&P (Ratto *et al.*, 2005) (sa capacité à produire des polysaccharides a d'ailleurs été démontrée) et est l'espèce bactérienne pour laquelle les clones de cette étude ont la meilleure affiliation (figure 4.3, panneau B). Il pourrait donc être impliqué dans le biofilm à titre d'utilisateur de la source de carbone principale, la cellulose, et de producteur d'exopolysaccharides.

L'embranchement candidat OP10 (11,8% des clones) se compose presque uniquement de séquences de clones environnementaux provenant de milieux aussi variés qu'une zone aquifère contaminée par des hydrocarbures et des solvants chlorés (Dojka *et al.*, 1998) et qu'un procédé traitement des eaux usées à l'échelle du laboratoire (Crocetti *et al.*, 2002). Une seule espèce a été isolée en culture pure à ce jour (Stott *et al.*, 2008) et elle formait des colonies rose/orangé, tout comme la couleur du biofilm. Aucun clone apparenté aux OP10 n'a d'ailleurs été détecté dans le seul échantillon de biofilm de couleur blanche (parmi ceux utilisés pour la génothèque), J3 (tableau 4.II).

L'ordre des Burkholderiales représente 10,1% des clones. À première vue, ils étaient totalement absents de la banque de clones de l'eau blanche, mais en réalité ils la dominent. En effet, les genres *Schlegelella*, *Leptothrix* et *Tepidimonas* appartiennent à l'ordre des Burkholderiales et totalisent 38,5% des clones en février 2006 et 35% des clones en janvier 2006. Cependant, comme le montre l'arbre phylogénique de la figure 4.5, panneau A, les clones de cette étude s'affilient surtout au genre *Aquabacterium*. Il a été retrouvé récemment dans un consortium bactérien dégradant les OPE (esters organophosphorés) chlorés à 30°C (Takahashi *et al.*, 2008). Dans le cas des biofilms des usines de P&P, les Burkholderiales pourraient utiliser par leur métabolisme les différentes molécules organiques plus difficilement assimilables, provenant des adjuvants ou résultant du blanchiment de la pâte.

Tel que décrit dans la section 2.3.2, le genre *Deinococcus* est connu depuis longtemps comme producteur de biofilms colorés dans les industries des P&P (Kolari *et al.*, 2001, Peltola *et al.*, 2008, Raulio *et al.*, 2006, Saarimaa *et al.*, 2006, Vaisanen *et al.*, 1998). Il a été retrouvé dans le biofilm avec 9,6% des clones. L'équipe du Pr Beaulieu a d'ailleurs été capable d'isoler une de ces souches et de la cultiver. Cependant, il ne semble pas être

dominant et n'a d'ailleurs pas pu, tout comme *Meiothermus*, être observé dans le biofilm de juillet par CARD-FISH. Absent de la génothèque de l'eau blanche et peu présent dans celle des biofilm de l'usine de Windsor, *Deinococcus* n'est possiblement pas aussi important que dans les usines européennes.

Les nombreux autres résultats obtenus de la génothèque des biofilms de janvier 2007 présentés dans le tableau 4.II montrent à quel point la diversité bactérienne y est grande. Ces résultats corroborent ceux obtenus par PCR-DGGE. Il aurait été possible d'obtenir une diversité encore plus importante en criblant plus de clones ; les résultats des PCR spécifiques à *Meiothermus* le démontrent. En effet, nous avons montré sa présence dans le biofilm de janvier par PCR spécifique mais il était absent de la génothèque issue du même biofilm. Néanmoins, notre étude donne une bonne idée des bactéries les plus déterminantes au moment de l'échantillonnage. L'objectif de la génothèque était de pouvoir concevoir des sondes pour les bactéries dominantes et nous pensons avoir atteint l'objectif en criblant 178 clones.

Lorsque nous comparons les résultats de la génothèque de l'eau blanche (tableau 2.I) et celle des biofilms de janvier 2007, le premier constat est que les clones de l'eau blanche ont tous pu être affiliés à des genres bactériens ayant déjà crû en culture pure tandis que les clones des biofilms ont pu être identifiés, pour la plupart, à des niveaux taxonomiques supérieurs au genre, allant aussi haut qu'à l'embranchement (exemple : Chloroflexi). Il est possible que les bactéries colonisant le biofilm soient présentes dans l'eau blanche en si faible proportion qu'elles n'aient jamais été cultivées, ou requièrent des conditions n'ayant pas pu être déterminées à ce jour. Ce pourrait être le cas, entre autres, des Chloroflexi.

