

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES	vii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 La récupération	1
1.1.1 Historique.....	1
1.1.2 La récupération des papiers et cartons.....	2
1.2 Les papetières	3
1.3 Les problèmes d'origine microbiologique dans les papetières.....	6
1.3.1 Les biofilms	6
1.3.2 Les odeurs	8
1.4 Facteurs favorisant la croissance microbienne	8
1.4.1 Utilisation de matières récupérées	8
1.4.2 Recirculation de l'eau blanche.....	9
1.4.3 Conditions de température et de pH	10
1.5 La flore bactérienne	10
1.5.1 Pâte.....	10
1.5.2 Additifs	11
1.5.3 Eau blanche.....	11
1.5.4 Biofilms	11
1.5.5 Produits finis	12
1.6 Les techniques d'identification bactérienne	12
1.6.1 Méthodes classiques	13
1.6.1.1 Culture bactérienne.....	13
1.6.1.2 Caractérisation morphologique.....	13
1.6.1.3 Tests biochimiques	13
1.6.1.4 Caractérisation des acides gras	14

1.6.2	Méthodes moléculaires	14
1.6.2.1	Le gène de l'ARN ribosomique 16S.....	14
1.6.2.2	L'analyse de banques de clones.....	15
1.6.2.3	Le pyroséquençage	15
1.6.2.4	La bio-informatique.....	17
1.7	Problématique.....	19

CHAPITRE II

COMPARAISON DE LA FLORE BACTÉRIENNE D'UN BALLOT DE CARTON RÉCUPÉRÉ ANALYSÉE PAR PYROSÉQUENÇAGE ET PAR BANQUE DE CLONES.....		21
2.1	Contribution des auteurs.....	21
2.2	Résumé de l'article	21
2.3	Article scientifique.....	23
	Abstract	24
	Introduction.....	25
	Materials and methods	26
	Sampling.....	26
	Total genomic DNA extraction	26
	PCR amplification of the 16S rRNA gene V6-V8 region and 454 pyrosequencing.....	27
	PCR amplification of the 16S rRNA gene V6-V8 region, cloning and sequencing	28
	Sequence analysis, taxonomic identification and statistics	28
	Results and discussion	29
	PCR amplification of the 16S rRNA gene V6-V8 region and 454 pyrosequencing.....	29
	PCR amplification of the 16S rRNA gene V6-V8 region, cloning and sequencing	30
	Comparison of the bacterial communities obtained using 454 pyrosequencing and clone library.....	30
	Conclusion	34
	Acknowledgments.....	35
	References.....	36

CHAPITRE III**CONCLUSION.....40****RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....42****ANNEXE A****ÉTAPES D'OPTIMISATION DES SÉQUENCES, DE GÉNÉRATION DE
STATISTIQUES ET DE CLASSIFICATION EN UNITÉS
TAXONOMIQUES OPÉRATIONNELLES AVEC LE LOGICIEL
MOTHUR.....46****ANNEXE B****RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES D'IDENTIFICATION DE FLORES
BACTÉRIENNES DE BALLOTS DE PAPIER ET DE CARTON
ANALYSÉES PAR PYROSÉQUENÇAGE55**

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Cycle de la récupération des papiers et cartons au Québec.3
1.2	Grandes étapes de la fabrication du papier à partir de matières récupérées.4
1.3	Stalactites de biofilms sur la surface d'un tamis séparant l'eau de la pâte dans une papetière. Source : Flemming <i>et al.</i> , 2013.....7
1.4	Ballots de carton entreposés à l'extérieur.9
1.5	Organisation de l'opéron ribosomique et régions hypervariables du gène de l'ARNr 16S.....15
1.6	Principe du pyroséquençage. Source : Siqueira <i>et al.</i> , 2012.....16
1.7	Grandes étapes d'optimisation des séquences avec le logiciel Mothur.....18
A.1	Fichier-lot contenant le script pour la filtration des séquences brutes.....46
A.2	Fichier-lot contenant le script pour l'élimination des séquences contaminantes.47
A.3	Fichier-lot contenant le script pour l'élimination des chimères.....48
A.4	Fichier de soumission pour le lancement d'une commande dans le super-ordinateur Colosse.....48
A.5	Fichier-lot contenant le script pour l'alignement des séquences.49
A.6	Visualisation des séquences avec le logiciel BioEdit.49
A.7	Ligne de commande utilisée dans le logiciel Mothur pour éliminer les fragments de séquences se retrouvant après la dernière base de l'amorce R.50
A.8	Fichier-lot comportant le script pour l'élimination des singletons.50
A.9	Fichier-lot contenant le script pour l'égalisation finale des séquences.....51
A.10	Fichier-lot contenant le script pour la classification des séquences en OTUs.51

A.11	Fichier-lot contenant le script pour générer les statistiques, dont les indices de diversité et de richesse.....	52
A.12	Fichiers Excel contenant les statistiques du lot de séquences générées par pyroséquençage. A) Statistiques pour les indices de diversité et de richesse. B) Statistiques pour la raréfaction.	53
A.13	Ligne de commande utilisée dans le logiciel Mothur pour identifier taxonomiquement les OTUs.....	53
A.14	Résultat de l'identification taxonomique des OTUs.....	54
B.1	Distribution des embranchements, à un niveau de similarité de 97%, des OTUs bactériens, obtenus par pyroséquençage, dans les ballots de carton, de papiers mélangés et de papier journal, aux temps 0 (t=0) et un an (t=1) d'entreposage extérieur.....	55
B.2	Courbes de raréfaction des séquences bactériennes obtenues par pyroséquençage, à un niveau de similarité de 97%, pour les ballots de carton, de papiers mélangés et de papier journal, aux temps 0 (t=0) et un an (t=1) d'entreposage extérieur.....	56

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La récupération

1.1.1 Historique

La conscientisation collective face aux enjeux environnementaux s'est grandement améliorée depuis la publication en 1987 du rapport intitulé « Notre avenir à tous », aussi connu sous le nom de rapport Brundtland (Commission mondiale sur l'environnement et le développement, 1988). C'est grâce à ce document que l'expression « développement durable » s'est répandue. C'est dans cette optique que le Québec met de l'avant divers projets et lois, notamment dans le domaine des collectes sélectives de matières résiduelles, telles les papiers et cartons, le verre, le métal et le plastique. C'est en 1989 que sont apparues les premières collectes à Montréal. Peu après, en 1990, le gouvernement québécois a instauré la « Loi sur la société québécoise de récupération et de recyclage », maintenant désignée Recyc-Québec. Cette société a pour objet de favoriser la récupération et le recyclage des matières résiduelles ainsi que leur valorisation dans une perspective de conservation des ressources (Gouvernement du Québec, 1990).

