

## **NOTE TO USERS**

**This reproduction is the best copy available.**

**UMI<sup>®</sup>**



**LE SYSTÈME BIOLOG ET L'ANALYSE ARDRA « ANALYSE DES FRAGMENTS  
DE RESTRICTION DE L'ADN RIBOSOMAL AMPLIFIÉ » COMME OUTILS POUR  
ANALYSER LA BIODIVERSITÉ DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES DANS  
LES EAUX DE PROCÉDÉS DES MACHINES À PAPIER**

par

Véronique Prince

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

**FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2010



Library and Archives  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-63009-9  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-63009-9

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

Le 26 janvier 2010

*le jury a accepté le mémoire de Madame Véronique Prince  
dans sa version finale.*

**Membres du jury**

**Professeure Carole Beaulieu  
Directrice de recherche  
Département de biologie**

**Professeur Ryszard Brzezinski  
Membre  
Département de biologie**

**Professeur François Malouin  
Président rapporteur  
Département de biologie**

## SOMMAIRE

L'industrie des pâtes et papier est un environnement favorable pour la croissance des microorganismes puisqu'il offre les conditions essentielles à leur développement tel que d'abondantes sources d'eau et de nutriments. Les communautés microbiennes retrouvées dans les papeteries peuvent varier grandement d'une usine à l'autre puisque chaque usine a son propre approvisionnement en eau et utilise différentes matières premières pour la fabrication de leurs produits. La présence des microorganismes peut être problématique en certaines occasions, particulièrement lorsque ceux-ci se regroupent sous la forme de biofilms. Ces dépôts engendrent des pertes de production considérables puisqu'en se détachant ils peuvent causer des taches ou des trous dans le papier. Finalement, la présence de biofilms peut également causer des problèmes mécaniques en accélérant la corrosion des métaux et en obstruant la tuyauterie.

La connaissance des microorganismes contaminant un environnement papetier est primordiale pour comprendre et identifier les facteurs influençant la structure des communautés microbiennes. L'utilisation d'une méthode moléculaire pour caractériser la communauté bactérienne de la caisse d'arrivée d'une machine à papier canadienne a permis d'identifier de nouveaux genres bactériens tels *Hydrogenophilus*, *Meiothermus*, *Tepidimonas*, *Geobacillus* et *Rhizobium*. Ces genres n'avaient pas été identifiés avec une méthode d'isolement employée dans cette papetière canadienne en 2003. La méthode « Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis » a également permis d'identifier des variations dans la communauté microbienne selon les saisons. Des genres bactériens comme *Rhizobium* et *Hydrogenophilus* ont été uniquement identifiés au mois de juillet 2006 et la proportion d'individus appartenant au genre *Tepidimonas* était plus importante en juillet 2006 comparativement à février 2006. Le profil métabolique des communautés

microbiennes de février et juillet 2006 effectué à l'aide de l'analyse Biolog a confirmé la variation temporelle entre les populations bactériennes de la caisse d'arrivée de cette machine à papier canadienne.

L'eau est indispensable dans le processus de fabrication du papier. Elle est utilisée en quantité phénoménale, c'est pourquoi son utilisation est comptabilisée et qu'elle est recyclée au maximum. Le test Biolog semblait être parfaitement approprié pour l'analyse des variations spatiales et temporelles des communautés microbiennes contaminant le circuit d'eau blanche. L'analyse Biolog du circuit d'eau blanche a permis de détecter des différences entre les communautés microbiennes de la caisse d'arrivée, de l'eau clarifiée, de l'eau des presses et de l'eau blanche recyclée des deux machines à papier canadiennes. Les variations spatiales des communautés sont plus importantes entre les différents sites d'échantillonnage d'une même machine à papier qu'entre un même site d'échantillonnage sur deux machines à papier différentes. Finalement, tout comme l'étude des communautés microbiennes effectuée dans le passé par Kashama et al (2009), des variations temporelles ont été observées en juillet et décembre 2005 pour les échantillons de la caisse d'arrivée.

## REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de recherche, Madame Carole Beaulieu. Tout au long du projet, elle a su me diriger, m'encourager et me faire confiance. Sa passion pour la recherche a été une source d'inspiration dans mes travaux et son partage du savoir m'a permis d'approfondir mes connaissances.

Je voudrais également remercier mes conseillers de recherche, les docteurs Ryszard Brzezinski et François Malouin, pour leur support et l'apport de connaissances connexes au projet.

Je tiens à remercier Domtar, pour son support financier et sans lequel, ce projet de recherche n'aurait pu voir le jour. Merci aussi aux gens de l'industrie papetière, particulièrement à Madame Julie Talbot et Monsieur Richard Gratton, qui ont mis beaucoup d'efforts et de temps pour la réussite de ce projet.

Merci aussi à tous mes collègues de travail qui m'ont apporté leur aide et leur soutien. La joie de vivre et l'amitié que nous avons développées durant ces deux années feront de cette période de ma vie un moment inoubliable.



## TABLES DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xi
INTRODUCTION.....	1
1.1 L'industrie papetière.....	1
1.2 La contamination microbiologique dans les papetières.....	4
1.3 Les microorganismes contaminant les papetières.....	8
1.4 L'analyse des communautés microbienne.....	9
1.5 Études microbiologiques effectuées dans une papetière canadienne.....	12
1.6 Objectif du projet.....	13

CHAPITRE 1 ANALYSE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION DE L'ADN  
RIBOSOMAL AMPLIFIÉ SUR LES COMMUNAUTÉS  
BACTÉRIENNES D'UNE MACHINE À PAPIER CANADIENNE..15

Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis on pulp bacterial communities of a  
Canadian paper machine.....18

Abstract.....19

Introduction.....20

Material and methods.....21

    Microorganism extraction.....21

    Construction of 16Sr DNA libraries.....22

    Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA).....24

    16S rDNA sequencing and sequence analyses.....24

    Metabolic profile of the headbox communities.....24

Results.....25

    Restriction patterns of the 16S rDNA clones from the headbox water.....25

    Analysis of the 16S rDNA clones.....26

    Metabolic profile of February and July 2006 microbial communities.....30

Discussion.....33

Acknowledgements.....37

References.....37

CHAPITRE 2 PROFIL PHYSIOLOGIQUE DES COMMUNAUTÉS  
MICROBIENNES COLONISANT LA PARTIE HUMIDE DES  
MACHINES À PAPIER CANADIENNES.....42

Physiological profiles of microbial communities colonizing the wet end of Canadian paper  
machines .....45

Abstract.....46

Introduction.....47

Material and methods.....49

    Sample collection .....49

    Extraction of bacteria from process waters .....50

    Metabolic profile of the microbial communities.....50

Results.....51

    Sample temperatures.....51

    Temporal and spatial variations in the bacterial communities of process water .....53

    Carbon source utilization.....60

Discussion.....68

Acknowledgements.....71

References.....72

CONCLUSION.....76

BIBLIOGRAPHIE.....83

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNr 16S	Acide Désoxyribonucléique ribosomal 16S
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ARNr 16S	Acide Ribonucléique ribosomal 16S
bp	base pairs
°C	degré Celsius
CLSM	Microscopie Confocale à Balayage Laser
D	dissimilarity index
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EPS	Substance Polymérique Extracellulaire
F	utilization frequency
g	gramme
L	litre
LH-PCR	Length Heterogeneity Analysis of PCR-Amplified 16S Ribosomal DNA
M	Molaire
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
ng	nanogramme
nm	nanometre
OD	Optical Density

ORP	Potentiel d'Oxydo-Réduction
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentiel Hydrogène
SE	Standard Error
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
$\mu\text{g}$	microgramme
$\mu\text{l}$	microlitre
$\mu\text{m}$	micromètre
$\mu\text{M}$	micromolaire
U	unité

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre 1

- Table 1.* Primers used for the amplification of the 16S rDNA.....23
- Table 2.* *RsaI* and *Taq* restriction patterns associated with 16S rDNA libraries of the headbox microbial communities of a Canadian paper machine in February and July 2006.....26
- Table 3.* List of the 16S rDNA clones and their nearest GenBank neighbors.....27
- Table 4.* Bacterial genera found in the headbox of a Canadian paper machine in February and July 2006.....30
- Table 5.* Carbon sources metabolized by the headbox microbial communities.....32

### Chapitre 2

- Table 1.* Temperature of process waters from two paper machines.....52
- Table 2.* Utilization frequency at 50°C of Biolog Ecoplate's carbon sources by water process microbial communities.....61
- Table 3.* Utilization frequency of various substrates by microbial community when Ecoplates was incubated at 37°C from June 2005 to May 2006.....63
- Table 4.* Dissimilarity index between the physiological profiles of microbial communities associated with paper machines # 7 and 8.....65
- Table 5.* Dissimilarity index between the physiological profiles of microbial communities associated with different process waters of paper machine # 7...66

*Table 6.* Dissimilarity index between the physiological profiles of microbial communities associated with different process waters of paper machine # 8...67

*Table 7.* Dissimilarity index between the physiological profiles of process water microbial communities generated at 37 and 50°C.....68

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 1

Figure 1. Principal component analysis of the physiological profiles of February and July 2006 communities based on carbon substrate utilization in Biolog EcoPlates.31

### Chapitre 2

Figure 1. Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the headbox microbial communities of paper machine #7 generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 50°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.....54

Figure 2. Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the process water microbial communities of paper machine #7 generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 50°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.....55

Figure 3. Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the process water microbial communities of paper machines #7 and 8 generated with Biolog EcoPlates. (A) Headbox water, (B) Clarified water, (C) Press water and (D) Recycled white water. The plates were incubated at 50°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and



horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.....56

Figure 4. Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the recycled white water microbial communities of paper machines #7 and 8 generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 37°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.....57

Figure 5. Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the headbox (A) and recycled white waters (B) microbial communities of paper machine #7 generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 50 or 37°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.....59

## INTRODUCTION

### 1.1 L'industrie papetière

L'industrie des pâtes et papier est un domaine très diversifié puisqu'il existe plusieurs procédés de fabrication. C'est en 1870 et 1874, respectivement, que l'utilisation commerciale du procédé de fabrication de la pâte mécanique et de la pâte au bisulfite a débuté. En 1884, Carl Dahl a inventé le procédé de fabrication de la pâte kraft. La réduction du sulfate en sulfure lors de ce procédé, a permis d'accélérer la délignification et produire une pâte beaucoup plus résistante que les autres procédés, des caractéristiques principalement recherchées dans la production de papier fin. Le vingtième siècle a été marquant dans l'évolution de l'industrie papetière principalement pour la mécanisation des opérations de manutention des matières. Cette période de perfectionnement et de modification a permis la mise au point de certaines techniques telles la cuisson en continu, le blanchiment à phase multiple en continu, la formation entre deux toiles et l'utilisation d'un raffineur pour la réduction en pâte mécanique. Cependant, le plus grand changement survenu dans les papeteries nord-américaines a été la fabrication du papier en milieu alcalin depuis 1980. Ce nouveau procédé, comparativement à la fabrication en milieu acide, a permis de produire des papiers plus blancs et plus opaques satisfaisant ainsi la demande des consommateurs avec des coûts de production plus faibles vu le prix concurrentiel du carbonate de calcium et sa plus grande disponibilité.

La majorité des opérations de la fabrication des pâtes et papiers nécessite l'utilisation de grandes quantités d'eau, ce qui rend impératif la localisation des usines le long d'une abondante source d'eau. La majorité des usines s'approvisionnent directement d'une rivière, ce qui nécessite l'installation d'un système de traitement d'eau puisque la qualité

de l'eau est primordiale au bon fonctionnement de l'usine et des machines. L'ajout de coagulants et floculants permet de diminuer la matière en suspension dans l'eau lorsque celle-ci passe au travers d'un système composé de décanteurs et filtreurs (Beaudry, 1984). L'eau de faible turbidité répondra mieux au traitement microbiologique (LeChevallier *et al.*, 1981).

Parmi les principaux éléments de base d'une machine à papier, nous retrouvons la caisse d'arrivée qui distribue la suspension de fibres sur la toile de formation, qui permet à son tour l'élimination de l'eau par aspiration. Comme la formation et l'uniformité de la feuille finale dépendent de la qualité de la dispersion des fibres, le bon fonctionnement de la caisse d'arrivée est l'un des points les plus critiques du système de fabrication du papier. La feuille en formation est ensuite dirigée dans la section des presses pour éliminer la quantité d'eau supplémentaire et consolider le matelas fibreux. Les eaux s'égouttant de la suspension de fibres pendant la fabrication du papier sont appelées eaux blanches. Les eaux blanches sont réparties en deux catégories selon leur teneur en fibres. Les eaux blanches dites « riches » ayant une teneur plus élevée en fibres sont recueillies et immédiatement retournées dans le circuit pour être utilisées comme eaux d'appoint ou à des fins de dilution dans le circuit de préparation de la suspension. Les eaux blanches dites « pauvres » et ayant une plus faible teneur en fibres sont acheminées vers un bac de récupération des fibres. L'eau rejetée de ces bacs est appelée eau blanche clarifiée. Les eaux blanches clarifiées alimentent divers dispositifs sur la machine, tel les douches qui servent à rincer les toiles et les feutres, la section des presses, le circuit de vide ou le circuit de refroidissement. Le recyclage des eaux blanches permet de fournir des quantités suffisantes d'eau pour alimenter les divers circuits de la machine en plus de limiter les

pertes de fibres et d'énergie ainsi que de réduire au minimum la quantité d'effluents (Smook, 1992).

L'industrie des pâtes et papiers en Amérique du Nord est l'une des plus importante pour ce qui est de la capacité de production et de la diversité des produits grâce à ses abondantes ressources en matières fibreuses, en énergie, en eau, à sa main-d'œuvre qualifiée et à son accessibilité aux marchés. Cependant, le marché de l'industrie papetière a été très ébranlé au cours des dernières années. Depuis quelques années, certains producteurs étrangers sont devenus de sérieux concurrents sur le marché nord-américain. L'impact de cette concurrence a été la fermeture de certaines usines nord-américaines. Une papetière doit avoir une efficacité de production élevée aux plus faibles coûts possibles tout en respectant les normes environnementales de sa région. Pour y arriver, les usines ont dû moderniser leurs installations et utiliser de nouveaux produits pour améliorer le rendement des machines. Une de ces innovations a été le développement d'additifs chimiques qui a permis d'augmenter la vitesse des machines à papier en améliorant la rétention des fibres et le drainage (Swistra *et al.*, 1998). L'efficacité et la durée de vie de certaines composantes de la machine, telles les feutres, ont pu être améliorées grâce à l'utilisation de conditionneurs et d'agents nettoyants (King *et al.*, 1998). Mis à part ces contraintes mécaniques, l'industrie fait également face à des contraintes biologiques. Les problèmes liés aux microorganismes contaminant les usines de pâte et papier ont souvent été sous-évalués, négligés, voir même ignorés, mais suite aux récentes recherches effectuées dans ce domaine (Kolari *et al.*, 2003 ; Ekman *et al.*, 2007 ; Desjardins et Beaulieu, 2003 ; Kashama *et al.*, 2009), la contamination microbiologique est de plus en plus prise en considération.

## 1.2 La contamination microbologique dans les papetières

La contamination microbienne et la présence de biofilms dans les papetières peuvent avoir des conséquences néfastes. Certains microorganismes peuvent provoquer d'importants changements de pH dans le procédé ce qui peut affecter la qualité de certains produits utilisés dans la fabrication de papier (Robertson, 1994). Les regroupements de microorganismes, communément appelé biofilms, sont encore plus problématiques. Ils peuvent favoriser la corrosion de l'outillage (Bennett, 1985), provoquer des casses de papier en formation ou engendrer des défauts dans le produit final suite à leur chute (Safade, 1988). Toutes ces conséquences négatives résultent en une baisse de productivité et par le fait même, en une diminution des revenus.

Les études effectuées sur les biofilms ont permis de mieux comprendre la formation des biofilms dans l'industrie des pâtes et papier. Par définition, un biofilm est un ensemble de cellules microbiennes, entouré d'une matrice d'aspect gélatineux composée principalement d'eau, de polysaccharides et de composantes du milieu, qui sont associés de façon irréversible à une surface, préférentiellement à une interface air-liquide (Donlan, 2002). L'état de la surface d'adhésion joue un rôle crucial dans la formation des biofilms. Il a été observé que plus la surface était rugueuse, plus la couche de nutriments composée essentiellement de cellulose, d'hémicellulose, d'amidon et de résine de bois dans les papetières (Väisänen *et al.*, 1994) était importante (Safade, 1988). Les colonisateurs primaires de biofilms ont la capacité d'initier la formation de biofilm car ils sont capables d'adhérer fermement aux surfaces. La présence de fimbriae, pili, flagelle, fils d'adhésion composé de polysaccharides et de protéines ou la capacité de produire une forte quantité de substance polymérique extracellulaire (EPS) (Donlan, 2002; Rosenberg *et al.*, 1982;

Rosenberg *et al.*, 1986; Kolari *et al.*, 2002) sont des caractéristiques communes aux colonisateurs primaires. De plus, certains composés comme l'acide uronique pourrait favoriser l'attachement des bactéries sur les métaux tel l'acier inoxydable (Lindberg *et al.*, 2001). Les principaux colonisateurs primaires dans l'industrie papetière sont en majeure partie des bactéries longues ou filamenteuses (Oppong *et al.*, 2003), ainsi que des bactéries telles que *Deinococcus geothermalis* ou *Meiothermus silvanus*, retrouvées dans différents types de biofilms colorés (Kolari *et al.*, 2003). Ce ne sont pas tous les microorganismes qui peuvent faire le premier contact d'adhésion ; certains vont nécessiter la présence d'autres organismes afin de pouvoir coloniser la surface. Les colonisateurs secondaires jouent ainsi un rôle important dans la formation de biofilms. Bien que ces derniers soient incapables d'initier la formation de biofilm, ils peuvent tout de même accentuer sa formation. Il a été démontré que des souches de *Bacillus* provenant d'une papetière ne formaient pas de biofilm en monoculture, mais la mise en culture avec *Deinococcus geothermalis* augmentait significativement la formation de biofilm comparativement au biofilm de cette même espèce issu d'une monoculture (Kolari *et al.*, 2001).