5.4 Étude de la diversité bactérienne de différentes usines de P&P du Québec

La diversité bactérienne de 3 autres usines de P&P du Québec a été étudiée par PCR-DGGE. Ces trois usines n'utilisant pas le même type de fibre ni le même type de procédé de mise en pâte (tableau 4.II) que l'usine de Domtar à Windsor, il était attendu d'avoir une diversité différente puisque les nutriments disponibles influencent fortement le type d'espèces colonisatrices. Bien entendu, la source d'eau est aussi un facteur

déterminant. Ces 4 usines ne puisent pas leur eau dans à la même source et leurs sources de contamination internes peuvent aussi être différentes.

Les figures 4.6 et 4.7 montrent que le profil bactérien n'était pas typique d'une usine, mais plutôt de l'emplacement dans une usine. Les échantillons KF1 et KF2, provenant tous deux de la machine 3, avaient des profils très similaires avec toutefois des changements importants dans l'intensité de plusieurs bandes. Par contre, les biofilms provenant des machines 1 (KF3) et 2 (KF4) avaient des profils différents. Cependant, comme nous l'avons aussi constaté pour les échantillons de Windsor, les biofilms provenant de la même machine le même jour ne présentaient pas toujours un profil semblable. C'est aussi le cas pour les échantillons de Clermont, prélevés sur la même machine. L'arbre de similarité (figure 4.7) montre à quel point ils sont dissemblables. Quant aux profils bactériens des échantillons D1 et D2 (Drummondville), provenant tous deux du turbodrain, ils sont très semblables entre eux, mais également avec celui de l'échantillon KF3.

5.5 Correspondance de bandes extraites de DGGE

Pour estimer rapidement quelles sont les espèces bactériennes présentes dans les 4 usines de P&P, la séquence des fragments d'ADN séparés par DGGE a été déterminée. Les fragments choisis proviennent des bandes récurrentes ou particulièrement intenses sur les DGGE (tableau 4.IV). Quoique moins précis pour déterminer l'affiliation des bactéries (pouvant être faite jusqu'au genre au mieux), cela a néanmoins été suffisant pour faire des comparaisons avec les séquences ressorties dans les génothèques.

Des 40 extractions, 14 séquences se sont affiliées aux Bacteroidetes mais la diversité s'est limitée à 3 hauteurs de bandes distinctes dans le gel de la figure 4.6 (KF, C et D) et 4 hauteurs de bandes distinctes dans celui de la figure 4.8 (Windsor). Des séquences de clones provenant d'usines de P&P et appartenant au Bacteroidetes ont déjà été identifiées (Lahtinen *et al.*, 2006). En observant les bandes correspondantes dans les autres puits que ceux d'où les bandes ont été extraites, nous constatons que les Bacteroidetes étaient souvent présents mais que les bandes variaient en intensité. Il est intéressant de noter que l'embranchement n'a pas ressorti dans la génothèque alors que

les bandes correspondantes étaient présentes dans les échantillons J1 à J4 (figures 4.1 et 4.2).

Les séquences de 10 bandes étaient affiliées aux β -Protéobactéries. Dans les deux gels (figures 4.6 et 4.8), 3 hauteurs de bandes distinctes y correspondaient. Les figures 4.1 et 4.2 montrent que les bandes situées à la même hauteur que celles identifiées comme appartenant à *Tepidimonas* dans la figure 4.8 (numérotées 19, 27, 30 et 32) sont présentes dans presque tous les puits. Ceci suggère que des espèces appartenant à ce genre se retrouvent dans ces échantillons. Les analyses de CARD-FISH ont aussi démontré qu'il était présent dans les biofilms de juillet 2007 (section suivante). À ce jour, différentes espèces du genre *Tepidimonas* ont été isolées d'une source thermale (Chen *et al.*, 2006, Moreira *et al.*, 2000), d'un spa public (Albuquerque *et al.*, 2006) et d'un réservoir d'eau chaude domestique (Freitas *et al.*, 2003). Les conditions (température, humidité) rencontrées dans les usines de P&P seraient donc propices au développement de ces espèces.