En 2010, le Québec a récupéré plus d'un million de tonnes de matières résiduelles, à l'aide des 38 centres de tri actifs dont il disposait. Ces matières récupérées provenaient de trois grands secteurs : les municipalités, les industries, commerces et institutions ainsi que l'industrie de la construction, rénovation et démolition (Gouvernement du Québec, 2013). La sensibilisation au développement durable et à la protection de l'environnement est à l'origine de la valorisation des matières résiduelles. Cela a un effet positif sur la préservation de nos ressources naturelles ainsi que sur la diminution des gaz à effet de serre. Ces derniers sont principalement issus de l'élimination des matières

résiduelles, qui se fait par enfouissement ou par incinération. Ainsi, un des objectifs de la province de Québec est de recycler plus de 70% de toutes les matières résiduelles et ce, d'ici 2015.

1.1.2 La récupération des papiers et cartons

Les papiers et cartons font partie des matériaux les plus récupérés par les collectes sélectives municipales, avec 71% des parts en 2010. Entre les années 2000 et 2010, les quantités de ces matières récupérées du secteur municipal ont plus que doublé, passant de 258 000 tonnes à 525 000 tonnes (Vermette, 2010). La Figure 1.1 représente le cycle de recyclage que les produits papetiers effectuent au niveau résidentiel. Dans le secteur résidentiel, les papiers et cartons sont mis à la récupération une fois leur utilisation terminée. Via les collectes sélectives municipales, ces produits papetiers sont acheminés aux centres de tri québécois, où ils sont séparés selon leur catégorie et assemblés en ballots. Ils sont ensuite éliminés, exportés ou vendus. Le rejet des papiers et cartons se situe autour de 10 à 20%, taux qui varie d'un centre de tri à l'autre. L'exportation de produits papetiers récupérés se fait majoritairement vers les marchés asiatiques. La vente de matières récupérées est dominée par celle des papiers et cartons, avec 778 000 tonnes en ventes, ce qui représentait 82% de toutes les ventes effectuées par les centres de tri québécois en 2010. La plupart des papiers et cartons sont vendus à des clients de la province de Québec, principalement des recycleurs, dont les papetières. Ces dernières transforment les papiers et cartons récupérés en produits papetiers recyclés. Ils sont ensuite envoyés à diverses entreprises de transformation ou directement aux commerces, où ils sont achetés par les clients. Les produits papetiers retournent dans le cycle du recyclage en étant à nouveau récupérés.

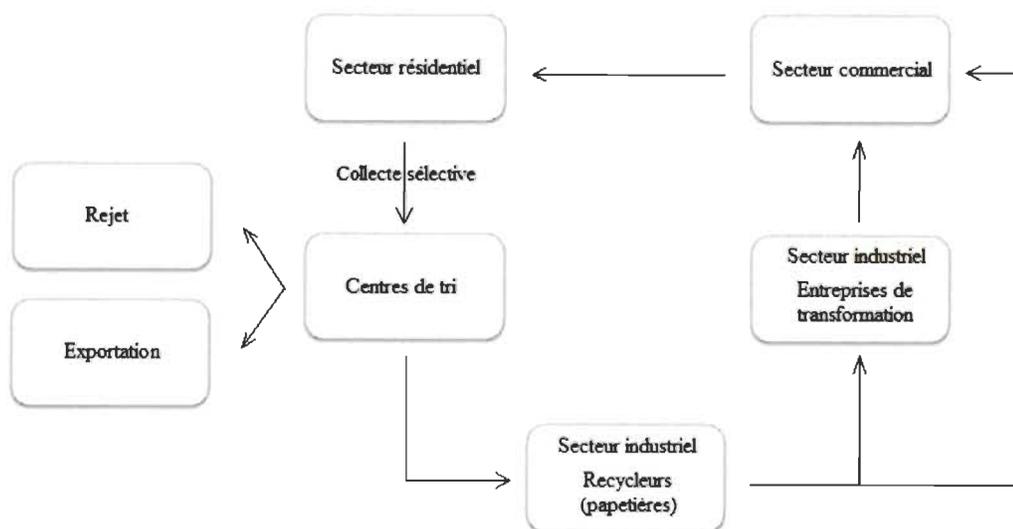


Figure 1.1 Cycle de la récupération des papiers et cartons au Québec.

1.2 Les papetières

Les produits papetiers sont fabriqués soit à partir de copeaux et de retailles de bois provenant d'usines de sciage, à partir de fibres récupérées ou en employant les deux dans le procédé. Sur le plan québécois, c'est plus de 65% des papetières qui utilisent les retailles de bois comme matière première (Vermette, 2010). Toutefois, cette tendance devrait changer d'ici les prochaines années, en raison de la forte demande pour l'utilisation de papiers et cartons fabriqués à partir de fibres récupérées.

Une papetière-type utilisant des fibres récupérées achète ses ballots de papiers et cartons auprès des centres de tri régionaux. Lors de leur arrivée à l'usine, les ballots sont entreposés à l'intérieur ou à l'extérieur pour une durée variant de 0 à 12 mois, selon les besoins. La fabrication des produits papetiers est séparée en deux grandes sections. La première est la transformation des papiers et cartons récupérés en pâte désencrée et la deuxième est la fabrication du papier (Figure 1.2).