L'EPS excrété par les bactéries représente entre 75 et 90 % du biofilm (Costerton, 1999) et est composé principalement de polysaccharides, protéines, acides nucléiques, phospholipides et autres matériaux et déchets provenant de l'environnement immédiat (Verhoef *et al.*, 2002). Cette substance joue un rôle important dans les biofilms puisqu'elle prévient la dessiccation vu sa forte teneur en eau et contribue à la résistance microbienne en empêchant le transport des agents antimicrobiens à travers le biofilm (Mah et O'Toole, 2001). L'analyse de la composition des sucres et des protéines présentes dans l'EPS des biofilms, permet de différencier les bactéries puisque chaque couche d'EPS entourant une cellule bactérienne est propre à cette espèce (Costerton, 1999 ; Väisänen *et al.*, 1998).

Grâce à la chromatographie en phase gazeuse, il a été démontré que la composition en sucres de biofilms formés à partir de souches provenant de l'industrie papetière variait d'une espèce à l'autre et même entre souches. Par exemple, les principaux sucres retrouvés dans les biofilms de *Burkholderia cepacia* et *Burkholderia pickettii* sont le galactose, le glucose, le mannose et le rhamnose. Tandis qu'on retrouve principalement le xylose, le galactose, le glucose et le mannose chez les souches de *Bacillus* sp. et d'*Alcaligenes xylosoxydans* (Lindberg *et al.*, 2001).

Pour contrer la contamination microbienne dans l'industrie papetière, plusieurs procédures et produits ont été mis au point. Les bouillissages chimiques avec des acides ou des bases sont les méthodes les plus efficaces pour éradiquer les microorganismes contaminant le circuit des machines à papier. Les bouillissages alcalins sont majoritairement utilisés lorsqu'il y a présence de biofilms sur les machines ou que les dénombrements de microorganismes sont élevés dans le procédé. La présence de dépôts difficilement délogeables avec un bouillissage alcalin, comme les dépôts de carbonate de calcium, nécessite un bouillissage acide. Ces bouillissages enlèvent non seulement les dépôts, mais également les microorganismes qui peuvent se retrouver sous eux et profiter de la protection de ces dépôts pour proliférer. Les bouillissages demandent un arrêt complet des machines pour une période pouvant aller jusqu'à 12 heures (King *et al.*, 1998) dépendamment du type de bouillissage et des sites à nettoyer, résultant ainsi en une perte de production. Cette méthode n'est donc utilisée qu'en dernier recours, c'est-à-dire lorsque la perte de production journalière est supérieure à la moyenne pour plusieurs jours consécutifs. Pour allonger la période entre les bouillissages associés à la contamination microbienne et ainsi réduire la perte du temps de production associée à ces derniers, un contrôle microbiologique peut être effectué quotidiennement avec des biocides.

La plupart des biocides sont des agents non sélectifs qui vont détruire principalement les microorganismes planctoniques mais les biocides ont un effet moindre sur les cellules associées aux biofilms. Il y a trois principales catégories de biocide : les oxydants comme l'hypochlorite, le chlore, le dioxyde de chlore et l'ozone, les non-oxydants comme le méthylène et le bithiocyanate et les dispersants comme le thiocyanate et le pentachlorate. Chacun de ces produits a un mode d'action spécifique. Certains vont tuer les bactéries en attaquant la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique, les constituants cellulaires ou en inhibant des enzymes présents dans diverses voies métaboliques (Oppong *et al.*, 2000; Safade, 1988). Afin de diminuer la présence des biofilms dans le procédé, certaines usines vont utiliser des biodispersants tels des surfactants non-ionique ou anionique comme des copolymères d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène. Ces agents vont empêcher la formation de biofilm en prévenant la sédimentation des particules en suspension, en empêchant l'attachement des cellules bactériennes aux surfaces ou tout simplement en délogeant les biofilms déjà présents (Bunnage *et al.*, 2000).

Le principal but d'un traitement anti-microbien dans une papetière est de limiter les impacts négatifs qu'une communauté microbienne peut avoir sur l'ensemble du procédé. Il est évident que l'utilisation de biocides risque de changer la structure de la communauté et par le fait même de changer le comportement de certains individus dans la population. Il a déjà été démontré, par exemple, que certains biocides pouvaient stimuler la formation de biofilms chez certaines espèces de bactérie en nuisant à leur croissance planctonique (Kolari *et al.*, 2003). Le choix des produits chimiques utilisés pour un contrôle microbiologique dans une usine de pâte et papier, leur concentration et leur fréquence d'addition sont décidés en fonction de l'impact de ces derniers sur l'ensemble de la communauté microbienne vis-à-vis son environnement.



Les communautés microbiennes contaminant les industries papetière sont fortement influencées par les sources d'eaux utilisées, la matière première, ainsi que les conditions de fabrication tels la température et le pH du procédé. Tous ces facteurs sont sujets à des variations que ce soit en lien avec les saisons, la provenance des produits ou la stabilité de la procédure. Par ce fait même, le contrôle microbiologique dans une usine de pâte et papier peut être complexe particulièrement si une machine produit différents grades de papier. L'efficacité du contrôle microbiologique peut être mesurée à l'aide de dénombrement de microorganismes sur pétrifilm ou du suivi des niveaux d'adénosine triphosphate (Bunnage *et al.*, 2000). L'utilisation d'outils complémentaires au suivi microbiologique, comme des moniteurs en ligne pour l'acquisition des valeurs du degré d'acidité (pH) ou du potentiel d'oxydo-réduction (ORP), peuvent être envisagée pour obtenir des données en continu et voir rapidement les changements liés à une activité microbienne dans le procédé.

### **1.3 Les microorganismes contaminant les papetières**

Plusieurs espèces de microorganismes sont retrouvées dans l'industrie des pâtes et papier puisqu'elle offre un environnement avec d'abondantes sources de nutriments, des températures, un taux d'humidité et des pH appropriés pour leur croissance (Safade, 1988). Cependant, les espèces retrouvées dans le produit final ne représentent qu'une infime proportion des organismes présents dans l'environnement papetier et il s'agit principalement d'espèces capables de former des spores thermorésistantes et qui réussissent ainsi à survivre à l'étape de séchage du papier à des températures pouvant atteindre 140°C (Väisänen *et al.*, 1991; Väisänen *et al.*, 1998).

L'isolement suivi de la caractérisation physiologique (Väisänen *et al.*,1998) et biochimique (Oppong *et al.*, 2000), la détermination de la composition en acides gras (Väisänen *et al.*,1991) et le séquençage du gène de l'ADN ribosomal 16S (Desjardins et Beaulieu, 2003) ont permis d'identifier les principaux genres microbiens retrouvés dans les eaux de procédé et les biofilms des papetières ainsi que dans leurs produits. Il s'agit des genres *Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas*, *Lepthotrix*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pantoea*, *Microbulbifer*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Sphaerotilus*, *Deionococcus*, *Flectobacillus*, *Roseomonas*, *Streptomyces*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* ainsi qu'un grand nombre de bactéries de genres inconnus (Lahtinen *et al.*, 2006 ; Suihko *et al.*, 2004 ; Oppong *et al.*, 2003 ; Väisänen *et al.*,1991; Pellegrin *et al.*, 1999; Desjardins et Beaulieu, 2003).

#### **1.4 L'analyse des communautés microbienne**

Traditionnellement, les communautés microbiennes étaient comparées en analysant les différents isolats cultivés. Les méthodes de culture employées ne permettent d'avoir qu'une infime idée de la composition, de la richesse et de la structure des communautés microbiennes puisqu'une faible partie de ces microorganismes est cultivable dans des conditions spécifiques (Amman *et al.*, 1995). Les milieux et les conditions de culture choisis lors d'isolement de microorganismes privilégient certaines espèces au détriment d'autres et ne permettent pas d'avoir une vision globale de la communauté microbienne.

Il est désormais possible d'étudier la diversité et la dynamique des communautés microbiennes en se basant sur des bases biochimiques et moléculaires sans avoir recours à des étapes d'isolement. Parmi ces méthodes, on retrouve la microscopie confocale à

balayage laser (CLSM) (Amann *et al.*, 1996), l'analyse Biolog (Garland et Mills, 1991), l'analyse de la composition en acides gras (Klamer et Baath, 1998), et l'analyse du gène de l'ARN qui inclut diverses méthodes telles le « Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis » (ARDRA) (Smit *et al.*, 1997), le « Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism » (T-RFLP) (Liu *et al.*, 1997), le « Denaturing Gradient Gel Electrophoresis » (DGGE) (Roling *et al.*, 2001) et le « Length Heterogeneity Analysis of PCR-Amplified 16S Ribosomal DNA » (LH-PCR) (Bernhard *et al.*, 2005). Nous nous limiterons ici à la description du système Biolog et de la méthode ARDRA.

Le système Biolog permet d'étudier les changements d'une communauté microbienne en déterminant et en comparant son patron d'utilisation de différentes sources de carbone. Ce système représente une méthode simple et rapide pour caractériser des communautés microbiennes hétérotrophiques, différencier les communautés selon leur structure ou fonction avec un haut degré de discrimination, et fournir de l'information sur la densité et la composition des communautés microbiennes. Les microplaques Biolog ont été utilisées pour caractériser des communautés microbiennes provenant de plusieurs environnements comme le sol (Garland et Mills, 1991 ; Haack *et al.*, 1995), la rhizosphère (Garland et Mills, 1991 ; Garland, 1996), les sédiments (Frederickson *et al.*, 1991), les boues activées (Victorio *et al.*, 1996 ; Guckert *et al.*, 1996), les biofilms (Haack *et al.*, 1995) et les environnements aquatiques (Garland et Mills, 1991 ; Choi et Dobbs, 1999). L'analyse Biolog est basée sur l'utilisation des sources de carbone contenues dans chacun des puits de la microplaques. L'oxydation des substrats par les bactéries se traduit par l'apparition d'une couleur pourpre dans les puits. La coloration pourpre est produite par la réduction de l'indicateur, le tétrazolium, en un composé coloré, le formazan. En l'absence de l'utilisation du substrat, le puit demeure incolore. Certains biais sont toutefois associés à la

méthode. La fraction cultivable dans les microplaques Biolog peut diverger de la fraction réelle de la communauté pour différentes raisons. Premièrement, les microorganismes peuvent interagir entre eux dans les microplaques. Il peut y avoir des effets coopératifs ou antagonistes entre les organismes, ce qui peut favoriser ou défavoriser la croissance de certains individus. Les conditions de culture, telles la température et le temps d'incubation, peuvent également influencer la croissance des microorganismes. Finalement, il a été démontré que le colorant utilisé dans les microplaques Biolog était toxique pour certaines bactéries (Garland, 1997 ; Ullrich *et al.*, 1996).

L'analyse du gène codant l'ARN ribosomal 16S des microorganismes présents dans une communauté est l'une des méthodes les plus couramment utilisés de nos jours pour déterminer la complexité des populations la composant (Woese, 1987 ; Ward *et al.*, 1990 ; Ward *et al.*, 1992 ; Moyer *et al.*, 1994 ; Liesack *et al.*, 1991). Ce gène contient plusieurs régions conservées chez les bactéries vu son rôle crucial dans la traduction du message génétique en protéine, ainsi que des régions variables. La combinaison des régions conservées et variables fait en sorte que ce gène permet de différencier les bactéries au niveau du genre et de l'espèce. L'une des méthodes utilisant ce gène pour étudier une communauté microbienne est la méthode dite « Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis » (ARDRA), qui consiste à amplifier l'ADN des gènes de l'ARNr 16S d'un échantillon, à cloner les différents segments de l'ADNr 16S, à digérer ces fragments avec des enzymes de restriction et finalement, à analyser les différents patrons de digestion. Cette méthode a été utilisée pour caractériser la microflore des environnements aquatiques (Dang et Lovell, 2000), des sols (Dunbar *et al.*, 1999 ; Kozdrój et Dirk van Elsas, 2001), de produits alimentaires (Lagacé *et al.*, 2004) et de la flore intestinale (Ingrassia *et al.*, 2001). Cependant et comme tout autre technique, les techniques de biologie moléculaire peuvent

distordre la structure des communautés par certains biais reliés dans ces cas, à l'extraction d'ADN, à la lyse cellulaire et à l'amplification du gène (Farrelly *et al.*, 1995 ; Suzuki et Giovannoni, 1996 ; Reysenbach *et al.*, 1992 ; Ward *et al.*, 1990 ; Ward *et al.*, 1992 ; Gordon et Giovannoni, 1996 ; Moré *et al.*, 1994).

### **1.5 Études microbiologique effectuées dans une papetière canadienne**

Au cours des dernières années, notre équipe de recherche s'est associée à une papetière canadienne intéressée à caractériser la composition microbiologique de ses eaux de procédés. Dans un premier temps, l'isolement de diverses souches provenant de l'eau des caisses d'arrivée et des biofilms et leur identification par le séquençage de l'ADNr 16S a révélé la présence d'espèces prédominantes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Microbacterium* et *Pseudoxanthomonas*. De plus, il a été démontré que la diversité microbienne était beaucoup plus grande dans les échantillons de biofilms que dans les échantillons de pâte (Desjardins et Beaulieu, 2003).

Dans un deuxième temps, nous avons établi le profil physiologique de certaines souches provenant de la caisse d'arrivée. Pour y arriver, nous avons déterminé le profil métabolique de quelques bactéries appartenant aux principaux genres identifiés. Nous avons aussi déterminé les changements spatiaux et temporeux des communautés microbiennes contaminant la caisse d'arrivée de deux machines à papier de cette même usine. Pour ce faire, nous avons déterminé le profil métabolique des communautés microbiennes provenant des deux machines sur une base hebdomadaire pour une période d'une année. Cette dernière étude a révélé qu'il n'y avait que peu de variations dans entre les

communautés microbiennes des deux machines. Par contre, des variations dans le temps étaient observées et ce, particulièrement au mois de juillet (Kashama *et al.*, 2009).

## **1.6 Objectif du projet**

La méthode d'isolement utilisé par Desjardins et Beaulieu (2003) a permis d'isoler un nombre restreint de microorganismes contaminant les machines de l'usine à l'étude dans ce mémoire. Nous allons tenter au cours de la présente étude d'avoir une meilleure vue d'ensemble des organismes présents dans les caisses d'arrivée de deux machines à papier canadienne. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode dite « Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis ».

Une précédente analyse des variations spatiales et temporelles des communautés microbiennes contaminant les deux machines à papiers de l'usine n'avait été réalisée que sur l'élément le plus critique du système de fabrication du papier, l'eau de la caisse d'arrivée (Kashama *et al.*, 2009). Sachant que l'eau est recyclée dans le processus de fabrication du papier, l'analyse des variations spatio-temporelles des communautés microbiennes du circuit d'eau blanche indiquerait plus précisément les points critiques où des changements importants dans les communautés microbiennes de cette papetière pourraient survenir. Pour y arriver, les changements spatiaux et temporels des communautés microbiennes de la caisse d'arrivée, de l'eau clarifiée, de l'eau des presses et de l'eau blanche recyclée des deux machines à papier canadienne ont été suivis mensuellement sur une période d'un an à l'aide du test Biolog.

La combinaison des profils physiologiques effectués avec des microplaques Biolog et la caractérisation génétique réalisée avec la méthode ARDRA, permettra une caractérisation plus détaillée de la composition et de la variation des populations microbiennes.

## CHAPITRE 1

### ANALYSE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION DE L'ADN RIBOSOMAL AMPLIFIÉ SUR LES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES D'UNE MACHINE À PAPIER CANADIENNE

L'analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomal amplifié (ARDRA) a été utilisée pour caractériser les communautés bactériennes associées à la caisse d'arrivée d'une machine à papier canadienne pour les mois de février et juillet 2006. Huit genres bactériens ont été identifiés comme principaux colonisateurs de la caisse d'arrivée et le genre *Meiothermus* semblait être le groupe bactérien dominant de la machine à papier canadienne. Quelques variations ont été observées dans la composition des banques de clones de février et de juillet 2006. Les genres bactériens comme *Rhizobium* et *Hydrogenophilus* ont seulement été détectés dans la banque de juillet 2006. De plus, la proportion des clones de *Tepidimonas* était plus élevée dans la banque de juillet comparativement à celle de février 2006. Le profil métabolique des communautés de février et juillet 2006 déterminé à l'aide des microplaques Biolog ECO suggérait également des variations temporelles entre les populations bactériennes qui colonisaient la caisse d'arrivée de la machine à papier canadienne.

Ces travaux sont décrits au chapitre 1 de ce mémoire. Ce chapitre est constitué de l'article suivant : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis on pulp bacterial communities of a Canadian paper machine. Véronique Prince, Anne-Marie Simao-Beauvoir et Carole Beaulieu. Canadian Journal of Microbiology (2009) 55 :810-817.

La contribution des auteurs se répartit comme suit. Véronique Prince a effectué l'échantillonnage, l'évaluation des communautés microbiennes avec les méthodes Biolog



et ARDRA, ainsi que les analyses statistiques. Anne-Marie Simao-Beauvoir a effectué les analyses bio-informatiques. L'article a été rédigé par Véronique Prince et l'ensemble des travaux a été supervisé par Carole Beaulieu.