La séquence des autres bandes d'ADN extraites des DGGE a permis l'affiliation à plusieurs autres embranchements bactériens. Les 4 bandes provenant des échantillons de l'usine de Clermont contenaient de l'ADN s'affiliant à 3 embranchements bactériens, soient Bacteroidetes, Firmicutes (Clostridia) et Acidobactéries. Quant à l'usine de Drummondville, les bandes extraites appartenaient aux Protéobactéries (α , β et γ). Les Acidobactéries n'ont pas été identifiées ni dans les génothèques de Windsor, ni par isolement en culture pure.

Dans le cas de l'usine de Domtar, les différents embranchements rencontrés sont les suivants : Protéobactéries (7 β - et 1 δ -), Bacteroidetes (5), Bacteroidetes ou Chlorobi (la séquence n'a pas permis d'en faire la distinction) (5), Firmicutes (Bacilli) (3), Chloroflexi (2), Spirochaetes (2) et Deinococcus-Thermus (1). Outre les Bacteroidetes qui ont déjà été discutés, le seul groupe qui n'avait jamais été rencontrés dans les autres volets de l'étude sont les Spirochaetes. Étant donné que les bandes correspondantes de la figure 4.8 (numérotées 17 et 28) semblent presque alignées avec les bandes 4 et 13 (Burkholderiales), il est difficile de juger si les Spirochaetes sont présentes en tout temps ou non. Il aurait fallu faire un nouveau gel avec un gradient plus restreint (par exemple, 40 à 70% de d'agents dénaturants) pour pouvoir mieux séparer les bandes.

5.6 Visualisation de la flore bactérienne du biofilm par CARD-FISH

Bien que les résultats des génothèques faites sur l'eau blanche en 2006 et sur les biofilms de janvier 2007 donnent une quantité importante d'information sur la composition de la flore bactérienne de l'usine de Domtar à Windsor, il a fallu faire un choix sur les sondes à concevoir pour les essais de CARD-FISH.

En concertation avec l'équipe de Carole Beaulieu à l'Université de Sherbrooke, nous avons choisi de rechercher 5 genres ayant ressorti dans l'eau blanche (*Meiothermus*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella* et *Tepidimonas*). Nous avons voulu suivre ceux qui représentaient les plus grands pourcentages des clones, comme *Meiothermus* et les Burkholderiales (*Schlegelella* et *Tepidimonas*). Nous étions aussi curieux de voir si *Meiothermus* tenaient une place aussi importante que dans certains biofilms d'usines de P&P européennes (Ekman *et al.*, 2007). Les γ -Protéobactéries (*Pseudomonas* et *Pseudoxanthomonas*) étaient représentées de façon importante lors de tests d'isolements en culture pure (Desjardins et Beaulieu, 2003). Les genres trop faiblement représentés ont été mis de côté (*Geobacillus*, *Hydrogenophilus* et *Rhizobium*).

Des résultats des génothèques des biofilms de janvier 2007, nous avons choisi l'embranchement des Chloroflexi, parce qu'ils étaient de loin les plus abondants, ainsi que *Paenibacillus* et *Deinococcus*, parce qu'ils étaient parmi les plus abondants et aussi décrits comme contaminants des machines à papier. Nous n'avons pas étudié les Clostridiales puisque le biofilm duquel ils provenaient majoritairement n'était pas représentatif des biofilms problématiques (section 5.2). Les Burkholderiales étaient déjà étudiées grâce aux sondes ciblant *Schlegelella* et *Tepidimonas*. Les OP10 ont aussi été mis de côté à cause de la diversité des séquences obtenus qui rendaient difficile la conception d'une sonde commune.

Comme le montre la figure 4.9, les sondes ont toutes pu être optimisées en CARD-FISH avec des espèces en culture pure ou par clone-FISH dans le cas de la sonde ciblant *Paenibacillus*. Plusieurs contrôles ont été effectués pour s'assurer de la spécificité des sondes (résultats non montrés). Entre autres, nous nous sommes assurés de l'absence d'hybridation croisée en testant chaque sonde sur chaque souche ou sur des mélanges de souches. Les conditions d'hybridation ont aussi été optimisées de façon à réduire le bruit de fond au minimum.