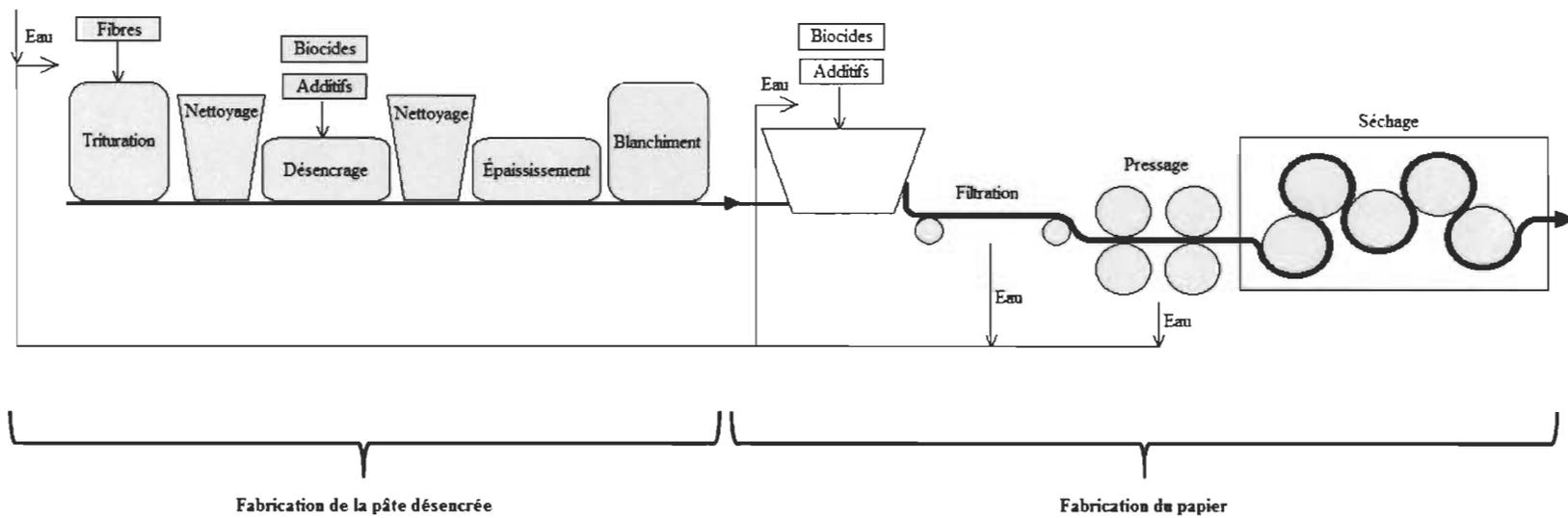


Figure 1.2 Grandes étapes de la fabrication du papier à partir de matières récupérées.

La première étape de la fabrication de la pâte désencrée est une trituration. Elle consiste en une désintégration mécanique des matériaux récupérés et de leur mise en pâte. Les fibres sont alors dispersées individuellement. Suite à la trituration, une étape de tamisage et de nettoyage est effectuée afin de retirer les divers contaminants présents, tels les plastiques, les métaux (agrafes, trombones, etc.) et les morceaux de colle. La pâte résultante est ensuite soumise à un désencrage. À cette étape sont ajoutés plusieurs additifs qui provoquent la floculation des particules d'encre. Ces additifs sont des produits chimiques pouvant être de la soude, des savons d'acides gras, du peroxyde d'hydrogène ou du silicate de sodium. L'encre adhère à des bulles d'air, qui remontent à la surface de la pâte, formant une couche d'écume qui est enlevée. Des biocides éliminant les microorganismes sont également ajoutés à cette étape. Un second nettoyage est ensuite effectué, par centrifugation. Les contaminants plus légers et plus lourds que la pâte sont éliminés. La pâte est ensuite passée sur des filtres à maille de 0,2 mm, puis elle est épaissie à un taux de solides de 10% à l'aide de deux épaisseurs à disques. Puis, la pâte est lavée à l'eau chaude, puis de nouveau épaissie, cette fois à une concentration de solides de 30%. L'étape suivante consiste en une réduction granulométrique, inférieure à 40 μm , des contaminants et de leur répartition homogène dans la pâte. Finalement, pour en arriver à la pâte désencrée, deux étapes de blanchiment au peroxyde d'hydrogène sont réalisées (Hutchinson, 2007; Cascades Groupe Papiers Fins, s.d.a).

La fabrication du papier comporte deux grandes étapes : la préparation de la pâte et son passage dans la machine à papier. La pâte désencrée issue de la transformation des papiers et cartons récupérés est diluée avec de l'eau, pour obtenir une concentration de fibres à environ 8%. C'est à cette étape que sont ajoutés divers additifs définissant les propriétés physiques du papier, comme l'opacité, la brillance et la couleur du papier. Ces additifs consistent en biocides et en produits chimiques, tels des solutions de collage, de l'amidon, de la bentonite, du talc, du carbonate de calcium et du kaolin (Suihko et Skyttä, 2009). La pâte est ensuite raffinée et tamisée afin d'éliminer d'éventuels débris et agglomérations. La pâte résultante est par la suite passée en mode continu dans un filtre constitué de fines mailles et, par gravité ou par vacuum, l'eau est drainée pour

former une bande de papier humide. À des fins économiques et environnementales, l'eau drainée, aussi appelée « eau blanche », est recirculée dans le procédé. Les bandes de papier humide sont ensuite insérées dans des presses et partiellement séchées, puis passées dans des rouleaux compresseurs pour extraire l'eau résiduelle et fournir une épaisseur uniforme aux bandes de papier. La dernière étape consiste à faire circuler les bandes dans des rouleaux chauffés pour les sécher complètement (Flemming *et al.*, 2013; Cascades Groupe Papiers Fins, s.d.b).

1.3 Les problèmes d'origine microbiologique dans les papetières

Les papetières font face à de nombreux enjeux de nature microbiologique. Bien que des agents antimicrobiens soient employés dans le processus de fabrication de la pâte et que l'équipement et la machinerie soient nettoyés, il reste que de nombreux problèmes d'origine microbiologique persistent, comme des biofilms et des odeurs indésirables.

1.3.1 Les biofilms

Une des problématiques les plus fréquemment rencontrées dans le processus de fabrication industrielle du papier est le développement de biofilms, qui sont des agrégats de microorganismes (Figure 1.3). Ces microorganismes sont regroupés dans une matrice d'origine microbienne qui consiste en substances polymériques extracellulaires, majoritairement des polysaccharides et des protéines. Cette matrice est constituée d'environ 95% d'eau (Flemming *et al.*, 2013).

Les biofilms sont très résistants aux divers biocides chimiques qui peuvent être appliqués dans le domaine des pâtes et papiers, tels le chlorométhylisothiazolinone, le bromonitropropanediol et le méthylisothiazolinone (Klahre et Flemming, 2000). Des traitements enzymatiques à la levanase peuvent également être employés pour contrer les biofilms (Chaudhary *et al.*, 1998). Malgré l'utilisation d'agents antimicrobiens, les biofilms résistent, en partie grâce à leur organisation structurale puisque les biocides

peuvent ne pas pénétrer la matrice extracellulaire uniformément. Une autre forme de tolérance bactérienne aux biocides est intrinsèque : les bactéries acquièrent des facteurs génétiques de résistance.



Figure 1.3 Stalactites de biofilms sur la surface d'un tamis séparant l'eau de la pâte dans une papetière. Source : Flemming *et al.*, 2013.

Les dommages causés par les biofilms sont nombreux. Une partie des biofilms peut se détacher et tomber dans la pâte (Blanco *et al.*, 1996). Lors du séchage des feuilles de papier, les biofilms, comme ils sont constitués majoritairement d'eau, sont également séchés, ce qui crée des trous dans les feuilles de papier en raison des taux de solides des biofilms qui sont trop faibles. Ces feuilles trouées peuvent alors bloquer la machinerie, ce qui nécessite des arrêts de production (Kurissery *et al.*, 2010). De plus, la présence de trous dans les feuilles de papier diminue leur force mécanique. Les biofilms sont aussi responsables du blocage de tuyaux et de la corrosion des équipements. Tous ces problèmes liés aux biofilms ont comme impact direct une perte financière non négligeable, en raison d'une diminution de la productivité, de la perte de produits finis et des dépenses supplémentaires pour les biocides et autres produits nettoyants.