PRINCE, V., SIMAO-BEAUNOIR, A.-M and BEAULIEU, C.. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis on pulp bacterial communities of a Canadian paper machine. *Can. J. Microbiol.* (2009) 55 : 810-817

**Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis on pulp bacterial communities of a  
Canadian paper machine**

Véronique Prince, Anne-Marie Simao-Beauvoir and Carole Beaulieu\*

Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de biologie,  
Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada, J1K 2R1

\*Corresponding author

Département de biologie  
Université de Sherbrooke  
2500 Boulevard Université  
Sherbrooke, Qc  
Canada  
J 1K 2R1

Phone : (819) 821 8000 ext. 62997

Fax : (819) 821 8049

E-mail: Carole.Beaulieu@USherbrooke.ca

## **Abstract**

An amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) was carried out to characterize the bacterial communities associated with the headbox water of a paper machine in a Canadian mill. The analysis was carried out both in February and July 2006. Eight bacterial genera were identified as main colonizers of the headbox water. The genus *Meiothermus* appeared to be the dominant bacterial group of the Canadian paper machine. Some variation was observed within the composition of the February and July 2006 clone libraries. Bacterial genera such as *Rhizobium* and *Hydrogenophilus* were only detected in the July 2006 library. Furthermore, the proportion of *Tepidimonas* clones in the libraries was higher in July than in February 2006. The metabolic profile of the February and July 2006 communities, determined using Biolog EcoPlates, also suggested that temporal variation occurred within the bacterial populations that colonized the headbox of the Canadian paper machine.

**Keywords** *Geobacillus*, *Leptothrix*, Principal component analysis, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella*

## Introduction

The headbox of a paper machine is a tank that contains the papermaking materials. The mixture in the tank presents suitable conditions of temperature, pH and nutrients for microbial growth. Water, raw material, recycled pulp and additives contained in the headbox are the main sources of microbiological contamination of paper machines (Väisänen et al. 1998). Microorganisms can cause serious problems in the operation of paper machines by producing gases (Rowbottom 1988) or bad odors (Safade 1988) and by causing material corrosion (Bennett 1985). Furthermore, biofilms formed by the agglomeration of bacteria can cause breaks, holes or discoloration in a paper sheet when it is being formed (Väisänen et al. 1994, Väisänen et al. 1998).

Microorganisms contaminating paper machines were isolated from different sources such as pulp (Väisänen et al. 1998), biofilms (Kolari et al. 2001, Väisänen et al. 1994, Väisänen et al. 1998), process waters (Väättänen and Niemelä 1983, Väisänen et al. 1998), filter (Väisänen et al. 1998), broke (Suihko et al. 2004, Väättänen and Niemelä 1983), chemicals (Suihko et al. 2004, Väisänen et al. 1998), raw materials (Väisänen et al. 1998) and paper products (Väisänen et al. 1991, Väisänen et al. 1998). Several bacterial groups were found to be associated with paper machines. The genus *Pseudoxanthomonas* has been reported as a main contaminant of a Canadian paper machine (Desjardins and Beaulieu 2003).

Ribosomal DNA sequences are powerful tools for the identification of microorganisms as well as for the structure analysis of bacterial communities (Woese 1987). Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) has been used to determine the composition of bacterial communities from different environments such as arid soils

(Dunbar et al. 1999), hydrothermal vent system (Moyer et al. 1994), maple sap (Lagacé et al. 2004), intestinal mucosa (Ingrassai et al. 2001), seawater (Gordon and Giovannoni 1996) and hot springs (Ward et al. 1990).

Recently, Lahtinen *et al.* (2006) used length heterogeneity analysis of PCR-amplified 16S ribosomal DNA (LH-PCR) to evaluate the bacterial diversity of process water and biofilm samples from four different Finnish paper machines. Their study indicated that microbial diversity was lower in the process water than in the biofilms. Molecular methods such as ARDRA and LH-PCR have brought valuable information on composition, richness and structure of microbial communities associated with different ecosystems (Liesak et al. 1991, Reysenbach et al. 1992). However, these methods have not been extensively applied in industrial microbiology studies.

Here, we used ARDRA analysis to identify the main bacterial colonizers of the headbox water of a Canadian paper machine. The analysis was carried out both in February and July 2006. This molecular work provides evidence that members of the *Meiothermus* genus were the main bacterial inhabitants of headbox water.

## **Material and methods**

### *Microorganism extraction*

Headbox water (6 L) was centrifuged at about 100 g for 20 min to precipitate pulp. The supernatant was kept at room temperature and the pellet was washed three times with sterile saline (0.85% NaCl) to recover most of the microorganisms from the pulp. This washing saline was combined with the supernatant and the resulting solution was filtered

consecutively onto 5-, 1.2- and 0.2- $\mu\text{m}$  pore-size filters (MF-Millipore Mixed cellulose ester membrane filters, Billerica, MA). Microorganisms recovered on the surface of the 0.2- $\mu\text{m}$  pore size-filters were resuspended in 5 ml of TE (10 mM Tris and 1 mM EDTA, pH 8.0).

#### *Construction of 16Sr DNA libraries*

DNA from the microbial headbox community was extracted according to the procedure of Merk et al. (2001) which was modified as follows. Lysis was ensured by incubating the cell suspension at 50°C for 30 min in the presence of sodium dodecyl sulfate (10%). Contaminating RNA was degraded from this solution by a 30 min-incubation at 37°C in the presence of 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TE-RNase (Sigma, Saint-Louis, MI). Proteins were extracted from the solution with an equal volume of phenol:chloroform (1:1). DNA in solution was then precipitated with 2 volumes of ethanol and a 1/10 volume of 3 M sodium acetate pH 5.2. It was finally resuspended in sterile distilled water.

Primers BSF 8/20 and BSR 1541/20 (Table 1) were used to amplify the 16S rRNA genes. Amplification was carried out in a total volume of 50  $\mu\text{l}$  ThermoPol buffer (New England BioLabs, Pickering, Canada) containing about 10 ng of sample DNA, 250  $\mu\text{M}$  dNTPs, 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer and 0.05 U of Taq DNA polymerase (New England BioLabs, Pickering, Canada). PCR conditions were the following: initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1min, annealing at 53°C for 1 min, elongation at 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 10 min.

**Table 1** Primers used for the amplification of the 16S rDNA

Primer	Sequence (5' to 3')	Position <sup>c</sup>
BSF 8/20 <sup>a</sup>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27 of the 16S rDNA
BSR 1541/20 <sup>b</sup>	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1541-1522 of the 16S rDNA

<sup>a</sup> Forward primer

<sup>b</sup> Reverse primer

<sup>c</sup> Refer to the corresponding position of the *Escherichia coli* 16S rDNA

Amplified 16S rDNA products were purified with the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and were then ligated overnight at 14°C into pCR 2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. The ligation mixture was used to transform competent *E. coli* INV $\alpha$ F cells (Invitrogen, Carlsbad, CA). Ampicillin-resistant transformants were selected on Luria-Bertani plates (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, 12% agar, pH 7.0) supplemented with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (40 mg/ml) and ampicillin (100  $\mu$ g/ml).

Plasmids were isolated from ampicillin-resistant transformants with a GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit (Sigma, Saint-Louis, MI) as specified by the manufacturer. The presence of inserts was verified by an enzymatic digestion of the plasmids with *Eco*RI (New England BioLabs, Pickering, Canada).



### *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)*

The restriction profile of the 16S rRNA gene inserts was determined using *RsaI* and *TaqαI* (New England BioLabs, Pickering, Canada). The restriction fragments were resolved by electrophoresis on a 2% (w/v) agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, and 1 mM EDTA). The Orange Loading Dye Solution (10mM Tris-HCl pH 7.6, 0.15% orange G, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60mM EDTA) was used for the visualization of DNA fragments. Molecular size of the DNA fragments was estimated using a 100 bp DNA ladder (New England BioLabs, Pickering, Canada) as a molecular weight standard.

### *16S rDNA sequencing and sequence analyses*

A clone associated with each restriction pattern was selected and its insert was sequenced. The insert sequence was determined bidirectionally at the Genome Quebec Innovation Center (Montreal, Canada). The advanced BLAST search program for the GenBank database (Bethesda, MD) was used for determining the nearest phylogenetic neighbor sequences.

### *Metabolic profile of the headbox communities*

Physiological characterization of the headbox microbial communities was carried out both in February and July 2006. Bacteria were extracted from the headbox water as previously described. Bacterial cells were resuspended in sterile saline to an OD<sub>595</sub> of ~ 0.01. A Biolog EcoPlate (Hayward, CA) was inoculated with 150 µl of a cell suspension. The plates were incubated at 50°C for 96 hours and OD<sub>595</sub> was read using a BIO-TEK FL600 fluorescence plate reader and the KC4 v2.5 Software (BIO-TEK Instruments, Winooski, VE). The OD value associated to the control well containing no carbon source was

subtracted from those of the other wells. Two samples of the headbox water were analyzed for each sampling date and the Biolog assay was carried out in triplicate on each sample. A principal component analysis (PCA) was performed to evaluate the differences in the carbon source utilization patterns of the February and July 2006 bacterial communities (Prévost et al. 2006).

## RESULTS

### *Restriction patterns of the 16S rDNA clones from the headbox water*

Two independent 16S rDNA libraries of 100 clones were constructed from bacterial communities colonizing the headbox water of a Canadian paper machine both in February and July 2006, respectively. CA7-1 and CA7-2 were the libraries associated with the bacterial community of February 2006 whereas CA7-3 and CA7-4 represented the libraries associated with the July 2006 community. The 400 clones from all libraries were subjected to ARDRA analysis.

Between 13 and 20 different restriction patterns were obtained when the 100 clones from libraries CA7-1, CA7-3 and CA7-4 were digested with either *RsaI* or *Taq $\alpha$ I* whereas only 7 and 8 *RsaI* or *Taq $\alpha$ I* restriction patterns were associated with library CA7-2, respectively (Table 2). Three *RsaI* and four *Taq $\alpha$ I* digestion patterns were common to all libraries. Double digestion with *RsaI* and *Taq $\alpha$ I* enzymes generated a total of 56 unique restriction patterns within the four libraries. The number of unique *RsaI* and *Taq $\alpha$ I* restriction patterns varied between 11 and 28 depending on the library.

**Table 2** *RsaI* and *Taq*α restriction patterns associated with 16S rDNA libraries of the headbox microbial communities of a Canadian paper machine in February and July 2006.

Restriction enzyme	Number of unique restriction patterns				Number of common restriction patterns within libraries		
	CA7-1 <sup>a</sup>	CA7-2 <sup>a</sup>	CA7-3 <sup>b</sup>	CA7-4 <sup>b</sup>	CA7-1 and CA7-2	CA7-3 and CA7-4	All libraries
	<i>RsaI</i>	14	7	13	20	6	8
<i>Taq</i> α	17	8	16	16	5	9	4
<i>RsaI</i> and <i>Taq</i> α	20	11	22	28	6	8	4

<sup>a</sup> Libraries associated with the bacterial community of February 2006

<sup>b</sup> Libraries associated with the bacterial community of July 2006

#### *Analysis of the 16S rDNA clones*

A clone belonging to each restriction group of a specific library was selected and submitted to a partial 16S rDNA sequencing (Table 3). All sequences obtained exhibited between 95 and 99% similarity with a 16S rDNA sequence deposited in the GenBank database (Table 3). Based on their 16S rDNA sequences, the clones could be associated with nine genera: *Geobacillus*, *Hydrogenophilus*, *Meiothermus*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhizobium*, *Tepidimonas* and *Schlegelella* or *Leptothrix* (Table 3).

**Table 3** List of the 16S rDNA clones and their nearest GenBank neighbors.

Clone	Accession number	Number of base pairs sequenced	Nearest GenBank database phylogenetic neighbor and its accession number	Similarity (%)
CA7 #3 – 8; CA7 #1 – 34; CA7 #4 -72 <sup>a</sup>	EF424431	387	<i>Geobacillus tepidamans</i> AY563003	95-97
CA7 #4 - 24	EF424432	792	<i>Hydrogenophilus</i> sp. AY225605	98
CA7 #1 – 13; CA7 #1 – 20; CA7 #1 – 60; CA7 #1 – 63; CA7 #1 – 81; CA7 #2 – 21; CA7 #2 – 37; CA7 #2 – 74; CA7 #2 – 76; CA7 #3 – 6; CA7 #3 – 13; CA7 #3 – 17; CA7 #3 – 44; CA7 #3 -81; CA7 #3 – 93; CA7 #4 – 1; CA7 #4 – 8; CA7 #4 – 38; CA7 #4 – 44; CA7 #4 – 80; CA7 #4 – 82; CA7 #4 – 89 <sup>a</sup>	EF424433	667	<i>Meiothermus ruber</i> AJ864718	95-98
CA7 #4 – 20; CA7 #1 – 17; CA7 #1 -24; CA7 #1 - 25; CA7 #1 – 61; CA7 #1 – 93; CA7 #2 – 56; CA7 #2 – 34; CA7 #2 – 59; CA7 #3 – 1; CA7 #3 -50; CA7 #4 – 5 <sup>a</sup>	EF424434	873	<i>Pseudomonas thermotolerans</i> AJ311980	95-98
CA7 #1 – 64; CA7 #1 – 74; CA7 #1 – 91; CA7 #2	EF424435	758	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> AJ864723	97-99

- 71; CA7 #3 - 3; CA7 #3				
- 5; CA7 #3 - 42; CA7 #3				
- 64; CA7 #4 - 10; CA7				
#4 - 18; CA7 #4 - 46;				
CA7 #4 - 50; CA7 #4 -				
68; CA7 #4 - 87 <sup>a</sup>				
<b>CA7 #1 - 89</b>	EF424437	828	<i>Rhizobium</i> sp. DQ303478	96
<b>CA7 #4 - 11; CA7 #1 -</b>	EF424436	793	<i>Schlegelella</i> sp. DQ417336	95-99
12; CA7 #1 - 47; CA7 #1			<i>Leptothrix</i> sp. AF385534	
- 42; CA7 #1 - 62; CA7				
#1 - 65; CA7 #1 - 95;				
CA7 #2 - 40; CA7 #2 -				
41; CA7 #2 - 49; CA7 #3				
- 25; CA7 #3 - 32; CA7				
#3 - 38; CA7 #3 - 47;				
CA7 #3 - 82; CA7 #3 -				
85; CA7 #4 - 28; CA7 #4				
- 34; CA7 #4 - 59; CA7				
#4 - 98 <sup>a</sup>				
<b>CA7 #1 - 85; CA7 #2 -</b>	EF424438	634	<i>Tepidimonas arfidensis</i>	96-98
31; CA7 #3 - 4; CA7 #3			AY594193	
- 16; CA7 #3 - 18; CA7				
#3 - 52; CA7 #3 - 71;				
CA7 #4 - 4; CA7 #4 - 16;				
CA7 #4 - 23; CA7 #4 -				
31; CA7 #4 - 92 <sup>a</sup>				
<b>CA7 #4 - 99; CA7 #4 -</b>	EF424439	755	<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	96-98
3 <sup>a</sup>			AY845054	

---

<sup>a</sup> The same nearest GenBank neighbor was found for this group. Only the sequence of the first clone of this group was submitted to GenBank

The *Meiothermus* genus was the most abundant phylogenetic group within the 16S rDNA libraries. This genus was associated with 16 different ARDRA patterns. Its proportion in the headbox microbial community of February and July 2006 was of about 40% (Table 4). The second most abundant phylogenetic group was *Schlegelella* or *Leptothrix*. This group represented 28% and 20% of the 16S rDNA clones and ARDRA patterns, respectively. The *Tepidimonas* genus was not negligible in the headbox community since it represented 14 % of the clones and approximately 20% of the restriction patterns. However, the proportion of *Tepidimonas* in the community varied considerably within the February and July 2006 libraries. The proportion of *Tepidimonas* clones rose from 2% in February 2006 to 28% in July 2006. Finally, the *Pseudomonas* and *Pseudoxanthomonas* genera comprised around 10% of the 16S rDNA clones whereas *Geobacillus*, *Hydrogenophilus* and *Rhizobium* genera comprised less than 1% of the clones. The proportion of clones associated with these last five genera was quite similar between the February and July communities.