Dans le cas des tests effectués sur les biofilms, le bruit de fond était toujours présent à cause de l'auto-fluorescence naturelle de la pâte (constituant majeur d'un biofilm), mais nous avons pu la réduire en triturant les biofilms le plus possible avec un homogénéisateur de type Potter. Cela améliorerait aussi l'adhésion des biofilms sur les lames pendant les différentes étapes de l'expérimentation. Nous nous sommes assurés que le bruit de fond généré par la sonde NON n'était pas supérieur au bruit de fond généré par la tyramide lorsqu'aucune sonde n'était utilisée. Nous avons ainsi pu déterminer que nos conditions de lavages suite à l'hybridation n'augmentaient pas le bruit de fond.

Le tableau 4.V présente les résultats de quantification du signal sur 4 échantillons de biofilm du mois de juillet 2007 (2 de la machine 7 et 2 de la machine 8). Les résultats obtenus pour les sondes ciblant *Deinococcus*, *Meiothermus*, *Pseudomonas* et *Paenibacillus* sont exclus du tableau parce qu'inférieurs à 1%. Dans le cas de *Meiothermus*, les résultats obtenus par PCR montrent bien que sa présence était imprévisible, suggérant une faible concentration de ces espèces dans le biofilm. Quant au genre *Deinococcus*, il ne semble pas être dominant dans les biofilms, même si 9,6% des clones s'y affiliaient en janvier. Selon les DGGE, la flore bactérienne était changeante de mois en mois. Il est possible que la proportion de *Deinococcus* fût élevée en janvier, mais a chuté durant l'année. Seules de rares cellules de *Pseudomonas* ont pu être observées, et seulement sur la machine 8. La génothèque et les bandes découpées de DGGE ont laissé croire que les γ -Protéobactéries domineraient plus l'eau blanche que les biofilms. Cela semble être le cas de *Pseudomonas*. Il est possible que si *Paenibacillus* était présent dans le biofilm, c'est sous forme de spore. Si tel est le cas, le protocole de perméabilisation des cellules ne permettait probablement pas l'entrée de la sonde. Il aurait été essentiel de tester la sonde Pae sur des cellules de *Paenibacillus* dans différents états physiologiques. Nous ne pouvons donc pas poser d'hypothèse sur sa présence ou son absence dans les biofilms de juillet 2007.

Les résultats obtenus pour les Chloroflexi, *Tepidimonas*, *Schlegelella* et *Pseudoxanthomonas* ont des écarts type très élevés, ce qui est habituel pour ce type de quantification (Labbe *et al.*, 2007, Miura et Okabe, 2008, Sekar *et al.*, 2003). Dans le cas de *Pseudoxanthomonas* (machine 8), l'écart type est même supérieur au ratio ($2,5 \pm 3,0$). La photo de *Pseudoxanthomonas* présentée à la figure 4.10 montre est l'un des champs

examinés qui générerait le plus de signal. Cependant, la très petite taille de *Pseudoxanthomonas* fait en sorte que même s'il y a beaucoup de cellule, le ratio de la biomasse Psx/EUB est très faible. Il est donc possible que le problème de l'écart type aurait persisté malgré une grande quantité de photos analysées. Il a d'ailleurs été étonnant de trouver « autant » (en quantité absolue de cellules) de *Pseudoxanthomonas* vu son absence de la génothèque et des bandes découpées de DGGE. Encore une fois, l'utilisation de 3 méthodes différentes d'étude de la diversité bactérienne montre son utilité. Dans la génothèque de l'eau blanche, *Pseudoxanthomonas* est passé de 3,5% à 10% en 5 mois. Il est possible que la concentration de celui-ci ait varié d'un biofilm à l'autre, comme semble l'indiquer les résultats de DGGE pour la plupart des espèces.

Selon les résultats du tableau 4.V, les Burkholderiales (*Tepidimonas* et *Schlegelella*) dominaient les biofilms de juillet avec $30,4 \pm 10,4\%$ pour la machine 7 et $14,8 \pm 6,8\%$ pour la machine 8. Dans la génothèque de l'eau blanche, ils représentaient 38,5% des clones en février et 45% des clones en juillet. Dans la génothèque du biofilm, ils représentaient 10,1% des clones. Nous pouvons donc conclure que, selon nos résultats, les membres de la classe des Burkholderiales étaient impliqués dans l'usine de P&P à tout moment de l'année et dans tous les échantillons.