1.3.2 Les odeurs

Une autre problématique rencontrée par les papetières est la présence d'odeurs indésirables, causées par des métabolites microbiens (Robertson, 2008). Ces derniers sont généralement des acides gras, des aldéhydes volatils et des composés soufrés, comme le sulfure d'hydrogène. Les acides gras volatils sont produits par des réactions de fermentation, qui peuvent avoir lieu dans l'eau du procédé. Les aldéhydes volatils sont quant à eux produits par auto-oxydation en présence d'ions métalliques, à partir par exemple d'acides gras résiduels. Cette réaction chimique peut se dérouler tout au long du procédé de fabrication et même dans les produits finis. Pour ce qui est du sulfure d'hydrogène, il est produit par les bactéries anaérobies sulfito-réductrices, dans les biofilms ou dans l'eau de procédé.

1.4 Facteurs favorisant la croissance microbienne

Plusieurs éléments entrent en jeu quant à la présence de microorganismes causant les nombreux dommages dans les papetières, énumérés précédemment. Les taux élevés de bactéries dans le procédé industriel sont notamment dus à l'utilisation de fibres récupérées, de la recirculation de l'eau blanche et des conditions idéales de température et de pH.

1.4.1 Utilisation de matières récupérées

Une source importante de microorganismes dans les papetières provient des papiers et cartons récupérés. Quelques études ont démontré qu'utiliser des fibres récupérées au lieu de fibres vierges augmente la concentration de microorganismes dans le processus de fabrication et dans les produits finis (Granhall *et al.*, 2010; McCusky Gendron *et al.*, 2012; Namjoshi *et al.*, 2010). Les matières premières, achetées par les papetières sous forme de ballots, sont contaminées par divers composés, particulièrement des résidus alimentaires, des adhésifs, des colles ainsi que d'autres matières organiques. La présence de ces composés, en plus des fibres lignocellulosiques,

est susceptible de favoriser le développement microbien dans les ballots. De plus, après l'arrivée des ballots de papiers et cartons à la papetière, ils sont entreposés avant leur utilisation. L'entreposage se fait généralement à l'extérieur (Figure 1.4), durant une période qui peut s'étendre jusqu'à un an. Les ballots sont donc dans un milieu propice à la prolifération et au développement de contaminants microbiens en raison des facteurs météorologiques, tels les vents, la pluie et la température, et des facteurs environnementaux comme la présence d'oiseaux et de rongeurs.



Figure 1.4 Ballots de carton entreposés à l'extérieur.

1.4.2 Recirculation de l'eau blanche

La demande en eau dans une papetière est très grande : on parle généralement d'environ 52,4 m³ d'eau par tonne métrique produite (Tremblay et Desjardins, 2009). Afin de diminuer le volume d'eau utilisé, certaines papeteries ferment en boucle les circuits d'eau. Les volumes utilisés passent alors à une moyenne de 10,5 m³ d'eau par tonne métrique. Cette pratique maintenant courante contribue à l'optimisation

environnementale des entreprises et, conséquemment, au développement durable. Cependant, cette réutilisation de l'eau blanche a ses désavantages. Elle mène à l'accumulation de nutriments et de microorganismes dans l'eau (Väisänen *et al.*, 1991). Également, la demande en oxygène augmente, favorisant des conditions anaérobiques.

1.4.3 Conditions de température et de pH

Les usines de pâtes et papiers offrent des conditions de culture idéales pour les microorganismes. Les machines à papier fonctionnent à des températures se situant entre 30°C et 60°C (Desjardins et Beaulieu, 2003; Disnard *et al.*, 2011). L'eau blanche devient donc un milieu très favorable pour la croissance et le développement microbien. De plus, le pH est neutre (5-8) dans plusieurs procédés de fabrication des produits papetiers (Desjardins et Beaulieu, 2003; Flemming *et al.*, 2013). Ces conditions favorisent l'apparition de problèmes de nature microbiologique mentionnés précédemment : des biofilms et des odeurs indésirables.

1.5 La flore bactérienne

De nombreuses études ont été effectuées afin de déterminer la flore bactérienne présente dans les papetières, puisque les bactéries sont les microorganismes majoritaires dans le procédé de fabrication des produits papetiers. Les composantes ciblées étaient la pâte, les additifs, l'eau blanche, les biofilms et les produits finis.

1.5.1 Pâte

Une étude effectuée par Desjardins et Beaulieu (2003) a démontré que la pâte d'une papetière canadienne comportait majoritairement des bactéries du genre *Pseudoxanthomonas*. Les autres genres bactériens identifiés étaient des *Pseudomonas*, des *Leptothrix* et des *Bacillus*. D'autres travaux ont ciblé les bactéries aérobies non-sporulantes dans la pâte fabriquée avec des matières récupérées (Suihko et Skyttä, 2009). Les bactéries majoritaires appartenaient au groupe des Gammaprotéobactéries,

avec comme principaux genres *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. Les Actinobactéries étaient aussi représentées avec le genre *Microbacterium*.

1.5.2 Additifs

Certains additifs, notamment le kaolin et la bentonite ont été étudiés afin de déterminer les bactéries qui y sont présentes (Väisänen *et al.*, 1998). Les genres *Aureobacterium*, *Bordetella*, *Methylobacterium*, *Microbulbifer* et *Pseudomonas* ont été caractérisés dans le kaolin et les genres *Bacillus*, *Hydrogenophaga*, *Paenibacillus* et *Staphylococcus* ont été identifiés dans la bentonite.

1.5.3 Eau blanche

Des bactéries ont été caractérisées dans l'eau blanche de deux papetières utilisant des papiers et cartons récupérés comme matière première (Öqvist *et al.*, 2008). L'une des papetières avait des circuits complètement fermés alors que l'autre avait des circuits semi-fermés. Dans les deux cas, des *Enterococcus* ont été identifiés. La papetière dont l'eau blanche était recirculée à 100% comportait également des *Clostridia*, alors que celle dont les circuits étaient semi-fermés était principalement composée de *Bacillus*.

1.5.4 Biofilms

Comme les biofilms sont le problème majeur des papetières, ils sont les composantes des usines les plus étudiées. Rättö *et al.* (2005) ont identifié plusieurs genres bactériens ayant la capacité de produire des polysaccharides dans des biofilms : *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Cytophaga*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* et *Starkeya*. D'autres études ont démontré des genres bactériens différents présents dans des biofilms provenant d'usines de pâtes et papiers : *Rhizobium*, *Sphingomonas* et *Pseudomonas* (Lahtinen *et al.*, 2006), *Rhodobacter*, *Tepidimonas* et *Cloacibacterium* (Tirola *et al.*, 2009) ainsi que *Chryseobacterium* et *Rhodococcus* (Granhall *et al.*, 2010).