**Table 4** Bacterial genera found in the headbox of a Canadian paper machine in February and July 2006

Genus	Libraries of February 2006			Libraries of July 2006				
	Proportion in the community (%)			Number of ARDRA patterns <sup>a</sup>	Proportion in the community (%)			Number of ARDRA patterns <sup>b</sup>
	CA7-1	CA7-2	Mean		CA7-3	CA7-4	Mean	
<i>Geobacillus</i>	1	0	0.5	1	1	1	1.0	1
<i>Hydrogenophilus</i>	0	0	0.0	0	0	1	0.5	1
<i>Meiothermus</i>	35	53	44.0	7	36	33	34.5	10
<i>Pseudomonas</i>	17	9	13.0	4	9	9	9.0	3
<i>Pseudoxanthomonas</i>	6	1	3.5	4	7	13	10.0	7
<i>Rhizobium</i>	1	0	0.5	1	0	0	0.0	0
<i>Schlegelella</i> or <i>Leptothrix</i>	38	35	36.5	7	23	15	19.0	9
<i>Tepidimonas</i>	2	2	2.0	1	24	28	26.0	11

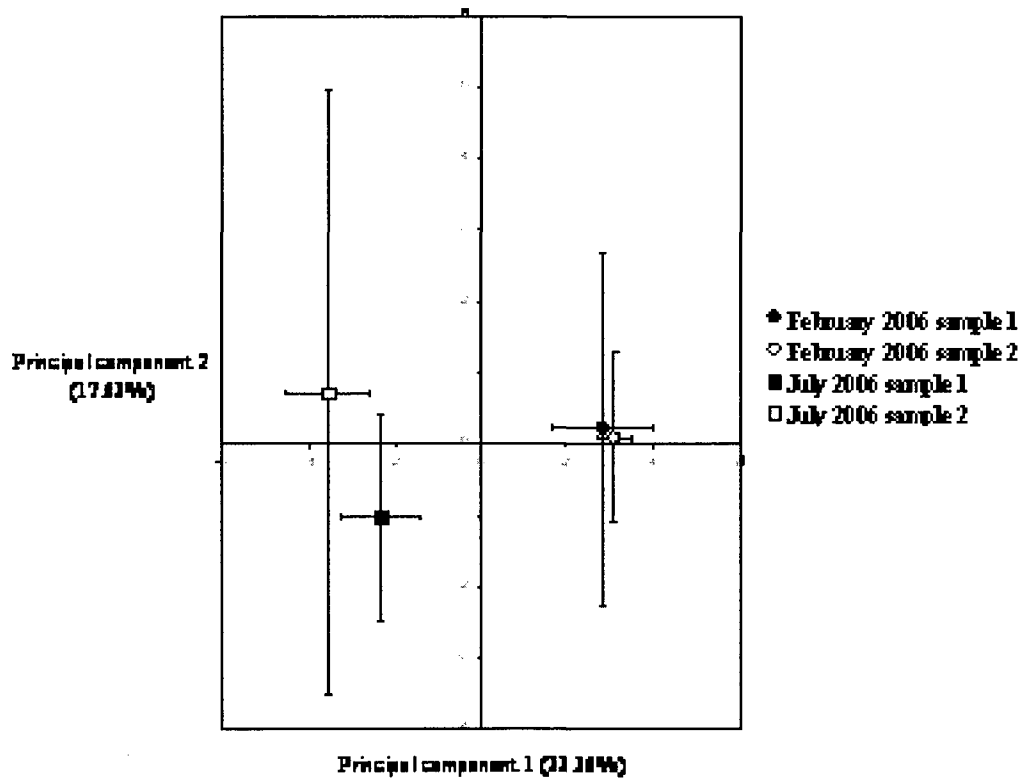
<sup>a</sup> Number of *RsaI* and *TaqαI* restriction patterns associated with the two libraries of February 2006

<sup>b</sup> Number of *RsaI* and *TaqαI* restriction patterns associated with the two libraries of July 2006

*Metabolic profile of February and July 2006 microbial communities*

Physiological characterization of the headbox microbial community was determined using Biolog EcoPlates. The principal component analysis showed that the metabolic profiles of the microbial communities associated with the headbox water samples varied considerably within the season when compared to the variation observed within the metabolic profiles of

samples collected during the same month (Fig. 1). Table 5 presents values of the OD associated with the EcoPlate wells. Carbon sources such as pyruvic acid methyl ester, tween 40, D-galactonic acid lactone, D-malic acid, L-arginine and putrescine were easily metabolized by the headbox February microbial community while they were poorly or not metabolized by the July 2006 community.



**Fig 1** Principal component analysis of the physiological profiles of February and July 2006 communities based on carbon substrate utilization in Biolog EcoPlates



**Table 5** Carbon sources metabolized by the headbox microbial communities

Carbon source of the Biolog EcoPlate	OD <sub>595</sub> (standard deviation)	
	February communities	July communities
Pyruvic acid methyl ester	0.759 (0.071)	0.000 (0.000)
Tween 40	0.433 (0.056)	0.012 (0.014)
Tween 80	0.118 (0.066)	0.005 (0.011)
Cyclodextrin	0.007 (0.018)	0.029 (0.040)
Glycogen	0.015 (0.011)	0.004 (0.008)
D-cellobiose	0.009 (0.016)	0.019 (0.031)
D-lactose	0.022 (0.024)	0.020 (0.023)
B-methyl-D-glucoside	0.004 (0.008)	0.008 (0.015)
D-xylose	0.000 (0.000)	0.025 (0.017)
i-erythritol	0.001 (0.002)	0.014 (0.018)
D-mannitol	0.001 (0.002)	0.039 (0.038)
N-acetyl-D-glucosamine	0.006 (0.010)	0.002 (0.005)
D-glucosaminic acid	0.000 (0.000)	0.006 (0.015)
Glucose-1-phosphate	0.000 (0.000)	0.003 (0.007)
D,L-glycerol phosphate	0.013 (0.012)	0.013 (0.018)
D-galactonic acid lactone	0.028 (0.013)	0.000 (0.000)
D-galacturonic acid	0.018 (0.024)	0.009 (0.015)
2-hydroxy benzoic acid	0.000 (0.000)	0.037 (0.055)
4-hydroxy benzoic acid	0.032 (0.034)	0.016 (0.031)
Hydroxybutyric acid	0.030 (0.028)	0.059 (0.076)
Itaconic acid	0.002 (0.004)	0.002 (0.004)
Ketobutyric acid	0.000 (0.000)	0.002 (0.004)

D-malic acid	0.111 (0.026)	0.006 (0.007)
L-arginine	0.073 (0.019)	0.007 (0.016)
L-asparagine	0.201 (0.110)	0.021 (0.025)
L-phenylalanine	0.000 (0.000)	0.019 (0.031)
L-Serine	0.148 (0.139)	0.021 (0.026)
L-threonine	0.001 (0.003)	0.014 (0.028)
Glycyl-L-glutamic acid	0.000 (0.000)	0.004 (0.009)
Phenylethyl-amine	0.000 (0.000)	0.001 (0.002)
Putrecine	0.081 (0.016)	0.013 (0.016)

---

## DISCUSSION

In this study, bacterial community structure of the headbox water of a Canadian paper machine was analyzed by ARDRA. This direct molecular analysis considered both culturable and nonculturable bacteria (Amann et al. 1995). Clones were grouped according to their restriction patterns with two endonucleases. The use of two restriction enzymes minimized erroneous regrouping of the clones since the same restriction pattern could be associated with different bacterial genera when only one enzyme was used. For example, some clones of *Geobacillus*, *Pseudoxanthomonas*, and *Tepidimonas* had a same *RsaI* pattern but could be differentiated by their *TaqI* patterns.

In this study, most genera were associated with multiple restriction patterns suggesting that several species of a genus were present in the headbox water. However, the number of species associated with a genus is likely lower than the number of restriction patterns that was obtained. Effectively, bacteria can carry more than one rDNA sequence and these

rDNA sequences could vary not only among species of a genus but also among strains belonging to a same species (Gordon and Giovannoni 1996, Ingrassia et al. 2001).

Although different biases such as differential efficiency of both DNA extraction and PCR amplification (Liesack et al. 1991, Meyerhans et al. 1990, Reysenbach et al. 1992) have been reported, ARDRA is considered as a good method to estimate the composition of bacterial communities (Crosby and Criddle 2003). The *Meiothermus* genus could thus be considered as a major inhabitant of the process water in the Canadian paper mill examined. This genus was not isolated from the headbox water of this same mill by Desjardins and Beaulieu (2003) suggesting that culture media used in this last study was not appropriate to select for *Meiothermus* strains.

Desjardins and Beaulieu (2003) isolated bacteria belonging to the *Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas*, *Leptothrix* and *Bacillus* genera. In addition to these genera, the ARDRA analysis revealed the presence of *Hydrogenophilus*, *Meiothermus*, *Tepidimonas*, *Geobacillus* and *Rhizobium*. The genera *Hydrogenophilus* (Hayashi et al. 1999, Stöhr et al. 2001), *Meiothermus* (Chen et al. 2002, Chung et al. 1997), and *Tepidimonas* (Albuquerque et al. 2006, Chen et al. 2006, Moreira et al. 2000) comprised Gram-negative rod shaped cells which have an optimal temperature growth of about 50°C. All of these bacteria were previously isolated from paper mill environments (Freitas et al. 2003, Kolari et al. 2003). Furthermore, the fact that several genera that have been detected in process water (*Meiothermus*, *Rhizobium*, *Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas* (Desjardins and Beaulieu 2003, Ekman et al. 2007) have also been isolated from biofilms developing on paper machines suggests that headbox water was an important source of biofilm-forming contaminants on paper machines.

The main difference observed between the composition of the February and July 16S rDNA libraries was the proportion of *Tepidimonas* clones associated with each library. To our knowledge, this genus had never been isolated from a paper machine. Nevertheless, it has been found in paper mill effluent (Freitas et al. 2003), hot springs (Albuquerque et al. 2006, Chen et al. 2006) and in an industrial hot water tank (Moreira et al. 2000).

Metabolic capacity of microbial communities is strongly related to community composition (Haack et al. 1995, Verschuere et al. 1997). Variation within the metabolic profiles of the February and July 2006 headbox water communities was detected whereas no significant variation was detected within the two samples that were taken out during the same month. Neither cell density nor headbox water temperature could explain the temporal variation in the composition of the February and July bacterial communities. The causes of this temporal fluctuation have not yet been elucidated but it could be due to a higher input of fresh water in July 2006. Indeed, the ratio between river water introduced in the paper making system and the recycled process water was higher in July than in February 2006. The additional need for fresh water could have modified the headbox microflora; especially since the composition of fresh water microbial community is known to vary according to seasons (Brümmer et al. 2000, Findlay and Watling 1998, Keith-Roach et al. 2002).

Metabolic variations observed between the February and July 2006 microbial communities could be related to variation within the *Tepidimonas* populations that were detected using ARDRA analysis. However, the only slightly thermophilic aerobic *Tepidimonas* strain that was recently isolated from the Canadian paper mill was unable to use the carbon sources

comprised in the Biolog plates (data non shown). Albuquerque et al. (2006) reported that *Tepidimonas thermarum* assimilated only a few carbohydrates.

Although it reflected the structural change in a community, the Biolog analysis carried out in this study did not provide information on bacterial metabolism in the paper mill environment. Most carbon sources in EcoPlates were probably absent from the headbox water. A better knowledge of the physiological properties of the headbox water colonizers as well as the identification of metabolizable carbon sources in process water would allow the design of physiological tests for ecological studies.

A microscopic study carried out by Lahtinen *et al.* (2006) on process waters of a Finnish paper mill showed that the proportion of Gram-negative and Gram-positive bacteria was similar. The ARDRA analysis presented in this study detected mostly Gram-negative bacteria. Only a few Gram-positive rod shape bacteria were detected. This could indicate that the bacterial composition of the process water of Canadian and Finnish paper mills differ considerably, or alternatively, that the ARDRA protocol selected for Gram-negative bacteria (Lahtinen et al. 2006).

This study shows that techniques such as ARDRA and Biolog analysis that are commonly used in environmental studies could also be applied in an industrial context. These techniques could be used to monitor the variation of bacterial communities associated with paper industries and could eventually become interesting tools to control the quality of industrial processes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by a contract from Domtar Inc. We thank Julie Talbot, Richard Gratton and Réjean Beaudoin for providing useful comments and technical assistance.

## REFERENCES

- Albuquerque, L., Tiago, I., Veríssimo, A., and 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**: 450-456.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**: 143-169.
- Bennett, C. 1985. Control of microbial problems and corrosion in closed systems. Paper Technol. Ind. **26**: 331-335.
- Brümmer, I.H.M., Fehr, W., and Wagner-Döbler, I. 2000. Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3078-3082.
- Chen, M.Y., Lin, G.H., Lin, Y.T., and Tsay, S.S. 2002. *Meiothermus taiwanensis* sp.nov., a novel filamentous, thermophilic species isolated in Taiwan. Int. J. Syst. Evolut. Microbiol. **52**: 1647-1654.
- Chen, T.L., Chou, Y.J., Chen, W.M., Arun, B., and Young, C.C. 2006. *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring. Extremophiles **10**: 35-40.

- Chung, A.P., Rainey, F., Nobre, M.F., Burghardt, J., and da Costa, M.S. 1997. *Meiothermus cerbereus* sp. nov., a new slightly thermophilic species with high levels of 3-hydroxy fatty acids. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 1225-1230.
- Crosby, L.D., and Criddle, C.S. 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to *rrn* operon copy number heterogeneity. *BioTechniques* **34**: 1-9.
- Desjardins, E., and Beaulieu, C. 2003. Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 141-145.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., and Kuske, C.R. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1662-1669.
- Ekman, J., Kosonen, M., Jokela, S., Kolari, M., Korhonen, P., and 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**: 203-211.
- Findlay, R.H., and Watling, L. 1998. Seasonal variation in the structure of a marine benthic microbial community. *Microb. Ecol.* **36**: 23-30.
- Freitas, M., Rainey, F.A., Nobre, M.F., Silvestre, A.J.D., and 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**: 376-381.
- Gordon, D.A., and Giovannoni, S.J. 1996. Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1171-1177.
- Haack, S.K., Garchow, H., Klug, M.J., and Forney, L.J. 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproductibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1458-1468.
- Hayashi, N.R., Ishida, T., Yokota, A., Kodama, T., and Igarashi, Y. 1999. *Hydrogenophilus thermoluteolus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 783-786.
- Ingrassia, I., Roques, C., and Prévost, F. 2001. Preliminary experiments for ARDRA validation on flora associated with intestinal mucosa. *Lait* **81**: 263-280.

- Keith-Roach, M.J., Bryan, N.D., Bardgett, R.D., and Livens, F.R. 2002. Seasonal changes in the microbial community of a salt marsh, measured by phospholipids fatty acid analysis. *Biogeochemistry* **60**: 77-96.
- Kolari, M., Nuutinen, J., Rainey, F.A., and Salkinoja-Salonen, M.S. 2003. Colored moderately thermophilic bacteria in paper-machine biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 225-238.
- Kolari, M., Nuutinen, J., and 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**: 343-351.
- Lagacé, L., Pitre, M., Jacques, M., and Roy, D. 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rRNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2052-2060.
- Lahtinen, T., Kosonen, M., Tirola, M., Vuento, M., and Oker-Blom, C. 2006. Diversity of bacteria contaminating paper machines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 734-740.
- Liesack, W., Weyland, H., and Stackebrandt, E. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* **21**: 191-198.
- Merk, S., Neubauer, H., Meyer, H., and Greiser-Wilke, I. 2001. Comparison of different methods for the isolation of *Burkholderia cepacia* DNA from pure cultures and waste water. *Int. J. Hygiene Environ. Health* **204**: 127-131.
- Meyerhans, A., Vartanian, J.-P., and Wain-Hobson, S. 1990. DNA recombination during PCR. *Nucl. Acids Res.* **18**: 1687-1691.
- Moreira, C., Rainey, F.A., Nobre, M.F., da Silva, M.T., and 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**: 735-742.
- Moyer, C.L., Dobbs, F.C., and Karl, D.M. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 871-879.



- Prévost, K., Couture, G., Shipley, J.W., Brzezinski, R., and Beaulieu, C. 2006. Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. *BioControl*. **51**: 533-546.
- Reysenbach, A.-L., Giver, L.J., Wickham, G.S., and Pace, N.R. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3417-3418.
- Rowbottom, R.S. 1988. Bacteria cause fatal explosion at corrugating medium mill. *Pulp Paper Can.* **90**: 75-81.
- Safade, T.L. 1988. Tackling the slime problem in a paper-mill. *Paper Technol. Ind.* **29**: 280-285.
- Stöhr, R., Waberski, A., Liesack, W., Völker, H., Wehmeyer, U., and Thomm, M. 2001. *Hydrogenophilus hirschii* sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing  $\beta$ -proteobacterium isolated from Yellowstone National Park. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 481-488.
- Suihko, M.-L., Sinkko, H., Partanen, L., Mattila-Sandholm, T., Salkinoja-Salonen, M., and Raaska, L. 2004. Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 1228-1235.
- Väätänen, P., and Niemelä, S.I. 1983. Factors regulating the density of bacteria in process waters of a paper mill. *J. Appl. Bacteriol.* **54**: 367-371.
- Väisänen, O.M., Mentu, J., and Salkinoja-Salonen, M.S. 1991. Bacteria in food packaging paper and board. *J. Appl. Bacteriol.* **71**: 130-133.
- Väisänen, O.M., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Marmo, S.A., and Salikinoja-Salonen, M.S. 1994. Structure and composition of biological slimes on paper and board machines. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 641-653.
- Väisänen, O.M., Weber, A., Bennasar, A., Rainey, F.A., Busse, H.J., and Salkinoja-Salonen, M.S. 1998. Microbial communities of printing paper machines. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 1069-1084.
- Verschuere, L., Fievez, V., Van Vooren, L., and Verstraete, W. 1997. The contribution of individual populations to the Biolog pattern of model microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 353-362.

Ward, D.M., Weller, R., and Bateson, M.M. 1990. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well-studied thermal community. *FEMS Microbiol. Rev.* **5**: 105-116.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.

## CHAPITRE 2

### PROFIL PHYSIOLOGIQUE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES COLONISANT LA PARTIE HUMIDE DES MACHINES À PAPIER CANADIENNES

L'analyse Biolog de quatre différents sites d'échantillonnage de la partie humide de deux machines à papier canadiennes a été effectuée sur une période de douze mois. Des variations spatio-temporelles ont été détectées durant cette période d'étude. Les variations étaient beaucoup plus importantes entre les différents sites d'échantillonnage d'une même machine à papier qu'entre des sites homologues situés sur deux machines différentes. La température d'incubation des microplaques Biolog s'est avérée être un facteur important pour la distinction des profils physiologiques des communautés bactériennes. Les profils physiologiques des communautés de l'eau des presses et de l'eau blanche recyclée ont subi une plus forte variation lorsque la température d'incubation des microplaques Biolog était de 37°C comparativement à 50°C. D'un autre côté, des observations contraires ont été faites pour l'eau de la caisse d'arrivée et l'eau clarifiée. Les microplaques incubées à 50°C démontraient une meilleure discrimination de ces communautés que celles incubées à 37°C. Le profil physiologique obtenu avec l'analyse Biolog semble être une méthode rapide et efficace pour comparer les communautés microbiennes de l'eau de procédé d'une usine de pâte et papier sur une longue période de temps.