Les Chloroflexi étaient présents à environ 20% pour chacune des machines, ce qui correspond au pourcentage obtenu pour la génothèque des biofilms. Nous avons observé dans la figure 4.10 que malgré le traitement effectué pour défaire les biofilms, les filaments de Chloroflexi restaient bien attachés ensembles, ce qui supporte l'hypothèse sur leur implication dans la viscosité des biofilms (section 5.3).

Une fraction importante (environ 40%) de la biomasse n'a pas été détectée par CARD-FISH. Elle pourrait être attribuée aux groupes bactériens pour lesquelles nous n'avons pas de sonde spécifique (Clostridiales, autres Burkholderiales, OP10, spores de *Paenibacillus* ou d'*Exiguobacterium*) ou à des bactéries non-détectées par nos méthodes. Cependant, la comparaison des résultats d'une génothèque et d'une quantification avec la méthode du CARD-FISH doit être faite avec prudence. En effet, les résultats d'une génothèque dépendent du le nombre de gènes de l'ARNr 16S dans une biomasse donnée tandis que la quantification CARD-FISH peut être influencée par la grosseur des cellules. À titre d'exemple, la quantité de pixels comptabilisés dans une seule cellule de

Chloroflexi est grandement supérieure à celle d'une seule cellule de *Pseudoxanthomonas*. Il s'agit donc d'une distorsion de la méthode de quantification FISH par pixel, qui sous-entend que toutes les cellules émettant de la lumière fluorescente ont la même taille. Pour mieux comparer les résultats de nos deux méthodes (généothèque et CARD-FISH), il aurait été nécessaire de normaliser la quantité de fluorescence obtenue par unité de surface des cellules. Le logiciel utilisé doit donc permettre la mesure de la surface des cellules. Ensuite, pour préciser encore plus le résultat obtenu, il faudrait prendre des clichés en 3 dimensions et étudier les images dans un plan xyz .

6. CONCLUSION

En conclusion, nous avons noté, par la méthode du PCR-DGGE, le caractère très complexe de la flore bactérienne des biofilms de l'usine de P&P de Domtar à Windsor. Globalement, les différents échantillons ont montré qu'il y avait une forte diversité de la flore bactérienne avec des dominances sporadiques illustrées par l'intensité des bandes sur DGGE. Des PCR spécifiques ont montré que *Meiothermus* sp. est présent dans 7 échantillons sur 33. Sa présence fortuite pourrait être due au fait que c'est une bactérie primaire qui ne survivrait possiblement pas au cours de la maturation du biofilm. Le séquençage des gènes de l'ARNr 16S des 77 clones représentatifs des 178 clones criblés de notre génothèque a permis de les classer en 15 catégories appartenant à différents niveaux taxonomiques. Les Chloroflexi, représentant près du cinquième des clones (21,3%), pourraient contribuer, par leur agencement en filaments, à maintenir la structure visqueuse des biofilms. La diversité bactérienne de 3 autres usines de P&P du Québec, n'utilisant pas le même procédé qu'à Windsor, a été étudiée par PCR-DGGE. Comme pour l'usine de Windsor, le profil bactérien n'était pas typique d'une usine mais plutôt de l'emplacement dans une usine.

À partir des résultats des génothèques faites sur l'eau blanche et les biofilms, nous avons conçu 8 sondes spécifiques. Un protocole de CARD-FISH a été optimisé et chaque cible bactérienne a pu être visualisée. La quantification par pixel des images de microscopie confocale nous a permis de comparer nos résultats de génothèque de janvier 2007 à des biofilms récoltés en juillet 2008. Les Chloroflexi étaient dominants dans nos analyses de CARD-FISH (20,8% pour la machine 7 et 22,2% pour la machine 8) comme dans notre génothèque (21,3%).

Notre hypothèse de départ était de suivre la diversité bactérienne des biofilms de l'usine de Domtar à Windsor en utilisant des outils de biologie moléculaire. En combinant les DGGE, la création d'une génothèque et l'analyse par CARD-FISH, nous avons identifié plusieurs types bactériens qui n'avaient pas été retrouvés dans les biofilms par des méthodes traditionnelles d'isolement sur pétri.