Plus récemment, une étude a été effectuée afin d'identifier les populations bactériennes dans des biofilms récoltés dans deux papetières canadiennes (Disnard *et al.*, 2011). La flore bactérienne des biofilms était composée des genres *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Paenibacillus*, *Exiguobacterium*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* et *Pseudoxanthomonas*.

1.5.5 Produits finis

Les produits papetiers ont été soumis à des identifications microbiologiques, car ils peuvent poser problème au niveau de la santé et de l'hygiène. Certains cartons servent d'emballages alimentaires; il est donc nécessaire de s'assurer qu'aucune bactérie nuisible à la santé n'y est présente. Les genres bactériens identifiés sont des *Bacillus* et des *Paenibacillus* (Raaska *et al.*, 2002; Suihko et Stackebrandt, 2003; Namjoshi *et al.*, 2010). Raaska *et al.* (2002) ont identifié en plus les genres *Enterobacter* et *Citrobacter*. Les papiers essuie-mains sont eux aussi ciblés par des études de la flore bactérienne (McCusky Gendron *et al.*, 2012). Cette fois encore, des *Bacillus* et des *Paenibacillus* dominaient, en plus des genres *Exiguobacterium* et *Clostridium*.

1.6 Les techniques d'identification bactérienne

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour l'identification d'une population bactérienne dans un échantillon environnemental ou industriel et elles sont divisées principalement en deux grandes catégories : les méthodes classiques et les méthodes moléculaires. Les méthodes classiques incluent les cultures bactériennes, la caractérisation morphologique, les tests biochimiques et la caractérisation des acides gras. Les méthodes moléculaires incluent, via séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S, l'analyse de la banque de clones et le pyroséquençage. Pour analyser les séquences obtenues, il est nécessaire d'utiliser des outils de bio-informatique.

1.6.1 Méthodes classiques

1.6.1.1 Culture bactérienne

La culture des bactéries se fait à l'aide de milieux nutritifs, liquides ou solides. Divers paramètres de culture peuvent être appliqués : la température, le pH, le temps d'incubation et les composants du milieu nutritif. Il existe notamment sur le marché des milieux nutritifs sélectifs, c'est-à-dire qu'ils ciblent certaines bactéries ou en inhibent d'autres (Willey *et al.*, 2008). La croissance bactérienne est mesurée, en milieu liquide, via sa turbidité alors qu'en milieu solide, elle est représentée par la quantité de colonies.

1.6.1.2 Caractérisation morphologique

Une des techniques d'identification consiste à faire croître les bactéries sur un milieu de culture solide et d'étudier les caractéristiques morphologiques des colonies, telles la couleur, la grosseur et la texture. L'identification des bactéries peut également consister en une caractérisation au niveau microscopique. Ce sont alors principalement la forme, la mobilité et les structures cellulaires internes des bactéries qui sont étudiées (Willey *et al.*, 2008).

1.6.1.3 Tests biochimiques

L'identification des bactéries peut reposer sur certaines de leurs réactions métaboliques, dont la détection d'enzymes (catalase, uréase, etc.) et de gaz dégagés, les hydrolyses de polysaccharides et de protéines, la fermentation des glucides (glucose, lactose, etc.) ainsi qu'une modification de pH due à une accumulation de produits acides ou alcalins. Ces tests biochimiques peuvent s'effectuer avec des produits commerciaux, comme les galeries API (Humble *et al.*, 1977) ou les systèmes automatisés Biolog (Miller et Rhoden, 1991).

1.6.1.4 Caractérisation des acides gras

Une méthode d'identification bactérienne est basée sur leur composition en acides gras, principalement ceux de la double couche lipidique de la membrane cellulaire (Bobbie et White, 1980). Dans plusieurs cas, ce sont les esters méthyliques, obtenus par transestérification des acides gras, qui sont soumis à une analyse par chromatographie gazeuse. Les profils obtenus sont finalement comparés à des banques de données existantes.

1.6.2 Méthodes moléculaires

L'arrivée des méthodes moléculaires a révolutionné le monde de la microbiologie. Elles ont permis de découvrir de nouvelles bactéries qui ne pouvaient être cultivées. Elles ont par la suite révélé qu'environ 95% de toutes les bactéries ne peuvent pas être cultivées (Hugenholz *et al.*, 1998). Les méthodes moléculaires sont ainsi devenues un outil de choix dans l'étude de la flore bactérienne environnementale. Elles sont basées sur l'étude de la séquence nucléotidique d'un gène de référence présent chez toutes les bactéries, principalement celui de l'ARN ribosomique 16S. Plusieurs méthodes permettent de déterminer les séquences nucléotidiques de bactéries sans avoir besoin de les cultiver, dont la création de banques de clones et le pyroséquençage. Ce dernier nécessite l'utilisation d'outils de bio-informatique servant à analyser et à optimiser les séquences nucléotidiques brutes générées.

1.6.2.1 Le gène de l'ARN ribosomique 16S

Toutes les bactéries possèdent au moins une copie d'un opéron comportant les gènes reliés à la formation des ribosomes. Cet opéron ribosomique comprend les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), l'ARNr 23S et l'ARNr 5S, qui sont espacés de régions inter géniques (ITS1 et ITS2) (Figure 1.5).

Le gène codant pour l'ARNr 16S est utilisé comme marqueur phylogénétique : il se retrouve chez toutes les bactéries, il possède des régions hautement conservées qui facilitent son séquençage et il présente neuf régions hypervariables, différentes chez des espèces génétiquement éloignées (Woese, 1987).

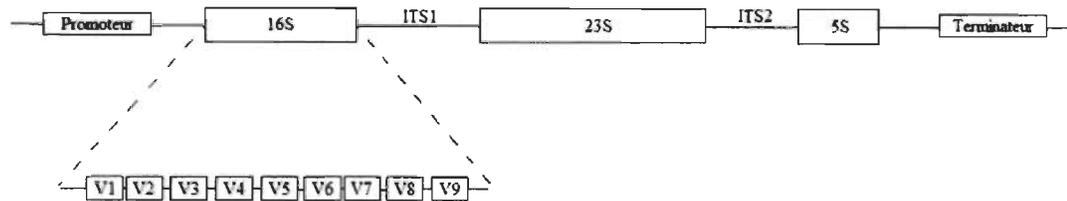


Figure 1.5 Organisation de l'opéron ribosomique et régions hypervariables du gène de l'ARNr 16S.