Ces travaux sont décrits au chapitre 2 de ce mémoire. Ce chapitre est constitué de l'article suivant : Véronique Prince, Anne-Marie Simao-Beauvoir et Carole Beaulieu. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (à soumettre pour publication).

La contribution des auteurs se répartit comme suit. Véronique Prince a effectué l'échantillonnage, l'évaluation des communautés microbiennes avec la méthode Biolog et les analyses statistiques. Anne-Marie Simao-Beanoir a participé à l'interprétation des analyses statistiques. L'article a été rédigé par Véronique Prince et l'ensemble des travaux a été supervisé par Carole Beaulieu.

PRINCE, V., SIMAO-BEAUNOIR, A.-M. and BEAULIEU, C. Physiological profiles of microbial communities colonizing the wet end of Canadian paper machines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (à soumettre)

**Physiological profiles of microbial communities colonizing the wet end of Canadian paper machines**

Véronique Prince, Anne-Marie Simao-Beauvoir and Carole Beaulieu\*

Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de biologie,  
Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada, J1K 2R1

\*Corresponding author

Département de biologie

Université de Sherbrooke

2500 Boulevard Université

Sherbrooke, Qc

Canada

J 1K 2R1

Phone : (819) 821 8000 ext. 62997

Fax : (819) 821 8049

E-mail: Carole.Beaulieu@USherbrooke.ca

**Abstract** Biolog analysis of four different sampling sites of the wet end of the two paper machines of a Canadian paper mill was carried out over a 12 month period. Temporal and spatial variations of the bacterial communities were detected during this time period. Wider ranges of variation were observed between sampling sites of a same paper machine than between the same site of both machines. Incubation temperature of Biolog microplates was shown to be an important factor to distinguish physiological profiles of bacterial communities. Physiological profiles of both press and recycled white water communities exhibited more variation when Biolog plates were incubated at 37°C rather than 50°C. On contrary, a temperature of 50°C allowed a better discrimination of both the headbox and clarified water communities. Physiological profiling appears to be a rapid and efficient method to compare microbial communities of industrial process waters over a long time period.

**Keywords** Microbial community, Biolog, Principal component analysis

## **Introduction**

Paper machines comprise two sections, the wet end and the dry end. Paper fabrication begins in the wet end section and terminates in the second section where the paper sheet is dried. All paper making materials are mixed in the headbox of the wet end and are then distributed on the wire of the same section to produce a paper sheet. The paper making materials on the wire pass through presses to extract water. The extraction of water is also facilitated by the presence of suction boxes. Finally, many showers are installed on the wet end of paper machine to wash presses and wire sections.

Water is an essential component in the paper making process. Although paper mills recycled most process waters, fresh water from rivers needs to be introduced in paper mills to compensate water that is lost during the paper making process. Fresh water supply still is not negligible.

Paper industries called white waters any process water containing quantifiable amounts of fibers. The combination of the process waters recovered from the wire, the presses and the suction boxes is called recycled white water. This water can be directly returned to the headbox as dilution water or it can be filtered to give the clarified water that supplying the showers of the paper machines.

Although microorganisms could affect the paper making processes, temporal or spatial changes within microbial communities associated with process water of paper mills have not been extensively studied [20]. Kashama et al (2009) used Biolog plates to estimate the variation within the microbial communities of the headbox water of two



Canadian paper machines over a one year-period. However, microbial communities associated with other process waters have not been characterized.

Characterization of microbial communities by culture-based approaches can be biased since microorganisms are selected by their abilities to grow under determined conditions. Molecular techniques such as DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) [32], TGGE (Temperature gradient gel electrophoresis) [28], T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) [27] or biochemical determination of the phospholipid fatty acid composition [17, 21] are efficient methods to determine the diversity within a bacterial community. However, these methods are expensive or time-consuming.

Biolog analysis, originally developed for identification of bacterial isolates [11], represents a fast alternative method for studying community structure of microorganisms in natural environments. This method is based on the carbon utilization and the respiratory activity of microbial community. Pattern analysis of carbon source oxidation was used to characterize various microbial communities inhabiting soil [1, 7, 16], water [4], rhizosphere [12-13], sediments [10], and activated sludge [15, 39].

Wells of Biolog microplates contain specific carbon sources, necessary nutrients and tetrazolium violet, a redox dye that indicates utilization of carbon sources. During bacterial respiration, tetrazolium salts are reduced to produce formazan. Deposition of formazan into the active cells results in a purple coloration of the microplate well medium. As other techniques, Biolog analysis also comprises some bias. The artificial electron acceptors can distort the real structure of the microbial community since some bacteria are not able to reduce tetrazolium salts or since their metabolic activity can be suppressed by

the indicator of respiratory activity [18, 37]. Furthermore, dormant or inactive cells, small bacteria, microorganisms having low respiration rates and cell permeability influence both production and detectability of formazan [6, 14, 26, 36, 40]. Carbon utilization pattern of a community does also not necessarily reflect the functional potential of the community at the time of inoculation or dominant members of the microbial community [16, 33, 38]. However, this method had proved to be powerful to demonstrate that human activities like pesticide application can influence microbial community in diverse environments [7].

In this study, we use Biolog analysis to compare the microbial communities from several parts of the wet end of two paper machines of a Canadian mill. Physiological profile of the microbial community associated with the recycled white water, clarified water as well as with process waters from the headbox and the presses section was determined monthly during a one year period.

## **Material and methods**

### *Sample collection*

Samples of process waters (1 L) from two Canadian paper machines of a same paper mill were collected monthly from June 2005 to May 2006 and the sample temperature was then recorded. Samples were collected at four sites of the wet end of the paper machines: headbox, press, clarified and recycled white water tank.

### *Extraction of bacteria from process waters*

The headbox water was centrifuged at 100 g for 20 min to precipitate pulp. The supernatant was kept at room temperature and the pellet was washed three times with sterile saline (0.85% NaCl) to recover most microorganisms from pulp. Microorganisms were extracted from the saline, the clarified water, the press water and the recycled white water by centrifugation at 3500 g. Bacterial pellets from the treated headbox water and from the other process waters were resuspended in saline, filtered through a 5µm pore size filter (Millipore Millex-SV filter unit, Carrigtwohill, Ireland) to remove the pulp traces and these solutions containing cells were finally diluted in saline to obtain an optical density (OD) at 595 nm of 0.01. These suspensions were used to inoculate Biolog microplates.

### *Metabolic profile of the microbial communities*

Wells of two Biolog Ecoplates (Biolog, Inc., Hayward, CA) were inoculated with 150 µl of a cell suspension (see the above section). These plates were placed in a plastic bag containing a humidified paper. One of these two plates was incubated at 37°C and the other at 50°C. The OD<sub>595</sub> was read after 96 hours of incubation using a BIO-TEK FL600 fluorescence plate reader and the KC4 v2.5 Software (BIO-TEK Instruments Inc., Winooski, VE). The OD value associated to the control well that contained no carbon source was subtracted from the reading of all the other wells. For each sampling date and sampling site, two water samples were analyzed and the Biolog assay was carried out in triplicate. A carbon source was considered oxidized by a bacterial community when corrected OD<sub>595</sub> was higher than 0.05 after 96 h of incubation.

The utilization frequency (F) of a carbon source by bacterial community of paper mill process water was estimated by determining the ratio between the number of positive readings for a carbon source and the total number of readings that has been scored for this same carbon source.

Metabolic profiles of bacterial communities associated with process waters were compared using principal component analysis (PCA) as described by Prévost et al. [30] and by determining Dissimilarity index (D) as follows.

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n |A_i - B_i|}{n}$$

where A and B are the utilization frequency of microbial community A and B, respectively; i, the carbon source; and n, the number of carbon sources.

## Results

### *Sample temperatures*

Both headbox and clarified waters temperature was about 50°C all year long whereas temperature of waters associated with press and recycled white tank varied between 36° and 44°C (Table 1). Temperatures of both the headbox water and the recycled white water samples did significantly differ between machines #7 and #8 but the ones associated with clarified and press waters did not (t-test,  $p > 0.05$ ).

**Table 1** Temperature of process waters from two paper machines

Month	Temperature (°C)							
	Headbox water		Clarified water		Press water		Recycled white water	
	Machine 7	Machine 8	Machine 7	Machine 8	Machine 7	Machine 8	Machine 7	Machine 8
June 2005	55.8	52.8	53.9	51.4	52.0	47.8	42.6	35.7
July 2005	55.0	52.1	53.6	50.7	45.4	46.5	41.6	36.7
August 2005	53.9	52.2	52.4	48.9	46.1	46.1	40.9	38.1
September 2005	50.8	49.5	50.1	51.3	42.8	47.5	37.0	37.0
October 2005	54.0	51.7	50.9	50.0	45.7	45.8	40.7	35.7
November 2005	53.8	51.9	51.0	50.2	39.1	45.5	40.0	37.4
December 2005	52.3	50.3	51.3	50.6	40.6	38.8	38.9	34.0
January 2006	51.3	50.5	51.3	49.1	47.1	44.1	40.0	34.1
February 2006	50.5	51.1	50.4	51.2	39.4	46.6	38.7	38.4
March 2006	53.9	52.6	49.7	51.5	40.4	36.9	37.6	31.9
April 2006	50.9	50.2	51.1	51.9	43.2	42.2	38.4	37.3
May 2006	50.1	50.6	50.8	48.6	41.1	41.9	40.0	36.6
Mean temperature <sup>a</sup>	52.7 ± 1.9	51.3 ± 1.1	51.4 ± 1.3	50.5 ± 1.1	43.6 ± 3.8	44.1 ± 3.5	39.7 ± 1.6	36.1 ± 1.9
p- value <sup>b</sup>	0.04 <sup>c</sup>		0.07		0.71		0.00 <sup>c</sup>	

<sup>a</sup> Average annual temperature with standard deviation.

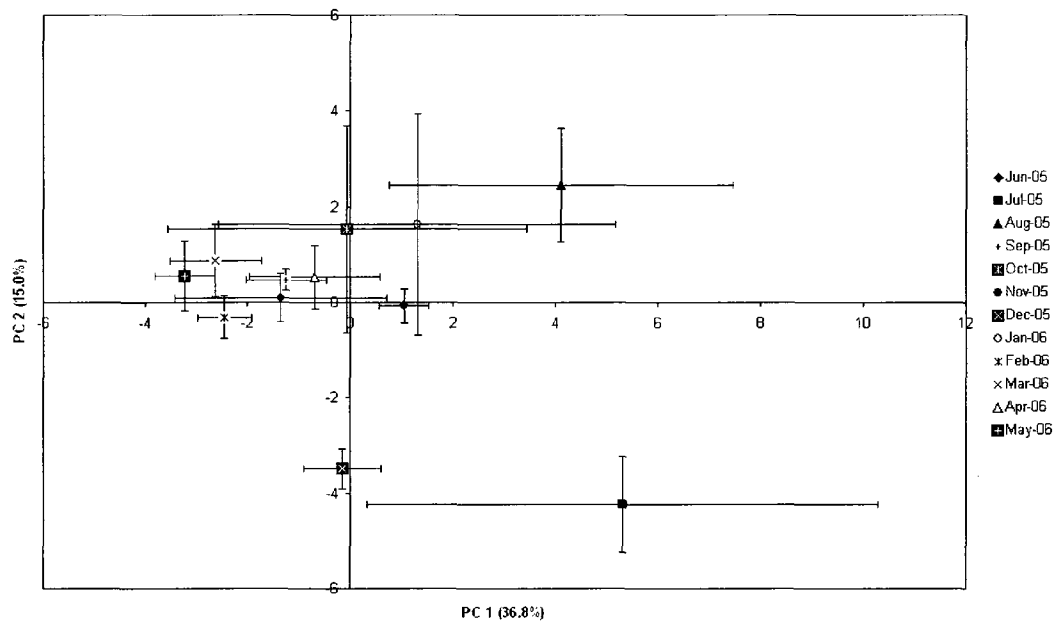
<sup>b</sup> Probability that water temperature of machines 7 and 8 did not differ (t-test).

<sup>c</sup> p-values associated with these comparisons were smaller than the significance level of 0.05

*Temporal and spatial variations in the bacterial communities of process water*

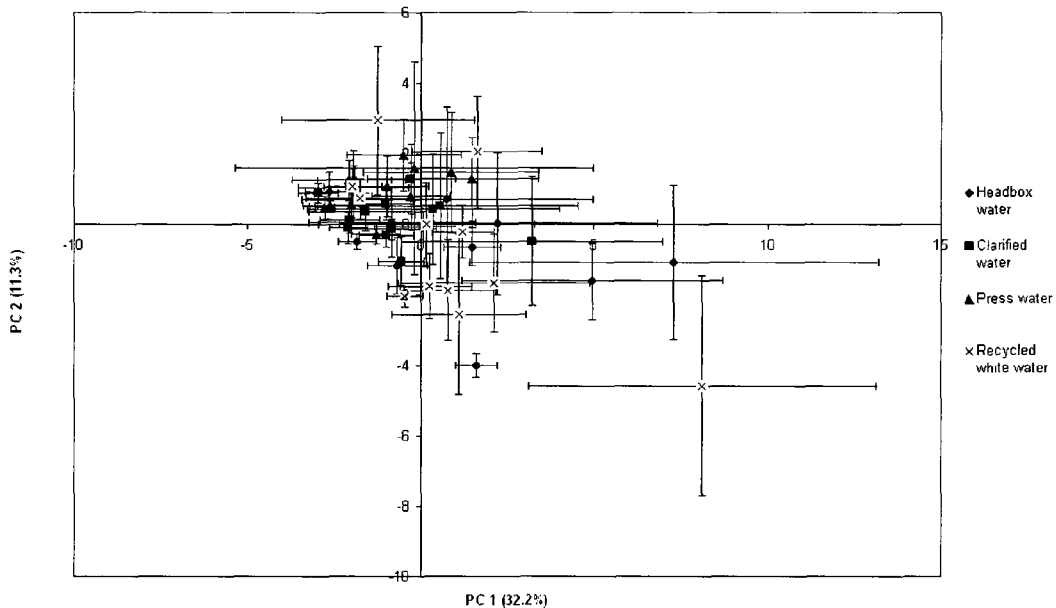
The physiological profiles of bacterial communities associated with process waters of a paper mill were compared within months, sampling sites and machines using PCA. Effect of the incubation temperature on physiological profiles was also analyzed. Each point in the following figures represents a sampling site at a specific month. The horizontal and vertical bars represent, respectively, the standard deviation for principal components 1 and 2.

Figure 1 illustrates the temporal variation in the physiological profiles of the headbox water bacterial community associated with machine 7 when Biolog plates were incubated at 50°C. Monthly variations were observed for each sampling site. However, most standard deviation bars intercepted each other indicating that the metabolic profiles of bacterial communities were quite similar. In this case, the first and second principal components accounted for 36.8% and 15.0% of the variance, respectively. Data associated with the headbox water samples of July and December 2005 did not cluster with the other points along the principal component 2 axis. Similar data were obtained for the headbox water of machine 8 (data not shown). Such difference was however not observed for July and December 2005 when the incubation temperature of the Biolog plates was of 37°C (data not shown).



**Fig 1** Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the headbox microbial communities of paper machine #7 generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 50°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.

PCA was also carried out to evaluate spatial variations within the bacterial communities of paper machines. Figure 2 presents PCA on physiological profiles of bacterial communities associated with the four sampling sites of paper machine 7. First and second principal components explain 32.2% and 11.3% of the variance, respectively. Data associated with clarified water and press water samples all clustered in the center of graph. More variation was observed within the communities of both headbox and recycled white water samples. Although data from most samples of both sites clustered in the center of graph, some expanded along the first principal component. Similar data were obtained for machine 8 (data not show).

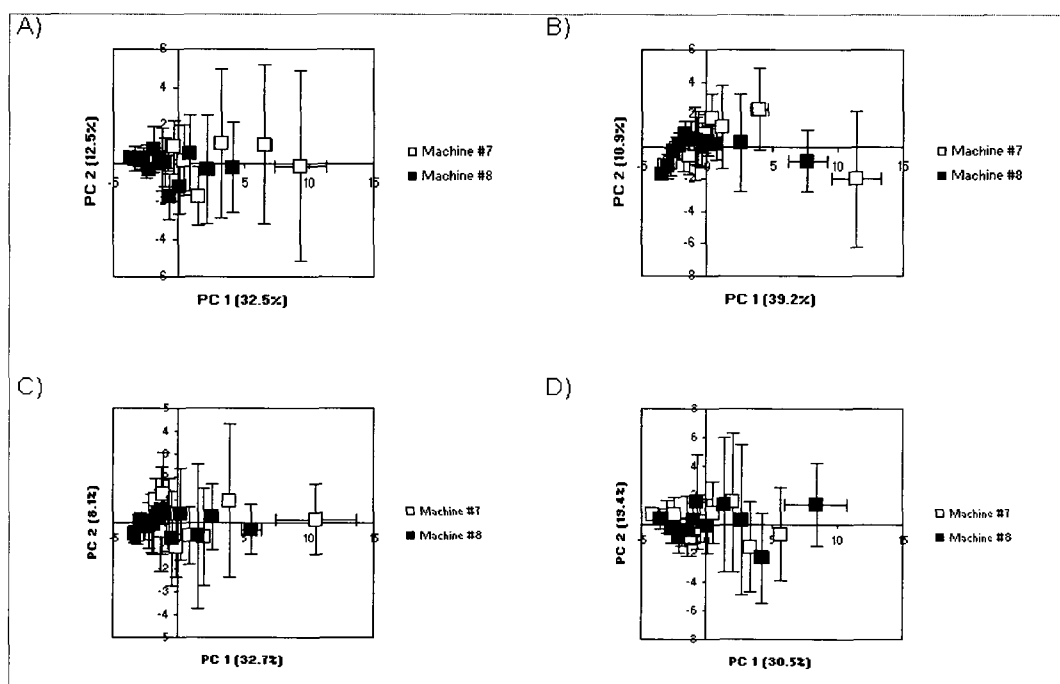


**Fig 2** Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the process water microbial communities of paper machine #7 generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 50°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.