Dans une perspective d'avenir, la méthode développée au cours de ce projet pourrait permettre de mesurer l'impact des microorganismes compétiteurs étudiés à

l'Université de Sherbrooke sur des biofilms de laboratoire et des biofilms des usines. D'autres sondes pourraient être développées et des expériences de CARD-FISH permettraient d'étudier la flore affectée par ces bactéries inhibitrices de formation des biofilms.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Albuquerque, L., Tiago, I., Verissimo, A. et da Costa, M. S.** (2006) *Tepidimonas thermarum* sp. nov., a new slightly thermophilic betaproteobacterium isolated from the Elisenquelle in Aachen and emended description of the genus *Tepidimonas*. *Syst Appl Microbiol* 29 (6): 450-456.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. et Stahl, D. A.** (1990a) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56 (6): 1919-1925.
- Amann, R. I., Krumholz, L. et Stahl, D. A.** (1990b) Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental-Studies in Microbiology. *J Bacteriol* 172 (2): 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W. et Schleifer, K. H.** (1995) Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiol Rev* 59 (1): 143-169.
- Behrens, S., Fuchs, B. M., Mueller, F. et Amann, R.** (2003) Is the in situ accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30S ribosomal subunit? *Appl Environ Microbiol* 69 (8): 4935-4941.
- Biermann, C. J.** (1996) *Handbook of Pulping and Papermaking*, Second Edition. Academic Press, San Diego, California, 754 p.
- Bjornsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G. W. et Blackall, L. L.** (2002) Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology* 148 (Pt 8): 2309-2318.
- Blanco, M. A., Negro, C., Gaspar, I. et Tijero, J.** (1996) Slime problems in the paper and board industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 46 (3): 203-208.
- Boles, B. R., Thoendel, M. et Singh, P. K.** (2004) Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (47): 16630-16635.
- Caiazza, N. C., Merritt, J. H., Brothers, K. M. et O'Toole, G. A.** (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 189 (9): 3603-3612.

- Caiazza, N. C. et O'Toole, G. A.** (2004) SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 186 (14): 4476-4485.
- Chaudhary, A., Gupta, L. K., Gupta, J. K. et Banerjee, U. C.** (1998) Levanases for control of slime in paper manufacture. *Biotechnol Adv* 16 (5-6): 899-912.
- Chen, T. L., Chou, Y. J., Chen, W. M., Arun, B. et Young, C. C.** (2006) *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring. *Extremophiles* 10 (1): 35-40.
- Costerton, J. W.** (2007) The biofilm primer. Springer, Berlin ; New York, viii, 199 p.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. et Lappin-Scott, H. M.** (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. et Greenberg, E. P.** (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (5418): 1318-1322.
- Crocetti, G. R., Banfield, J. F., Keller, J., Bond, P. L. et Blackall, L. L.** (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* 148 (Pt 11): 3353-3364.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. H. et Wagner, M.** (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 22 (3): 434-444.
- Daims, H., Lucker, S. et Wagner, M.** (2006) daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ Microbiol* 8 (2): 200-213.
- De Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C. et Iglewski, B. H.** (2001) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 67 (4): 1865-1873.
- De Paolis, M. R. et Lippi, D.** (2008) Use of metabolic and molecular methods for the identification of a *Bacillus* strain isolated from paper affected by foxing. *Microbiol Res* 163 (2): 121-131.
- Desjardins, E. et Beaulieu, C.** (2003) Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30 (3): 141-145.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T. L. et Massana, R.** (2001) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* 67 (7): 2942-2951.

Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K. et Pace, N. R. (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 64 (10): 3869-3877.

Domtar (2008) <http://www.domtar.com/fr/index.asp>, 3 juin 2008.

Domtar (novembre 2006) Rapport sur la croissance durable 2006.

Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. et Bottger, E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17 (19): 7843-7853.

Ehrlich, G. D., Hu, F. Z., Shen, K., Stoodley, P. et Post, J. C. (2005) Bacterial plurality as a general mechanism driving persistence in chronic infections. *Clin Orthop Relat Res* (437): 20-24.

Ekman, J., Kosonen, M., Jokela, S., Kolari, M., Korhonen, P. et Salkinoja-Salonen, M. (2007) Detection and quantitation of colored deposit-forming *Meiothermus* spp. in paper industry processes and end products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34 (3): 203-211.

EnvironnementCanada (1996) Les établissements industriels : faits saillants. Fiche 95: Papiers Domtar Centre d'affaires Windsor, http://www.slv2000.qc.ec.gc.ca/bibliotheque/centre_docum/protection/095_f.pdf.