1.6.2.2 L'analyse de banques de clones

Un gène d'intérêt peut être amplifié par la réaction en chaîne de polymérase (Mullis *et al.*, 1986), puis inséré dans un vecteur plasmidique. Dans le cas où plusieurs microorganismes différents sont présents dans un échantillon, une copie de gène de chacun de ces microorganismes sera insérée par plasmide. Ce dernier est transfecté dans une cellule bactérienne hôte, généralement *E. coli*. Chaque copie du fragment amplifié se retrouve dans une bactérie hôte. L'ensemble de ces bactéries recombinantes représente ainsi la banque de clones. Les séquences des fragments insérés dans les plasmides peuvent être déterminées par la méthode Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Les banques de clones sont utiles en écologie microbienne car elles permettent de travailler directement avec l'ADN génomique total et ainsi éviter de faire des cultures bactériennes (Rondon *et al.*, 2000).

1.6.2.3 Le pyroséquençage

Le pyroséquençage est une technique moderne de séquençage à haut débit (Sogin *et al.*, 2006). Contrairement à la méthode Sanger qui est basée sur l'insertion de

didésoxynucléotides, le pyroséquençage repose sur la détection de pyrophosphate inorganique (Figure 1.6). Ce dernier est libéré lors de l'ajout de nucléotides pendant la synthèse d'un brin complémentaire d'ADN par l'ADN polymérase. Une cascade réactionnelle suit alors à l'aide de deux autres enzymes, l'ATP sulfurylase et la luciférase. Le résultat de cette cascade sera une émission de lumière visible, dont l'intensité sera proportionnelle à la quantité de nucléotides incorporés à l'ADN, puisque toute la cascade enzymatique se fait de façon équimolaire. Comme l'ajout des différents nucléotides se fait de façon séquentielle, la quantité de chacun des nucléotides incorporés à l'ADN peut être déterminée.

L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de déterminer les séquences nucléotidiques de milliers de fragments d'ADN simultanément, sans passer par les banques de clones. Les fragments d'ADN, ici des régions hypervariables du gène de l'ARNr 16S, sont couplés à des billes afin de permettre leur séquençage. Les billes, ne comportant qu'un fragment d'ADN chacune, représentent une bactérie présente dans l'échantillon à analyser. Les billes sont ensuite déposées sur une plaque comportant plus de deux millions de puits, chacun ne pouvant recueillir qu'une seule bille. Les séquences nucléotidiques de milliers de fragments d'ADN peuvent ainsi être déterminées à l'aide d'une seule réaction.

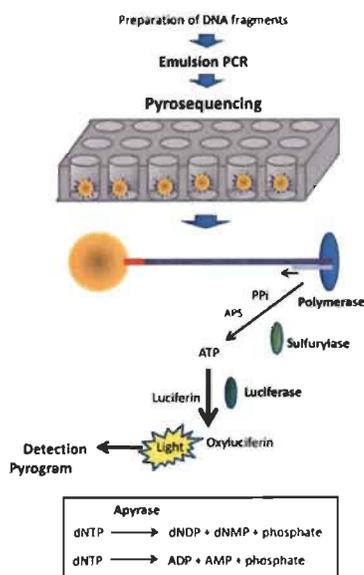


Figure 1.6 Principe du pyroséquençage. Source : Siqueira *et al.*, 2012.

1.6.2.4 La bio-informatique

Les séquences générées par pyroséquençage sont utilisées pour l'identification de bactéries au niveau du genre. Pour ce faire, certains outils en bio-informatique ont été développés, dont le logiciel Mothur (Schloss, 2009; Schloss *et al.*, 2009). Ce dernier est basé sur l'utilisation d'algorithmes de calcul permettant de trier les séquences brutes générées par pyroséquençage et de les optimiser, générant ainsi des séquences finales de haute qualité (Figure 1.7). L'optimisation des séquences débute sur un ordinateur personnel avec une étape d'élimination des mauvaises séquences, soient celles qui sont trop courtes ou trop longues, celles comportant des bases incertaines et celles qui possèdent des homopolymères. De plus, les séquences contaminantes, comme par exemple l'ADN chloroplastique, sont éliminées à cette étape. Subséquemment, les étapes d'optimisation doivent se faire sur un super-ordinateur en raison du nombre de processeurs et de la capacité computationnelle nécessaires. Les séquences chimériques sont éliminées, puis les séquences résultantes sont alignées et classifiées temporairement en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs). Ces dernières sont des regroupements de séquences semblables, généralement classifiées avec un taux de similitude se situant entre 95% et 100%. Les OTUs ne comportant qu'une séquence, aussi appelées singletons, sont éliminés. Les séquences sont finalement égalisées, formant un lot de séquences de haute qualité. Ces dernières sont employées pour la classification taxonomique des bactéries en OTUs, les tests statistiques de diversité, dont les indices de Simpson et de Shannon, et les courbes de raréfaction.

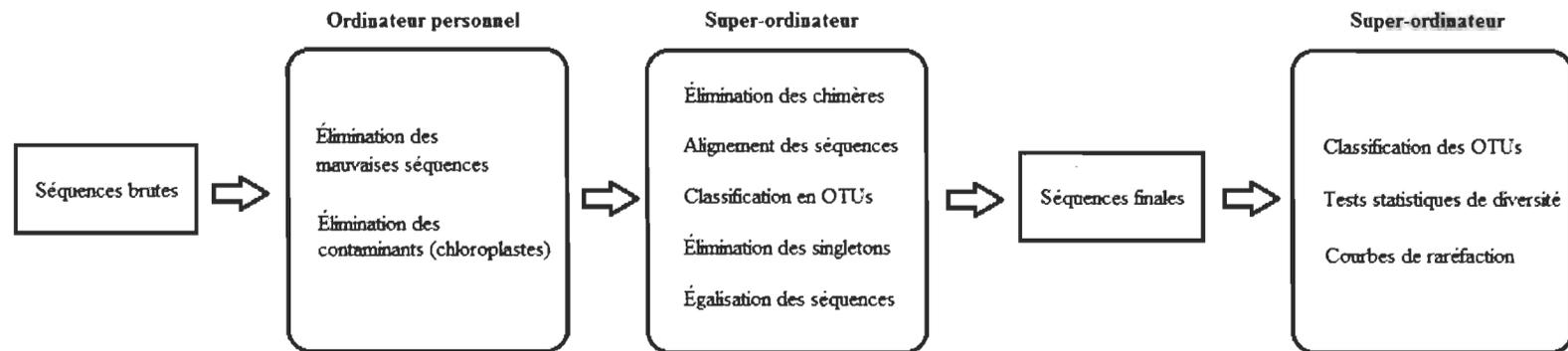


Figure 1.7 Grandes étapes d'optimisation des séquences avec le logiciel Mothur.