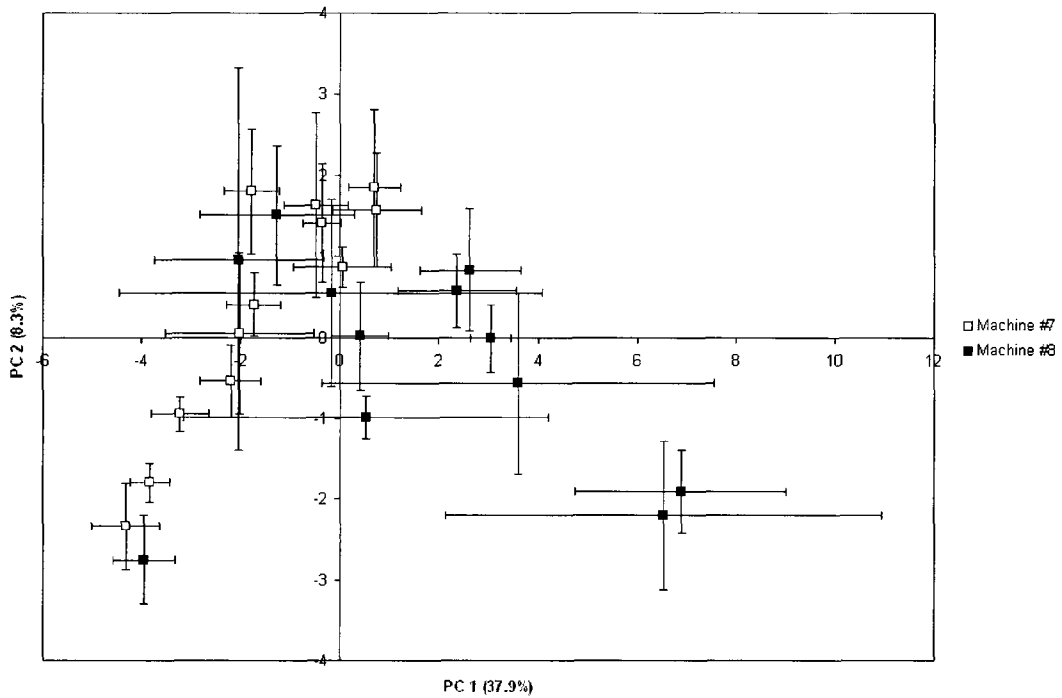
Spatial variation of the bacterial communities was not only evaluated within sites of a same machine but was also evaluated within different paper machines (# 7 and 8). Figure 3 showed no drastic variation among the sampling sites of both machines when Biolog plates were incubated at 50°C (Fig. 3). For each sampling site, data associated with machine #7 extended more widely in the graph than data from machine #8, which were almost always included in the area covered by data from machine #7. However, metabolic profiles of recycled white water differed more substantially between machines when the Biolog EcoPlates were incubated at 37°C. For example, Figure 4 presents PCA of metabolic profiles of bacterial communities associated with the recycled white water of



both paper machines. In this assay carried out at 37°C, the first and second principal components accounted for 37.9% and 8.3% of the variance, respectively. Most data from machine 7 located in the left side of graph and span considerably along the second component axis. On the other hand, most data from machine 8 located in the right side of graph and were widely distributed along the component 1 axis.

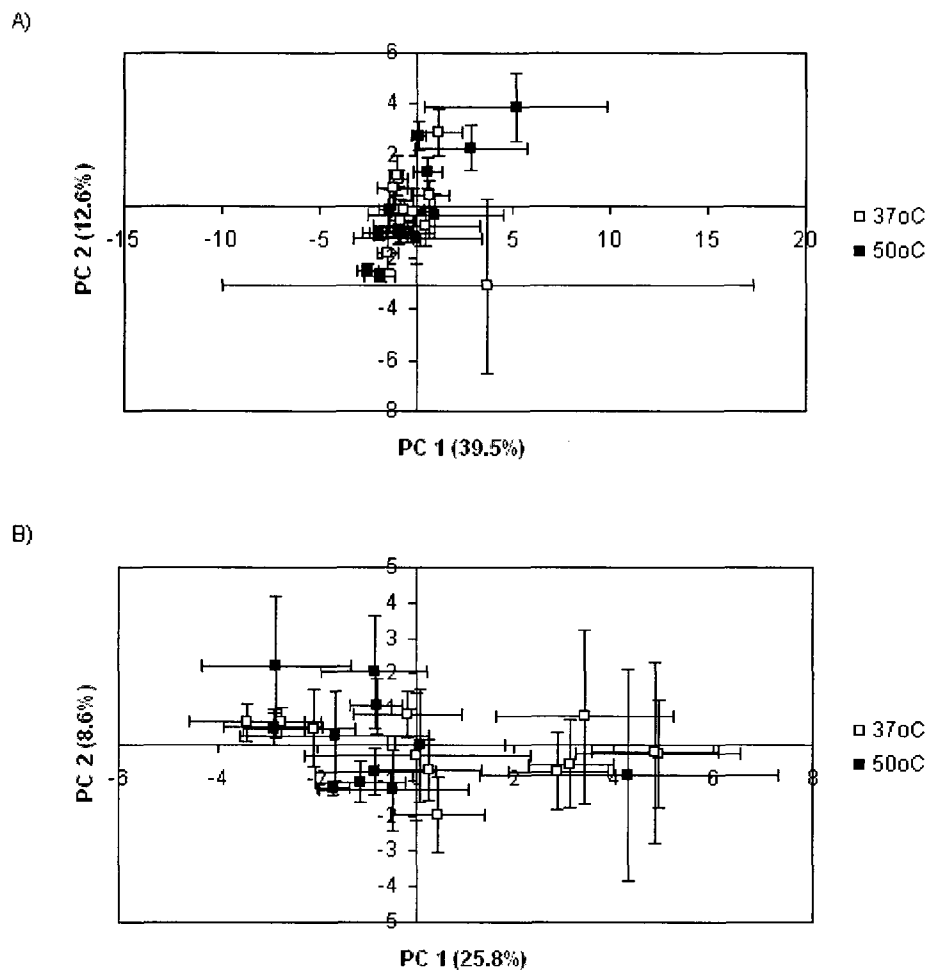


**Fig 3** Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the process water microbial communities of paper machines #7 and 8 generated with Biolog EcoPlates. (A) Headbox water, (B) Clarified water, (C) Press water and (D) Recycled white water. The plates were incubated at 50°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.



**Fig 4** Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the recycled white water microbial communities of paper machines #7 and 8 generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 37°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.

PCA was thus carried out to evaluate effect of the incubation temperature on the microbial profiles. Figure 5 presents PCA done on physiological profiles obtained after incubation at 37°C or 50°C for microbial communities associated with two sampling sites of machine 7. Wider variation was observed within the headbox communities when Biolog Ecoplates were incubated at 50 rather than 37°C (Fig. 5A). Indeed, points associated with profiles obtained at 50°C were widely distributed along principal component 1 and 2 that accounted for 39.5% and 12.6% of the variance, respectively. Points associated with physiological profiles obtained at 37°C clustered more closely. Similar patterns were obtained for clarified water samples incubated at 37°C and 50°C (data not show). In contrast, variation in the physiological profiles was more important when both recycled white water (Fig 5B) and press water (data not shown) communities were incubated at 37°C rather than 50°C. The points associated with profiles obtained at 37°C were widely distributed along principal component 1 that accounted for 25.8% of the variance.



**Fig 5** Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the headbox (A) and recycled white waters (B) microbial communities of paper machine #7 generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 50 or 37°C for 96 hours. PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. Vertical and horizontal lines represent standard errors (SE) of the mean ( $n = 2$ ); data points represent the months.

### *Carbon source utilization*

Table 2 shows the utilization frequency of Biolog carbon sources at 50°C by bacterial community of both paper machines 7 and 8 at each sampling site. Pyruvic acid methyl ester, Tween 40, Tween 80, L-asparagine and L-serine were the five most frequently utilized substrates of the paper machine communities. In contrast, glucose-1-phosphate and 2-hydroxy benzoic acid were rarely oxidized by the bacterial members of these communities. The utilization frequency of some carbon sources could vary considerably within sampling sites. For example, utilization frequency of D-xylose was of 40 to 50% for the headbox and recycled white water communities and only of about 10% for both clarified and press water communities.

**Table 2** Utilization frequency at 50°C of Biolog Ecoplate's carbon sources by water process microbial communities

Carbon source	Utilization frequency (%)								All sites of both machines (standard deviation)
	Headbox water		Clarified water		Press water		Recycled white water		
	Machine 7	Machine 8	Machine 7	Machine 8	Machine 7	Machine 8	Machine 7	Machine 8	
pyruvic acid									
methyl ester	100	100	100	100	100	100	99	93	99 (2)
tween 40	100	99	100	100	99	100	83	79	95 (6)
tween 80	81	83	76	92	72	89	74	85	81 (5)
cyclodextrin	24	24	28	44	33	40	31	38	33 (6)
glycogen	39	39	38	50	17	28	47	47	38 (8)
D-cellobiose	14	7	13	18	10	18	13	26	15 (4)
D-lactose	11	3	11	18	17	14	14	11	12 (3)
B-methyl-D-									
glucoside	11	3	4	10	6	10	8	3	7 (2)
D-xylose	49	57	8	8	8	13	53	58	32 (17)
i-erythritol	11	14	10	17	17	19	10	14	14 (3)
D-mannitol	10	15	14	29	19	32	22	19	20 (5)
N-acetyl-D-									
glucosamine	21	13	11	28	15	29	24	26	21 (5)
D-glucosaminic									
acid	19	7	3	18	3	13	8	15	11 (5)
glucose-1-									
phosphate	6	6	1	10	1	6	3	6	5 (2)
D,L-glycerol									
phosphate	22	10	11	15	14	18	17	19	16 (3)
D-galactonic									
acid lactone	38	32	33	18	15	14	18	32	25 (7)
D-galacturonic									
acid	46	50	25	36	21	22	54	74	41 (13)
2-hydroxy									
benzoic acid	3	3	3	6	4	4	6	13	5 (2)

**Table 2** Utilization frequency at 50°C of Biolog Ecoplate's carbon sources by water process microbial communities

4-hydroxy									
benzoic acid	57	64	60	53	32	60	58	60	55 (7)
hydroxybutyric									
acid	56	42	54	53	51	50	67	83	57 (9)
itaconic acid	31	19	32	18	26	17	33	43	27 (7)
ketobutyric acid	8	3	3	13	7	7	8	11	7 (3)
D-malic acid	58	47	54	40	22	28	40	46	42 (9)
L-arginine	71	76	54	60	22	58	72	85	62 (14)
L-asparagine	82	85	75	78	44	71	85	86	76 (10)
L-phenylalanine	21	11	6	17	15	28	15	19	16 (5)
L-serine	76	68	49	50	35	53	83	92	63 (14)
L-threonine	14	4	10	11	13	18	14	29	14 (5)
glycyl-L-									
glutamic acid	17	17	18	22	13	22	19	39	21 (6)
phenylethyl-									
amine	6	6	4	14	13	7	13	13	9 (3)
putrecine	65	63	46	47	22	39	63	75	52 (12)

Pyruvic acid methyl ester, tween 40, L-asparagine and tween 20 also represented the substrates the most frequently utilized by water process communities of both paper machines when the Ecoplates were incubated at 37°C (Table 3). The utilization frequency of L-serine was similar at both temperatures. However, the fifth substrate the most frequently utilized at 37°C was 4-hydroxy benzoic acid. The utilization frequency of this compound was 55 and 93% at 50°C and 37°C, respectively. 2-hydroxy benzoic acid was one of the less utilized substrate at 37°C as well as at 50°C. Carbon utilization frequency also varied at some sampling sites. For example, D-cellobiose, D-mannitol, N-acetyl-D-glucosamine, and hydroxybutyric acid that were amongst the most frequently utilized carbon sources by both the press and recycled white water communities but were only rarely oxidized by the headbox and clarified water communities.

**Table 3** Utilization frequency of various substrates by microbial community when Ecoplates were incubated at 37°C from June 2005 to May 2006

Carbon source	Utilization frequency (%)								All sites of both machines (standard deviation)
	Headbox water		Clarified water		Press water		Recycled white water		
	Machine 7	Machine 8	Machine 7	Machine 8	Machine 7	Machine 8	Machine 7	Machine 8	
pyruvic acid methyl ester	100	97	100	100	100	100	94	92	98 (2)
tween 40	99	97	100	100	100	100	85	85	96 (5)
tween 80	92	90	90	76	92	90	85	89	88 (4)
cyclodextrin	13	13	14	15	28	40	10	56	23 (12)
glycogen	31	21	26	39	71	56	39	68	44 (14)
D-cellobiose	10	11	10	17	63	67	38	68	35 (19)
D-lactose	11	13	15	15	38	38	18	47	24 (10)
B-methyl-D-glucoside	6	6	10	8	31	42	6	36	18 (11)
D-xylose	75	63	65	32	89	71	75	85	69 (13)
i-erythritol	7	7	7	10	32	17	10	26	14 (7)
D-mannitol	17	13	13	14	65	64	39	67	36 (18)
N-acetyl-D-glucosamine	3	8	10	17	69	57	47	60	34 (20)
D-glucosaminic acid	11	7	7	8	8	4	6	19	9 (3)
glucose-1-phosphate	4	4	6	10	28	26	3	15	12 (7)
D,L-glycerol phosphate	15	15	31	18	31	32	14	26	23 (6)
D-galactonic acid lactone	22	24	49	47	82	68	29	60	48 (16)
D-galacturonic acid	35	31	38	25	85	69	58	75	52 (16)
2-hydroxy benzoic acid	6	4	6	4	3	4	6	6	5 (1)



**Table 3** Utilization frequency of various substrates by microbial community when Ecoplates were incubated at 37°C from June 2005 to May 2006

4-hydroxy benzoic acid	96	96	99	100	94	92	85	82	93 (5)
hydroxybutyric acid	15	18	18	26	74	46	43	60	38 (16)
itaconic acid	6	4	19	19	13	22	13	31	16 (6)
ketobutyric acid	4	4	10	6	11	26	8	42	14 (10)
D-malic acid	71	63	81	72	89	96	71	81	78 (8)
L-arginine	93	86	93	71	92	76	79	88	85 (6)
L-asparagine	99	96	97	83	92	92	86	89	92 (4)
L-phenylalanine	13	14	28	21	28	38	26	46	27 (8)
L-serine	63	56	42	40	64	57	76	86	60 (11)
L-threonine	11	11	17	19	44	33	42	58	30 (13)
glycyl-L-glutamic acid	21	15	18	22	49	39	21	51	30 (10)
phenylethyl-amine	3	7	10	1	6	14	10	24	9 (5)
putrecine	90	90	93	85	83	89	79	83	87 (3)

Table 4 shows the dissimilarity index between physiological profiles of the microbial communities associated with the four sampling sites of paper machines #7 and 8. The dissimilarity index between microbial communities of machines 7 and 8 were below 10% for all sampling sites when Ecoplates were incubated at 50°C. Similar results were obtained at 37°C for all sites except the recycled white water tank. Dissimilarity index between machines 7 and 8 was 16% for this site.

**Table 4** Dissimilarity index between the physiological profiles of microbial communities associated with paper machines # 7 and 8

Sampling site	Dissimilarity index (%) <sup>a</sup>	
	50°C	37°C
Headbox water	6	3
Clarified water	8	7
Press water	9	8
Recycled white water	7	16

<sup>a</sup> Physiological profiles were generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 50 or 37°C for 96 hours

The incubation temperature of Biolog plates had an influence on the dissimilarity index obtained for the different sampling sites of a same paper machine. The dissimilarity index between physiological profiles of bacterial communities associated with different sampling sites of paper machines #7 or 8 were generally higher at 37°C than at 50°C (Tables 5 and 6). This index varied from 6 to 26% when the profiles were generated with Biolog EcoPlates incubated at 37°C and from 5 to 15% when the plates were incubated at 50°C.

**Table 5** Dissimilarity index between the physiological profiles of microbial communities associated with different process waters of paper machine # 7

Sampling site	Dissimilarity index (%) <sup>a</sup>							
	Headbox water		Clarified water		Press water		Recycled white water	
	37°C	50°C	37°C	50°C	37°C	50°C	37°C	50°C
Headbox water	-	-	-	-	-	-	-	-
Clarified water	6	8	-	-	-	-	-	-
Press water	21	15	19	9	-	-	-	-
Recycled white water	11	6	12	10	16	14	-	-

<sup>a</sup> Physiological profiles were generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 50 or 37°C for 96 hours

**Table 6** Dissimilarity index between the physiological profiles of microbial communities associated with different process waters of paper machine # 8

Sampling site	Dissimilarity index (%) <sup>a</sup>							
	Headbox water		Clarified water		Press water		Recycled white water	
	37°C	50°C	37°C	50°C	37°C	50°C	37°C	50°C
Headbox water	-	-	-	-	-	-	-	-
Clarified water	8	11	-	-	-	-	-	-
Press water	20	11	18	5	-	-	-	-
Recycled white water	26	11	25	13	10	15	-	-

<sup>a</sup> Physiological profiles were generated with Biolog EcoPlates. The plates were incubated at 50 or 37°C for 96 hours

Table 7 also shows the effect of the incubation temperature on the physiological profile. Dissimilarity index obtained from a same sampling site between Ecoplates incubated at 37°C and 50°C was higher for the press water samples of both paper machines (33 and 22% for machines 7 and 8, respectively). The index varied from 9 and 18% for the other sampling sites.