Freitas, M., Rainey, F. A., Nobre, M. F., Silvestre, A. J. et da Costa, M. S. (2003) *Tepidimonas aquatica* sp. nov., a new slightly thermophilic beta-proteobacterium isolated from a hot water tank. *Syst Appl Microbiol* 26 (3): 376-381.

Fuchs, B. M., Glockner, F. O., Wulf, J. et Amann, R. (2000) Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 66 (8): 3603-3607.

Fux, C. A., Shirliff, M., Stoodley, P. et Costerton, J. W. (2005) Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? *Trends Microbiol* 13 (2): 58-63.

Hall, T. A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.

Hugenholtz, P., Tyson, G. W., Webb, R. I., Wagner, A. M. et Blackall, L. L. (2001) Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol* 67 (1): 411-419.

Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A. et Wagner, M. (2002) The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol* 25 (1): 84-99.

- Klahre, J. et Flemming, H. C.** (2000) Monitoring of biofouling in papermill process waters. *Water Res* 34 (14): 3657-3665.
- Kolari, M., Nuutinen, J., Rainey, F. A. et Salkinoja-Salonen, M. S.** (2003) Colored moderately thermophilic bacteria in paper-machine biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30 (4): 225-238.
- Kolari, M., Nuutinen, J. et Salkinoja-Salonen, M. S.** (2001) Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27 (6): 343-351.
- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Kong, Y., van der Waarde, J., Krooneman, J., Rossetti, S., Thomsen, T. R. et Nielsen, P. H.** (2007) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol* 59 (3): 671-682.
- Labbe, N., Juteau, P., Parent, S. et Villemur, R.** (2003) Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the montreal biodome, Canada. *Microb Ecol* 46 (1): 12-21.
- Labbe, N., Laurin, V., Juteau, P., Parent, S. et Villemur, R.** (2007) Microbiological community structure of the biofilm of a methanol-fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms. *Microb Ecol* 53 (4): 621-630.
- Lacorte, S., Latorre, A., Barcelo, D., Rigol, A., Malmqvist, A. et Welander, T.** (2003) Organic compounds in paper-mill process waters and effluents. *Trends Analyt Chem* 22 (10): 725-737.
- Lahtinen, T., Kosonen, M., Tiirola, M., Vuento, M. et Oker-Blom, C.** (2006) Diversity of bacteria contaminating paper machines. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33 (9): 734-740.
- Lewis, K.** (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (4): 999-1007.
- Loy, A., Maixner, F., Wagner, M. et Horn, M.** (2007) probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res* 35: D800-D804.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. et Schleifer, K. H.** (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32 (4): 1363-1371.

Miura, Y. et Okabe, S. (2008) Quantification of cell specific uptake activity of microbial products by uncultured Chloroflexi by microautoradiography combined with fluorescence in situ hybridization. *Environ Sci Technol* 42 (19): 7380-7386.

Moreira, C., Rainey, F. A., Nobre, M. F., da Silva, M. T. et da Costa, M. S. (2000) *Tepidimonas ignava* gen. nov., sp. nov., a new chemolithoheterotrophic and slightly thermophilic member of the beta-Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 2: 735-742.

Muyzer, G., de Waal, E. C. et Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59 (3): 695-700.

Nubel, U., Bateson, M. M., Vandieken, V., Wieland, A., Kuhl, M. et Ward, D. M. (2002) Microscopic examination of distribution and phenotypic properties of phylogenetically diverse Chloroflexaceae-related bacteria in hot spring microbial mats. *Appl Environ Microbiol* 68 (9): 4593-4603.

Ouverney, C. C. et Fuhrman, J. A. (1997) Increase in Fluorescence Intensity of 16S rRNA In Situ Hybridization in Natural Samples Treated with Chloramphenicol. *Appl Environ Microbiol* 63 (7): 2735-2740.

Pellegrin, V., Juretschko, S., Wagner, M. et Cottenceau, G. (1999) Morphological and biochemical properties of a *Sphaerotilus* sp. Isolated from paper mill slimes. *Appl Environ Microbiol* 65 (1): 156-162.

Peltola, M., Neu, T. R., Raulio, M., Kolari, M. et Salkinoja-Salonen, M. S. (2008) Architecture of *Deinococcus geothermalis* biofilms on glass and steel: a lectin study. *Environ Microbiol* 10 (7): 1752-1759.