1.7 Problématique

Les papeteries sont sujettes à une contamination microbienne, tant au niveau de la machinerie qu'au niveau de leurs produits finis. De plus, les circuits d'eau de l'usine sont contaminés par des microorganismes, favorisant l'apparition et le développement de biofilms. Ces derniers sont à l'origine de différents problèmes, notamment le blocage et la corrosion des tuyaux, la formation de trous dans les feuilles de papier et de carton fabriqués et les arrêts de production pour le nettoyage et l'entretien. Afin de remédier à cette contamination microbiologique, divers biocides et autres produits nettoyants sont appliqués en grande quantité, sans toutefois éliminer complètement les microorganismes. Les biocides appliqués sont très coûteux pour les papeteries et sont souvent nocifs pour l'environnement.

La fabrication des papiers et cartons a été modifiée depuis les dernières années. Les copeaux de bois utilisés comme matières premières ont fait place aux matières récupérées, soit les papiers et cartons issus des collectes sélectives municipales. Également, à des fins économiques et environnementales, l'eau est maintenant recirculée dans les procédés.

Suite aux changements apportés aux papeteries, la quantité de biofilms sur la machinerie s'est accrue et une augmentation de bactéries dans les produits finis a été observée. La source de cette contamination serait principalement, selon Blanco *et al.* (1996) et Suihko et Skyttä (2009), les papiers et cartons récupérés, avant leur entrée dans la papetière. Afin de mieux contrôler l'accumulation microbienne dans le procédé industriel de fabrication de la pâte, il est important de connaître la composition microbiologique dans les différentes composantes des papeteries. La pâte, certains additifs, l'eau, les biofilms et les produits finis ont déjà fait l'objet d'études portant sur la caractérisation de leur contenu bactérien. La source de la contamination reste cependant incertaine, puisque la population bactérienne des papiers et cartons récupérés n'a jamais été caractérisée. À partir de cette problématique, différentes hypothèses ont été élaborées :

- Les ballots de carton récupéré sont contaminés par une population bactérienne.
- Il est possible d'amplifier par PCR la région hypervariable V6-V8 du gène de l'ARNr 16S de toutes les bactéries présentes dans l'échantillon, sans devoir passer par des cultures bactériennes.
- L'ensemble des fragments amplifiés peut être cloné, générant alors une banque de clones. Ces clones peuvent être séquencés.
- L'ensemble des fragments amplifiés peut être soumis directement au pyroséquençage, sans devoir passer par la construction d'une banque de clones.
- La détermination des séquences nucléotidiques de la région hypervariable V6-V8 du gène de l'ARNr 16S, permet d'identifier les bactéries présentes au niveau du genre.
- Les flores bactériennes identifiées par la banque de clones et le pyroséquençage peuvent être comparées.

Afin de mieux comprendre la problématique décrite, les objectifs de recherche ont été établis :

- Déterminer la flore bactérienne d'un ballot de carton avant son entrée dans la papetière.
- Mettre au point un protocole d'extraction d'ADN génomique total bactérien propre au substrat, le carton récupéré.
- Amplifier la région hypervariable V6-V8 du gène de l'ARNr 16S des bactéries présentes dans un ballot de carton.
- Identifier la flore bactérienne du ballot de carton par banque de clones et par pyroséquençage.
- Comparer les flores bactériennes identifiées par les deux méthodes.

CHAPITRE II

COMPARAISON DE LA FLORE BACTÉRIENNE D'UN BALLOT DE CARTON RÉCUPÉRÉ ANALYSÉE PAR PYROSÉQUENÇAGE ET PAR BANQUE DE CLONES

Valérie Lalande, Simon Barnabé, Jean-Charles Côté

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Advances in Microbiology*. La référence de cet article est la suivante :
Advances in Microbiology (2014) 4 : 754-760.

2.1 Contribution des auteurs

Tout le travail de laboratoire a été réalisé par Valérie Lalande, sous la supervision des Drs Barnabé et Côté. La rédaction du manuscrit a été effectuée par Valérie Lalande et Jean-Charles Côté. Simon Barnabé a contribué au manuscrit par ses commentaires constructifs.

2.2 Résumé de l'article

L'accumulation de microorganismes est un problème majeur rencontré par les papetières utilisant des papiers et cartons récupérés, diminuant la qualité des produits finis recyclés. Plusieurs études ont ciblé le contenu microbiologique dans les papetières et dans les produits finis. Notre objectif était de déterminer la flore microbienne dans un ballot de carton récupéré, avant son entrée dans la papetière. L'ADN génomique total a été isolé et analysé par deux méthodes différentes : le pyroséquençage et la banque de clones. Un total de 3268 séquences de la région V6-V8 du gène de l'ARNr 16S a été obtenu par pyroséquençage et 322 séquences nucléotidiques de cette même région ont été obtenues par la banque de clones. Les deux méthodes ont montré la présence de trois

genres bactériens majoritaires : *Bacillus*, *Solibacillus* et *Paenibacillus*, tous membres de l'embranchement des Firmicutes, des bactéries sporulantes. Le pyroséquençage a cependant révélé une flore bactérienne plus riche et plus diversifiée que la banque de clones : des genres mineurs additionnels des Firmicutes et un petit nombre de Protéobactéries ont été identifiés. Le triage au centre de tri, l'entreposage et le traitement dans la papetière ainsi que les différentes utilisations contribuent à la flore bactérienne présente dans un ballot de carton récupéré, comme révélé dans cette étude.

Rapport-Gratuit.com

2.3 Article scientifique

Comparison of the bacterial microbiota in a bale of collected cardboard determined by 454 pyrosequencing and clone library

Valérie Lalande^{1,2}, Simon Barnabé³ and Jean-Charles Côté²

¹ Université du Québec à Trois-Rivières, Département de Biologie médicale, 3351 Boul. des Forges, P.O. Box 500, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada

² Agriculture and Agri-Food Canada, Research and Development Centre, 430 Gouin Blvd, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, J3B 3E6, Canada

³ Université du Québec à Trois-Rivières, Département de Chimie, biochimie et physique, 3351 Boul. des Forges, P.O. Box 500, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada

Correspondence to Valérie Lalande

E-mail: Valerie.Lalande@uqtr.ca

Abstract

Biofouling, the accumulation of microorganisms, is a major problem in paper mills processing paper and cardboard. This leads to the production of lower quality recycled products. Several studies have focused on the microbial content in the paper mill and the final products. Our aim was to determine the microbial biota in a bale of collected cardboard prior to entering the paper mill. Total genomic DNA was isolated and analyzed using two different methods for comparison purposes: 454 pyrosequencing and clone library. A total of 3268 V6-V8 454 pyrosequencing reads and 322 cloned V6-V8 16S rRNA nucleotide sequences was obtained. Both methods showed the presence of three major bacterial genera: *Bacillus*, *Solibacillus* and *Paenibacillus*, all members of the spore-forming phylum Firmicutes. Pyrosequencing, however, revealed a richer and more diverse bacterial community than clone library. It showed the presence of additional minor Firmicute genera and of a small number of Proteobacteria. The sorting at the recycling plant, the storing, and the processing at the paper mill, the end uses, will all contribute to the bacterial microbiota present in a bale of collected cardboard as revealed here.