**Table 7** Dissimilarity index between the physiological profiles of process water microbial communities generated at 37 and 50°C

Sampling site	Dissimilarity index (%)	
	Machine 7	Machine 8
Headbox water	12	9
Clarified water	14	12
Press water	33	22
Recycled white water	11	18

## Discussion

It has been established that composition of bacterial communities differs between paper mills [35] or paper machines [23]. However, few studies focused on temporal and spatial variations of microbial communities colonizing paper mill waters. Kashama et al. [20] who examined the physiological profiles of communities colonizing the headbox water of two paper machines of a same Canadian mill producing fine grade paper did not observe significant variation between paper machines. The present study has been carried out on the same two paper machines of this Canadian paper mill. In addition to the headbox water microflora, communities associated with other process waters of the paper mill were also examined.

PCA analyses revealed wider variations in the profiles of process water communities of machine 7 than of machine 8. Surface of PCA graph covered by data points associated with machine 7 superposed mostly the ones of machine 8 indicating that

headbox communities of paper machines 7 and 8 were similar. Our results thus concur with those of Kashama et al. [20] who analyzed headbox of the same two machines. They found no significant spatial variation between microbial communities of both machines. The dissimilarity index that compared the utilization frequency of the carbon compounds into Biolog plates by communities of both machines was weak for all sites but the recycled white water tank. The dissimilarity index between the recycled white water from machines 7 and 8 was only of 7% when the assay was carried out at 50°C but reached 16% for tests carried out at 37°C. Interestingly, recycled white water was the sampling site where the temperature variation between machines was the highest. Other studies reported that temperature variations of only 5°C greatly influence microbial diversity [34].

Temperature appears to be a critical factor determining the composition of the bacterial community of paper mill process waters. The highest dissimilarity indexes between profiles generated at 37 and 50°C were associated with the press water community from both machines 7 and 8. Interestingly, press water of both machines showed a mean annual temperature (44°C) that was intermediary between the ones of recycled white water (38°C) and clarified and headbox waters (51-52°C). This intermediary temperature could possibly support the growth of both thermophilic and mesophilic bacteria whereas recycled white water and clarified and headbox waters would select for thermophilic and mesophilic bacteria, respectively.

Most of studies using Biolog microplates have been carried out at a specific temperature. Incubation of Biolog plates at two different temperatures, as it has been done in this study, could however be an interesting tool in the identification of bacterial populations responsible for shift in microbial communities. In this study, PCA analyses

clearly showed that more variation in the bacterial communities of both headbox and clarified waters were detected when Biolog plates were incubated at 50°C whereas an incubation temperature of 37°C allowed a better differentiation within the physiological profiles of press and recycled white waters communities. Different incubation temperature to follow microbial communities of ecosystems encountering temperature variation seems to be a good strategy to detect changes in microbial community structure.

Spatial variation within the physiological profiles of paper mill community was higher within sites of a same machine (dissimilarity indexes from 5 to 26%) than within a same site from the two paper machines (dissimilarity indexes from 3 to 16%). These results suggest that geographical site, paper making process and raw materials are determinant factors in composition of the bacterial paper machine communities.

In a previous study done in the same paper mill, Kashama et al. [20] detected temporal variation in metabolic profiles of headbox water bacterial communities especially in the month of July. In the present study, temporal variation was the highest in both July and December. These temporal variations could be related to the seasonal changes. Indeed the incoming and the quality of river water vary between seasons in paper mills [14, 17]. Turbidity represents one of the most important water mill quality parameters. Turbidity is affected by seasons [24] since it depends on the amount of suspended matters in water including microorganisms as well as on precipitation rate and temperature [9]. Furthermore, seasons have a direct impact on bacterial population [2, 8]. Liss and Allen [25] even noted that bacterial population of a Canadian paper mill effluent varies within months and that this fluctuation was influenced by temperature.

In addition to paper making materials, both fresh water and recycled water from the paper fabrication process transit into the headbox. Bacterial communities of the headbox are thus considered as important contaminants of paper machine. Nevertheless, unexpected microbial proliferation at specific sites of a paper machine can occur following a shift of temperature or pH [3], addition of contaminated additives in process waters [31], longer retention time or important incoming of fresh water in some chests [19] as well as airborne contamination. Our study demonstrated that physiological profiling using Biolog Ecoplates discriminated communities from closely related habitats. Biolog analysis of microbial communities could be successfully used to detect changes in the microbial community structure and could represent a powerful integrating way to study microbial community structure over a long period of time.

Using Biolog plates for comparing physiological profile of bacterial communities does not, however, allow the direct identification of species or populations responsible for the shift. Different techniques were previously used to identify bacteria colonizing water process or biofilms in paper mills [5, 22, 23, 29] and Kashama et al. [20] established the physiological profile of some paper mill isolates. Investigating the metabolic potential of a wide spectrum of bacterial contaminants found in paper mills could allow the correlation between differential utilization of carbon sources and the presence of specific microorganisms.

**Acknowledgements** This work was supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and a contract from Domtar Inc. We thank Julie Talbot, Richard Gratton, Réjean Beaudoin and coworkers for valuable information on paper fabrication process and for valuable suggestions.



## References

1. Brodie, E., Edwards, S., and Clipson, N. 2002. Bacterial community dynamics across a floristic gradient in a temperate upland grassland ecosystem. *Microbial ecology*. Vol. 44 : 260-270.
2. Brümmer, I. H. M., Fehr, W., and Wagner-Döbler, I. 2000. Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 66, No. 7 : 3078-3082.
3. Chaudhary, A., Gupta, L. K., Gupta, J. K., and Banerjee, U. C. 1997. Studies on slime-forming organisms of a paper mill - slime production and its control. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 18 : 348-352.
4. Choi, K.-H., and Dobbs, F. C. 1999. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of microbiological methods*. Vol. 36 : 203-213.
5. Desjardins, E., and Beaulieu, C. 2003. Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 30: 141-145.
6. Dufour, P., and Colon, M. 1992. The tetrazolium reduction method for assessing the viability of individual bacterial cells in aquatic environments: improvements, performance and applications. *Hydrobiologia*. Vol. 232 : 211-218.
7. Engelen, B., Meinken, K., von Wintzingerode, F., Hueur, H., Malkomes, H.-P., and Backhaus, H. 1998. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 64, No. 8 : 2814-2821.
8. Findlay, R. H., and Watling, L. 1998. Seasonal variation in the structure of a marine benthic microbial community. *Microbial ecology*. Vol. 36 : 23-30.
9. Fitzpatrick, C. S. B., Fradin, E., and Gregory, J. 2004. Temperature effects on flocculation, using different coagulants. *Water science and technology*. Vol. 50, No. 12 : 171-175.
10. Fredrickson, J. M., Balkwill, D. L., Zachara, J. M., Li, S.-M. W., Brockman, F. J., and Simmons, M. A. 1991. Physiological diversity and distributions of heterotrophic bacteria in deep cretaceous sediments of the Atlantic coastal plain. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 57, No. 2 : 402-411.

11. Fulthorpe, R. R., Liss, S. N., and Allen, D. G. 1993. Characterisation of bacteria isolated from a bleached kraft pulp mill wastewater treatment system. *Canadian journal of microbiology*. Vol. 39, No. 1 : 13-24.
12. Garland, J. L., and Mills, A. L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 57, No. 8 : 2351-2359.
13. Garland, J. L. 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil biology & biochemistry*. Vol. 28, No. 2 : 213-221.
14. Gasol, J. M., del Giorgio, P. A., Massana, R., and Duarte, C. M. 1995. Active versus inactive bacteria : size-dependence in a coastal marine plankton community. *Marine ecology progress series*. Vol. 128 : 91-97.
15. Guckert, J. B., Carr, G. J., Johnson, T. D., Hamm, B. G., Davidson, D. H., Kumagai, Y. 1996. Community analysis by Biolog : curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *Journal of microbiological methods*. Vol. 27 : 183-197.
16. Haack, S. K., Garchow, H., Klug, M. J., and Forney, L. J. 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 61, No. 4 : 1458-1468.
17. Hadwin, A. K. M., Del Rio, L. F., Pinto, L. J., Painter, M., Routledge, R., and Moore, M. M. 2006. Microbial communities in wetlands of the Athabasca oil sands: genetic and metabolic characterization. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 55, No. 1 : 68-78.
18. Hurst, C. J., Blannon J. C., Hardaway, R. L., and Jackson, W. C. 1994. Differential effect of tetrazolium dyes upon bacteriophage plaque assay titers. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 60, No. 9 : 3462-3465.
19. Jung, W. K., and Kutzner, H. J. 1978. Microbiologic problems associated with closed process water systems in the paper industry. *European Journal of applied microbiology and biotechnology*. Vol. 5 : 215-224.
20. Kashama, J, Prince, V., Simao-Beaunoir, A.-M., and Beaulieu, C. 2009. Carbon utilization profiles of bacteria colonizing the headbox water of two paper machines in a Canadian mill. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 36 : 391-399.

21. Keith-Roach, M. J., Bryan, N. D., Bardgett, R. D., and Livens, F. R. 2002. Seasonal changes in the microbial community of a salt marsh, measured by phospholipids fatty acid analysis. *Biogeochemistry*. Vol. 60 : 77-96.
22. Kolari, M., Nuutinen, J., Rainey, F. A., and Salkinoja-Salonen, M. S. 2003. Colored moderately thermophilic bacteria in paper machine biofilms. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 30 : 225-238.
23. Lahtinen, T., Kosonen, M., Tirola, M., Vuento, M., and Oker-Blom, C. 2006. Diversity of bacteria contaminating paper machines. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 33 : 734-740.
24. Lechevallier, M. W., Evans, T. M., and Seidler, R. J. 1981. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 42, No. 1 : 159-167.
25. Liss, S. N., and Allen, D. G. 1992. Microbiological study of a bleached kraft pulp mill aerated lagoon. *Journal of pulp and paper science*. Vol. 18, No. 6 : J216-J220.
26. Maki, J. S., and Remsen, C. C. 1981. Comparison of two direct-count methods for determining metabolizing bacteria in freshwater. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 41, No. 5 : 1132-1138.
27. Marsh, T. L. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) : an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current opinion in microbiology*. Vol. 2, No. 3 : 323-327.
28. Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*. Vol. 2, No. 3 : 317-322.
29. Oppong, D., King, V. M., and Bowen, J. A. 2003. Isolation and characterization of filamentous bacteria from paper mill slimes. *International biodeterioration and biodegradation*. Vol. 52 : 53-62.
30. Prévost, K., Couture, G., Shipley, B., Brzezinski, R., and Beaulieu, C. 2006. Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. *BioControl*. Vol. 51, No. 4 : 533-546.
31. Robertson, L. 1994. PIMA magazine. Microbial growth in starch. Vol. 76 : 74-76.

32. Röling, W. F. M., van Breukelen, B. M., Braster, M., Goeltom, M. T., Groen, J., and van Verseveld, H. W. 2000. Analysis of microbial communities in a landfill leachate polluted aquifer using a new method for anaerobic physiological profiling and 16S rDNA based fingerprinting. *Microbial ecology*. Vol. 40 : 177-188.
33. Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W.-T., and Forney, L. 1998. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 64, No. 4 : 1220-1225.
34. Strom, P. F. 1985. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 50, No. 4 : 899-905.
35. Suihko, M.-L., Sinkko, H., Partanen, L., Mattila-Sandholm, T., Salkinoja-Salonen, M., and Raaska, L. 2004. Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. *Journal of applied microbiology*. Vol. 97 : 1228-1235.
36. Thom, S. M., Horobin, R. W., Seidler, E., and Barer, M. R. 1993. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *Journal of applied bacteriology*. Vol. 74 : 433-443.
37. Ullrich, S., Karrasch, B., Hoppe, H.-G., Jeskulke, K., and Mehrens, M. 1996. Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-Cyano-2,3-Ditolyl tetrazolium chloride. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 62, No. 12 : 4587-4593.
38. Verschuere, L., Fievez, V., Van Vooren, L., and Verstraete, W. 1997. The contribution of individual populations to the Biolog pattern of model microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 24 : 353-362.
39. Victorio, L., Gilbride, K. A., Allen, D. G., and Liss, S. N. 1996. Phenotypic fingerprinting of microbial communities in wastewater treatment systems. *Water research*. Vol. 30, No. 5 : 1077-1086.
40. Zimmermann, R., Iturriaga, R., and Becker-Birck, J. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 36, No. 6 : 926-935.

## CONCLUSION

L'étude présentée dans ce mémoire de maîtrise fait suite à un projet de recherche alliant l'Université de Sherbrooke et une papetière canadienne. Le projet de recherche a débuté en 2001 par l'identification des contaminants bactériens dans une papetière de la région grâce à une approche biomoléculaire avec Desjardins et Beaulieu (2003). Ensuite, Kashama *et al.* (2009) ont poursuivi l'identification de souches bactériennes isolées de la caisse d'arrivée de deux machines à papier en plus de déterminer le profil métabolique de ces souches en utilisant les microplaques Biolog ECO. Le profil métabolique des communautés microbiennes colonisant les caisses d'arrivées des deux machines a également été déterminé de façon hebdomadaire sur une période d'un an afin de vérifier les variations spatio-temporelles.

Kashama *et al.* (2009) ont démontré avec l'analyse Biolog que les communautés microbiennes de la caisse d'arrivée de deux machines à papier provenant d'une même usine étaient très similaires d'une machine à l'autre, mais pouvaient varier dans le temps. Les résultats d'une analyse Biolog sont basés sur le développement d'une coloration dans les microplaques et celle-ci dépend grandement de la densité et de la composition de l'inoculum (Garland et Mills, 1991 ; Haack *et al.*, 1995 ; Verschuere *et al.*, 1997). Une utilisation optimale du test Biolog pour déterminer des changements spatio-temporels entre diverses communautés microbiennes nécessite donc des échantillons ayant une densité cellulaire équivalente afin d'établir que ces changements sont liés à la composition de l'inoculum et non à sa densité. Cependant, il est resté tout de même impossible d'obtenir avec l'analyse Biolog des spécifications sur la composition des communautés microbiennes lors de changement spatio-temporel. C'est pour cette raison que nous avons

combiné l'analyse Biolog à une méthode moléculaire au cours de ce projet de maîtrise. L'analyse Biolog effectuée au mois de février et juillet 2006 sur la caisse d'arrivée d'une machine à papier a démontré que les communautés microbiennes de ces deux échantillons étaient différentes par leur profil métabolique. Certaines sources de carbone comme le méthylester de l'acide pyruvique, le tween 40, le lactone d'acide D-galactonique, l'acide D-malique, le L-arginine et la putrecine sont facilement métabolisées par la communauté microbienne de la caisse d'arrivée en février 2006 comparativement à celle de juillet 2006 qui utilise très faiblement ces nutriments.

La méthode « Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis » effectuée sur ces mêmes échantillons a permis de préciser cette différence. En effet, les genres bactériens *Rhizobium* et *Hydrogenophilus* ont été uniquement identifiés au mois de juillet 2006 et la proportion d'individus appartenant au genre *Tepidimonas* était plus importante en juillet 2006 comparativement à février 2006. Les variations métaboliques observées avec l'analyse Biolog entre les communautés microbiennes de la caisse d'arrivée des mois de février et juillet 2006 pourraient être en lien avec les variations notées dans les populations de *Tepidimonas*. Cependant, la seule souche de *Tepidimonas* isolée de cette papetière canadienne n'utilisait aucune source de carbone contenue dans les microplaques Biolog ECO. Des observations rejoignant celles d'Albuquerque *et al.* (2006) qui avaient noté que le *Tepidimonas thermarum* assimilait difficilement les hydrates de carbone.

L'utilisation de la méthode ARDRA pour caractériser la communauté bactérienne de la caisse d'arrivée d'une machine à papier canadienne a également permis d'identifier de nouveaux genres bactériens provenant de la caisse d'arrivée comme *Hydrogenophilus*, *Meiothermus*, *Tepidimonas*, *Geobacillus* et *Rhizobium*. Des genres qui n'avaient pas été

identifiés avec une méthode d'isolement employée dans cette papetière canadienne par Desjardins et Beaulieu (2003). De plus, nous avons constaté que le genre *Meiothermus* était le groupe phylogénétique le plus abondant dans la librairie de clones ADNr 16S avec une proportion d'environ 40% dans la communauté microbienne de la caisse d'arrivée en février et juillet 2006. L'importance de la participation du genre *Meiothermus* dans la communauté microbienne contaminant les machines à papier a également été notée par Ekman *et al.* (2007) dans une papetière de la Finlande. Lors d'une étude effectuée sur des échantillons de dépôts, des eaux de procédé et des matériaux primaires de 24 machines à papier, ils ont pu détecter et quantifier à l'aide d'une PCR en temps réel des membres appartenant au genre *Meiothermus*. Avec cette analyse, ils ont pu déterminer que le *Meiothermus silvanus* et le *Meiothermus ruber* étaient les espèces les plus fréquentes dans plusieurs de ces échantillons. L'utilisation de techniques modernes en biologie moléculaire pour caractériser la diversité des communautés bactériennes des machines à papier a pris de l'importance depuis peu (Lahtinen *et al.* 2006). L'emploi de la technique LH-PCR a révélé une plus grande diversité microbienne dans les biofilms comparativement aux eaux de procédé d'une papetière (Lahtinen *et al.* 2006). De plus, tout comme notre étude, l'équipe de Lahtinen (2006) a identifié grâce au séquençage de l'ADNr 16S un grand nombre d'espèces ou de genres qui n'étaient pas cultivables, ainsi que des organismes non-séquencés jusqu'à maintenant.