Pernthaler, A. et Pernthaler, J. (2007) Fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microbes. *Methods Mol Biol* 353: 153-164.

Raaska, L., Sillanpaa, J., Sjoberg, A. M. et Suihko, M. L. (2002) Potential microbiological hazards in the production of refined paper products for food applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28 (4): 225-231.

Ratto, M., Suihko, M. L. et Siika-aho, M. (2005) Polysaccharide-producing bacteria isolated from paper machine slime deposits. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32 (3): 109-114.

Raulio, M., Pore, V., Areva, S., Ritala, M., Leskela, M., Linden, M., Rosenholm, J. B., Lounatmaa, K. et Salkinoja-Salonen, M. (2006) Destruction of *Deinococcus geothermalis* biofilm by photocatalytic ALD and sol-gel TiO₂ surfaces. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33 (4): 261-268.

- Saarimaa, C., Peltola, M., Raulio, M., Neu, T. R., Salkinoja-Salonen, M. S. et Neubauer, P.** (2006) Characterization of adhesion threads of *Deinococcus geothermalis* as type IV pili. *J Bacteriol* 188 (19): 7016-7021.
- Sauer, K. et Camper, A. K.** (2001) Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* 183 (22): 6579-6589.
- Schonhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. et Amann, R.** (1997) Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl Environ Microbiol* 63 (8): 3268-3273.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T. et Amann, R.** (2003) An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 69 (5): 2928-2935.
- Sekiguchi, Y., Yamada, T., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. et Kamagata, Y.** (2003) *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. *Int J Syst Evol Microbiol* 53 (Pt 6): 1843-1851.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S. et Myers, R. M.** (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1): 232-236.
- Smook, G. A.** (1998) Manuel du technicien et de la technicienne en pâtes et papier, Deuxième édition. Centre collégial du développement de matériel didactique (CCDMD), Montréal (Québec), 443 p.
- Spoering, A. L. et Lewis, K.** (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 183 (23): 6746-6751.
- Stott, M. B., Crowe, M. A., Mountain, B. W., Smirnova, A. V., Hou, S., Alam, M. et Dunfield, P. F.** (2008) Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environ Microbiol* 10 (8): 2030-2041.
- Suihko, M. L., Sinkko, H., Partanen, L., Mattila-Sandholm, T., Salkinoja-Salonen, M. et Raaska, L.** (2004) Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. *J Appl Microbiol* 97 (6): 1228-1235.
- Suihko, M. L. et Stackebrandt, E.** (2003) Identification of aerobic mesophilic bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibres. *J Appl Microbiol* 94 (1): 25-34.

- Suominen, I., Sproer, C., Kampfer, P., Rainey, F. A., Lounatmaa, K. et Salkinoja-Salonen, M.** (2003) *Paenibacillus stellifer* sp. nov., a cyclodextrin-producing species isolated from paperboard. *Int J Syst Evol Microbiol* 53 (Pt 5): 1369-1374.
- Takahashi, S., Kawashima, K., Kawasaki, M., Kamito, J., Endo, Y., Akatsu, K., Horino, S., Yamada, R. H. et Kera, Y.** (2008) Enrichment and characterization of chlorinated organophosphate ester-degrading mixed bacterial cultures. *J Biosci Bioeng* 106 (1): 27-32.
- Torres, C. E., Gibello, A., Nande, M., Martin, M. et Blanco, A.** (2008) Fluorescent in situ hybridization and flow cytometry as tools to evaluate the treatments for the control of slime-forming enterobacteria in paper mills. *Appl Microbiol Biotechnol* 78 (5): 889-897.
- Vaisanen, O. M., Weber, A., Bennasar, A., Rainey, F. A., Busse, H. J. et Salkinoja-Salonen, M. S.** (1998) Microbial communities of printing paper machines. *J Appl Microbiol* 84 (6): 1069-1084.
- Wallner, G., Amann, R. et Beisker, W.** (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14 (2): 136-143.
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A. et Harada, H.** (2005) Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. *Appl Environ Microbiol* 71 (11): 7493-7503.
- Zhao, T., Doyle, M. P. et Zhao, P.** (2004) Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 70 (7): 3996-4003.
- Zuo, R.** (2007) Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 76 (6): 1245-1253.