Les précédents résultats obtenus avec l'analyse Biolog ont su démontrer l'efficacité de ce test dans le suivi des changements spatio-temporels des communautés microbiennes contaminant la caisse d'arrivée de deux machines à papier canadienne sur une longue période de temps (Kashama *et al.*, 2009). En considérant que l'eau est un élément essentiel dans le processus de fabrication du papier et que de ce fait, les papetières cherchent à

optimiser l'utilisation de leurs eaux en recyclant au maximum de celles-ci, nous avons décidé d'utiliser le test Biolog pour évaluer la présence de changements entre les communautés microbiennes à différents points d'échantillonnages dans le circuit d'eau blanche des deux machines à papier canadienne.

L'étude du circuit d'eau blanche a permis d'identifier des variations spatio-temporelles entre les communautés microbiennes de la caisse d'arrivée, de l'eau clarifiée, de l'eau des presses et de l'eau blanche recyclée des deux machines. Les variations spatiales observées au cours de cette étude étaient plus marquantes entre les différents sites d'échantillonnage sur une même machine à papier qu'entre des sites homologues situés sur différentes machines. En effet, nous avons noté une différence entre la fréquence d'utilisation de certaines sources de carbone selon les sites d'échantillonnage. Lorsque les microplaques Biolog Eco étaient incubées à 50°C, nous avons observé que la fréquence d'utilisation du D-xylose était de 40 à 50% pour les communautés microbiennes de la caisse d'arrivée et de l'eau blanche recyclée et seulement de 10% pour celles de l'eau clarifiée et l'eau des presses. Des observations similaires ont également été notées lorsque la température d'incubation des microplaques était de 37°C. Le D-cellobiose, le D-mannitol, le N-acetyl-D-glucosamine et l'acide hydroxybutyrique étaient fréquemment utilisés par les communautés bactériennes de l'eau des presses et de l'eau blanche recyclée et que très rarement oxydés par les communautés de la caisse d'arrivée et de l'eau clarifiée. Aucune variation temporelle n'a été observée pour l'ensemble des sites d'échantillonnage à l'exception de la caisse d'arrivée. Tout comme Kashama et al. (2009), nous avons observé des variations temporelles entre les communautés microbiennes de la caisse d'arrivée au mois de juillet particulièrement.



Notre étude a su démontrer l'importance de la température d'incubation des microplaques Biolog dans l'identification de variations spatio-temporelles chez les diverses communautés microbiennes. En effet, certaines températures d'incubation privilégiaient davantage des changements au niveau des profils physiologiques des communautés bactériennes. Les communautés microbiennes de l'eau des presses et l'eau blanche recyclée démontraient plus de variation lorsque les microplaques Biolog étaient incubées à 37°C plutôt qu'à 50°C. Des observations contraires ont été notées pour les échantillons de la caisse d'arrivée et de l'eau clarifiée. Les résultats démontraient des changements au niveau de la communauté beaucoup plus importants lorsque la température d'incubation des microplaques était de 50°C comparativement à 37°C. Ces résultats indiquent l'importance d'un maintien constant de la température du procédé des machines à papier pour assurer une efficacité continue du traitement microbiologique instauré dans l'eau de procédé de l'usine. Une recherche effectuée en Finlande par Kolari et son équipe (2003) a démontré que diverses souches bactériennes isolées de papetières pouvaient réagir différemment aux biocides. En effet, certains biocides ont tendance à augmenter la production de biofilm chez certaines espèces de bactéries selon cette étude. En tenant compte de ces résultats et sachant que chaque biocide a un mode d'action spécifique nous ne pouvons ignorer l'importance qu'un changement de la communauté microbienne dans une usine de pâte et papier pourrait avoir sur l'efficacité de son traitement microbiologique. De plus, des études plus spécifiques sur les différentes espèces bactériennes composant ces communautés pourraient nous renseigner sur la température idéale que le procédé devrait avoir, afin de ne pas favoriser la prolifération de bactéries problématiques, tel que les formatrices de biofilm dans la papetière. Une étude menée par Chaudhary *et al.* (1997) a démontré tout particulièrement que certains microorganismes

isolés de papetière avaient une production maximale d'exopolysaccharides à des températures et valeurs de pH précises.

Bien que l'analyse Biolog reflète les changements structuraux dans les communautés microbiennes, cette méthode ne permet pas de connaître le métabolisme bactérien dans l'environnement des pâtes et papier puisque la plupart des sources de carbone contenues dans les microplaques Biolog Eco ne sont probablement pas présentes dans l'eau de procédé des papetières. Il est fort probable que plusieurs espèces de bactérie ne réagissent pas sur les microplaques Biolog. En effet, nous avons remarqué qu'une espèce récemment isolée de la papetière appartenant au genre *Tepidimonas* n'utilisait aucune source de carbones contenus dans les microplaques Biolog Eco. Une meilleure connaissance des propriétés physiologiques des microorganismes colonisant l'eau de procédé ainsi que des sources de carbones utilisables par ces derniers pourrait nous permettre d'élaborer un test physiologique spécifique pour cet environnement. Par exemple, l'emploi de nutriments fortement retrouvés dans l'eau de procédé comme l'amidon, la cellulose et l'hémicellulose (Verhoef *et al.*, 2002) pourrait donner davantage d'informations sur le métabolisme des bactéries colonisant ces environnements.

L'utilisation combinée des méthodes ARDRA et Biolog pour la détermination des variations spatio-temporelles des communautés bactériennes contaminant une papetière a été une première dans cette industrie. Les résultats obtenus au cours de ce mémoire ont démontré que ces techniques pourraient éventuellement être utilisées à grande échelle pour caractériser les communautés microbiennes contaminant l'ensemble du circuit d'eau blanche ainsi que toutes les composantes introduites dans le circuit des machines à papier comme par exemple l'eau fraîche. Il est très importante pour l'industrie des pâtes et papier

de déterminer leur principales sources de contamination microbiologique, afin de bien cibler le traitement microbiologique et les stratégies d'addition pour minimiser l'impact de ces organismes sur la production de papier. Nous avons observé que les communautés pouvaient différer d'un site d'échantillonnage à l'autre dans le circuit d'eau blanche de la papetière et que certains changements avaient lieu au cours des saisons. Or, nous savons que bien que l'industrie des pâtes et papier réutilise le plus possible ses eaux, il y a tout de même un apport important d'eau fraîche provenant majoritairement d'une rivière qui est introduite à divers points dans le système pour compenser les pertes d'eau. Une étude menée par Jung et Kutzner (1978) avait révélé une augmentation de microorganismes anaérobies dans un système d'eau fermé d'un environnement papetier comparativement à un système ouvert comportant un apport d'eau fraîche. Donc, une étude combinant l'analyse ARDRA à Biolog pourrait permettre d'éclaircir l'importance que l'apport d'eau fraîche dans le circuit d'eau blanche a sur les changements spatio-temporels des communautés microbiennes contaminant l'eau de procédé des papetières. De plus, il serait possible avec ces résultats et des travaux supplémentaires concernant l'identification de bactéries formatrices de biofilms de déterminer si les microorganismes impliqués dans les changements spatio-temporels sont des bactéries problématiques pour l'industrie des pâtes et papier.

## BIBLIOGRAPHIE

Albuquerque, L., Tiago, I., Veríssimo, A., and 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*. Systematic and applied microbiology. **29**: 450-456.

Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological reviews. Vol. 59, No. 1 : 143-169.

Amann, R., Snaird, J., Wagner, M., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. Journal of bacteriology. Vol. 178, No. 12 : 3496-3500.

Beaudry, J.-P., 1984. Traitement des eaux. Les éditions Le Griffon d'argile.

Bennett, C. 1985. Control of microbial problems and corrosion in closed systems. Paper technology and industry. Vol. 26. No. 7 : 331-335.

Bernhard, A. E., Colbert, D., McManus, J., and Field, K. G. 2005. Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries. FEMS microbiology ecology. Vol. 52 : 115-128.

Bunnage, W. J., Singleton, F. L. Cros, K., 2000. Non-biocidal treatment alternative in the paper machine short loop white water circuit works to prevent buildup and the resulting wet end deposits. Inhibitor Treatment Program Offers Option for Clearing Biofilm Buildup. Pulp & Paper Magazine.

Chaudhary, A., Gupta, L. K., Gupta, J. K., and Banerjee, U. C. 1997. Studies on slime-forming organisms of a paper mill – slime production and its control. Journal of industrial microbiology and biotechnology. Vol. 18 : 348-352.

Choi, K.-H., and Dobbs, F. C. 1999. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. Journal of microbiological methods. Vol. 36 : 203-213.

Costerton, J. W., 1999. Introduction to biofilm. International journal of antimicrobial agents. Vol. 11 : 217-221.

Dang, H. and Lovell, C. R. 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified r RNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 66, No. 2 : 467-475.

Desjardins, E., and Beaulieu, C. 2003. Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 30, No. 3 : 141-145.

Donlan, R. M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*. Vol. 8, No. 9 : 881-890.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A., and Kuske, C. R. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 65, No. 4 : 1662-1669.

Ekman, J., Kosonen, M., Jokela, S., Kolari, M., Korhonen, P., and Salkinoja-Salonen, M. 2007. Detection and quantification of colored deposit-forming *Meiothermus* spp. in paper industry processes and end products. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 34 : 203-211.

Farrelly, V., Rainey, F. A., and Stackebrandt, E. 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 61, No. 7 : 2798-2801.

Fredrickson, J. M., Balkwill, D. L., Zachara, J. M., Li, S.-M. W., Brockman, F. J., and Simmons, M. A. 1991. Physiological diversity and distributions of heterotrophic bacteria in deep cretaceous sediments of the Atlantic coastal plain. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 57, No. 2 : 402-411.

Garland, J. L., and Mills, A. L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 57, No. 8 : 2351-2359.

Garland, J. L. 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil biology & biochemistry*. Vol. 28, No. 2 : 213-221.

- Garland, J. L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*. Vol. 24 : 289-300.
- Gordon, D. A., and Giovannoni, S. J. 1996. Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific oceans. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 62, No. 4 : 1171-1177.
- Guckert, J. B., Carr, G. J., Johnson, T. D., Hamm, B. G., Davidson, D. H., Kumagai, Y. 1996. Community analysis by Biolog : curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *Journal of microbiological methods*. Vol. 27 : 183-197.
- Haack, S. K., Garchow, H., Klug, M. J., and Forney, L. J. 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproductibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 61, No. 4 :1458-1468.
- Ingrassia, I., Roques, C., and Prévost, F. 2001. Preliminary experiments for ARDRA validation on flora associated with intestinal mucosa. *Lait*. Vol. 81 : 263-280.
- Jung, W. K., and Kutzner, H. J. 1978. Microbiologic problems associated with closed process water systems in the paper industry. *European journal of applied microbiology and biotechnology*. Vol. 5 : 215-224.
- Kashama, J., Prince, V., Simao-Beauvoir, A.-M., and Beaulieu, C. 2009. Carbon utilization profiles of bacteria colonizing the headbox water of two paper machines in a Canadian mill. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 36 : 391-399.
- King, V. M., Dykstra, G. M., Glover, D. 1998. Chemistry holds key to maintaining speed in today's paper machines. *TAPPI journal*. vol. 81, No. 7 : 58-61.
- Klamer, M., and Baath, E. 1998. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. *FEMS microbiology ecology*. Vol. 27 : 9-20.
- Kolari, M., Nuutinen, J., Salkinoja-Salonen, M. S., 2001. Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species : the role of *Deinococcus geothermalis*. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 27 : 343-351.
- Kolari, M., Schmidt, U., Kuismanen, E., Salkinoja-Salonen, M. S., 2002. Firm but slippery attachment of *Deinococcus geothermalis*. *Journal of bacteriology*. Vol. 184, No. 9 : 2473-2780.

Kolari, M., Nuutinen, J., Rainey, F. A., and Salkinoja-Salonen, M. S. 2003. Colored moderately thermophilic bacteria in paper-machine biofilms. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 30 : 225-238.

Kozdrój, J., and Dirk van Elsas, J. 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of microbiological methods*. Vol. 43 : 197-212.

Lagacé, L., Pitre, M., Jacques, M., and Roy, D. 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rRNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 70, No. 4 : 2052-2060.

Lahtinen, T., Kosonen, M., Tirola, M., Vuento, M., and Oker-Blom, C. 2006. Diversity of bacteria contaminating paper machines. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 33 : 734-740.

LeChevallier, M. W., Evans, T. M., and Seidler, R. J. 1981. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 42, No. 1 : 159-167.

Liesack, W., Weyland, H., and Stackebrandt, E. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial ecology*. Vol. 21, No. 3 : 191-198.

Lindberg, L. E., Holmbom, B. R., Väisänen, O. M., Weber, A. M.-L., Salkinoja-Salonen, M. S., 2001. Sugar composition of biofilms produced by paper mill bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*. Vol. 55 : 638-643.

Liu, W.-T., Marsh, T. L., Cheng, H., and Forney, L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 63, No. 11 : 4516-4522.

Mah, T.-F., O'Toole, G. A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*. Vol.9 : 34-39.

Moré, M. I., Herrick, J. B., Silva, M. C., Ghiorse, W. C., and Madsen, E. L. 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial

DNA from sediment. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 60, No. 5 :1572-1580.

Moyer, C. L., Dobbs, F. C., and Karl, D. M. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 60, No. 3 : 871-879.

Oppong, D., King, V. M., Zhou, X., and Bowen, J. A. 2000. Cultural and biochemical diversity of pink-pigmented bacteria isolated from paper mill slimes. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 25 : 74-80.

Oppong, D., King, V. M., and Bowen, J. A. 2003. Isolation and characterization of filamentous bacteria from paper mill slimes. *International biodeterioration and biodegradation*. Vol. 52 : 53-62.

Pellegrin, V., Juretschko, S., Wagner, M., and Cottenceau, G. 1999. Morphological and biochemical properties of a *Sphaerotilus* sp. isolated from paper mill slimes. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 65, No. 1 : 156-162.

Reysenbach, A.-L., Giver, L. J., Wickham, G. S., and Pace, N. R. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 58, No. 10 : 3417-3418.

Robertson, L. 1994. Microbial growth in starch. *PIMA magazine*. Vol.76 : 74-76.

Roling, W. F. M., Van Breukelen, B. M., Braster, M., Lin, B., and Van Verseveld, H. W. 2001. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a Landfill leachate-polluted aquifer. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 67, No. 10 : 4619-4629.

Rosenberg, M., Bayer, E. A., Delarea, J., Rosenberg, E. 1982. Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Applied and environmental microbiology* Vol. 44 : 929-937.

Rosenberg, M., Kjelleberg, S. 1986. Hydrophobic interactions : Role in bacterial adhesion. *Advances in microbial ecology*. Vol. 9 : 353-393.



Safade, T. L. 1988. Tackling the slime problem in a paper-mill. Paper technology and industry. Vol. 29, No. 6 : 280-285.

Smit, E., Leeftang, P., and Wernars, K. 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. FEMS microbiology ecology. Vol. 23, No. 3 : 249-261.

Smook, G. A. 1992. Manuel du technicien et de la technicienne en pâtes et papiers. Centre collégial de développement de matériel didactique.

Suihko, M.-L., Sinkko, H., Partanen, L., Mattila-Sandholm, T., Salkinoja-Salonen, M, and Raaska, L. 2004. Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. Journal of applied microbiology. Vol. 97 : 1228-1235.

Suzuki, M. T., and Giovannoni, S. J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Applied and environmental microbiology. Vol. 62, No. 2 : 625-630.

Swistra, G., Royce, R. D., Carney, J. E., Mangat, M. N., and Monagle, D. J. 1998. The role of paper chemicals in increasing machine speeds. TAPPI journal. Vol. 81, No. 7 : 55-57.

Ullrich, S., Karrasch, B., Hoppe, H.-G., Jeskulke, K., and Mehrens, M. 1996. Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-Cyano-2,3-Ditolyl tetrazolium chloride. Applied and environmental microbiology. Vol. 62, No. 12 : 4587-4593.

Väisänen, O. M., Mentu, J., Salkinoja-Salonen, M. S., 1991. Bacteria in food packaging paper and board. Journal of applied bacteriology. Vol. 71 : 130-133.

Väisänen, O.M., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Marmo, S. A., and Salikinoja-Salonen, M. S. 1994. Structure and composition of biological slimes on paper and board machines. Applied and environmental microbiology. Vol. 60, No. 2 : 641-653.

Väisänen, O. M., Weber, A., Bennasar, A., Rainey, F. A., Busse, H.-J., Salkinoja-Salonen, M. S., 1998. Microbial communities of printing paper machines. Journal of applied microbiology. Vol. 84 : 1069-1084.

Verhoef, R., De Waard, P., Schols, H. A., Rättö, M., Siika-aho, M., Voragen, A. G. J., 2002. Structural elucidation of the EPS of slime producing *Brevundimonas vesicularis* sp. isolated from a paper machine. Carbohydrate Research. Vol. 337 : 1821-1831.

Verschuere, L., Fievez, V., Van Vooren, L., and Verstraete, W. 1997. The contribution of individual populations to the Biolog pattern of model microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 24 : 353-362.

Victorio, L., Gilbride, K. A., Allen, D. G., and Liss, S. N. 1996. Phenotypic fingerprinting of microbial communities in wastewater treatment systems. *Water research*. Vol. 30, No. 5 : 1077-1086.

Ward, D. M., Weller, R., and Bateson, M. M. 1990. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well-studied thermal community. *FEMS microbiology reviews*. Vol. 75 : 105-116.

Ward, D. M., Bateston, M. M., Weller, R., and Ruff-Roberts, A. L. 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Advances in microbial ecology*. Vol. 12 : 219-286.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*. Vol. 51, No. 2 : 221-271.