Keywords: 454 pyrosequencing, bacterial microbiota, cardboard, clone library, paper mill

1. Introduction

In a paper mill, collected paper and cardboard obtained from a recycling plant are mixed with water to form a fiber slurry. The slurry is passed through fine mesh screens, leaving sheets of wet paper and cardboard fibers on the screens, and white water, water with cloudy appearance due to the presence of fibers. The former are further dried and processed to yield the final recycled products. Owing to the large volumes of water used, the latter is re-circulated in the treatment of additional bales of collected paper and cardboard.

Bales of collected paper and cardboard, owing to their high cellulose content, provide a substrate for microbial growth during storage and processing [1] [2]. Moreover, because the white water has been enriched in cellulose and residual sugars through multiple reuses, it is a suitable substrate for microbial proliferation. These lead to the formation of biofilms, the clogging of pipes and the corrosion of equipment. Biocides can be used to control the microbial contamination. This, however, is not without drawbacks. Biocides are costly and eventually released in the environment where they cause negative impacts. Plant downtime for cleaning can occur and, in some cases, the quality of the final recycled paper and cardboard can be much lowered as evidenced by the presence of bacteria, holes, pores, undesirable odor, and decreased mechanical strength [3].

A better knowledge of the microbial contamination source is necessary to control the problems caused by the accumulation of microorganisms, biofouling, and to increase the quality of the final recycled paper and cardboard [4]. Culturable bacterial population diversity has been studied in the fiber slurry [5]–[7], white water [5] [8], biofilms [6] [9] [10], and the final recycled products [11] by 16S rRNA gene sequences. In addition, biofilms were also studied by microscopy [5] [9] [10] [12], physiological and biochemical characterization [9] [10] [12], and fatty acids analysis [10] [12]. Unculturable bacterial population diversity has been determined in the fiber slurry [13] [14], white water [14] and biofilms [13]–[15] by 16S rRNA gene sequences.

One of the most important sources of bacterial contamination in a paper mill is the cellulosic raw material [2]. However, the microbiota present in bales of collected paper and cardboard has never been characterized.

The characterization of bacterial populations traditionally relied on cultures followed by sequencing the 16S rRNA gene, the nucleotide sequence of choice in bacterial identification [16]. Most bacteria, however, cannot be cultivated [17]. Metagenomics is the study of the entire genetic material present in a sample. Here, total DNA is isolated and a 16S rRNA clone library is prepared. The nucleotide sequence of each clone is determined. More recently, high-throughput massively parallel pyrosequencing has revolutionized environmental microbiology [18]. It permits the direct sequencing of the amplified target DNA, bypassing the need for cloning.

Our aim in the present preliminary study was to determine the bacterial microbiota in a single bale of collected cardboard, prior to entering the paper mill. Two different approaches were used: 454 pyrosequencing and clone library.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

A bale of collected cardboard of 1.8 m X 0.7 m X 1.2 m in size was obtained from a recycling plant (QC, Canada). Fifteen samples of approximately 20 g each were randomly collected from the bale using a high-speed hole cutter (3.5 cm in diameter) coupled to an electric drill. They were pooled together, transferred in a plastic bag and frozen at -80°C until use.

2.2. Total genomic DNA extraction

A 10 g cardboard sample was transferred in a 1L flask containing 125 ml saline (0.85% NaCl) and incubated on a rotary shaker at 120 rpm, at room temperature, overnight. A

12 ml volume of mixture was transferred to a 15 ml tube, centrifuged in a Beckman-Coulter Allegra 25R Centrifuge tabletop at 1000 rpm, 3 min, at room temperature, to pellet the fibers. The supernatant was transferred to a 50 ml tube, centrifuged in a Beckman (Model J2-21M) at 9000 rpm, 15 min, at room temperature, to pellet the cells. The supernatant was discarded and the cell pellet resuspended in 480 μ l 50 mM EDTA pH 8.0. Total genomic DNA was isolated using the Wizard DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions for "Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria".

2.3. PCR amplification of the 16S rRNA gene V6-V8 region and 454 pyrosequencing

Two separate PCR amplifications were performed; a first one in which the amplicons were sequenced on a Roche 454 GS-FLX Titanium platform, a second one in which the amplicons were cloned and sequenced.

The 16S rRNA gene V6-V8 region was amplified with the primer pair used for 454 pyrosequencing A1-B969F (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG•ACGAGTGCGT•ACGCGHNRAACCTTACC-3') and B-BA1406R (5'-CCTATCCCC TGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG•ACGGGCRGTGWGTRCAA-3') as designed by Comeau et al. [19]. The forward primer included Roche's A adaptor, a multiplex identifier and the 16S rRNA gene V6 specific primer. This primer corresponds to nucleotide positions 969 to 985 in the *E. coli* 16S rRNA gene. The reverse primer included Roche's B adaptor and the 16S rRNA gene V8 specific primer. It corresponds to nucleotide positions 1390 to 1406.

The amplification was performed as described by Comeau et al. [19] at the Plateforme d'Analyses Génomiques (PAG), Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Quebec City, QC, Canada. The amplification conditions were as follows: an initial denaturation at 98°C for 30 s, followed by 30 cycles at denaturing temperature of 98°C for 10 s, annealing at 55°C for 30 s, extension at 72°C for 30 s, followed by a final extension at 72°C for 5 min.

The nucleotide sequences were determined on a Roche 454 GS-FLX Titanium platform at IBIS. The raw pyrosequencing reads were deposited in the NCBI Sequence Read Archive with accession number SRR961674.

2.4. PCR amplification of the 16S rRNA gene V6-V8 region, cloning and sequencing

The 16S rRNA gene V6-V8 region was amplified with the primer pair B969F (5'-ACGCGHNRAACCTTACC-3') and BA1406R (5'-ACGGGCRGTGWGTRCAA-3') [19]. A PCR reaction contained 15 μ l of TopTaq Master Mix (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA), 0.6 μ l of each primer and 50 ng of total genomic DNA, in a final volume of 30 μ l. The amplification conditions were as described above. The PCR amplicons were visualized on a 0.7% agarose gel and stored at -20°C.

The PCR amplicons were cloned using a TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The isolation of recombinant plasmids was performed using a QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Sciences) following the manufacturer's instructions. The nucleotide sequences were determined for both strands by the dideoxynucleotide chain-termination method [20] using a capillary array automated DNA sequencer (ABI3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) at the sequencing platform of the McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montreal, QC, Canada. The nucleotide sequences were deposited in GenBank under accession numbers KF589334-KF589827.

2.5. Sequence analysis, taxonomic identification and statistics

Raw 454 pyrosequencing reads and V6-V8 16S rRNA nucleotide sequences obtained following cloning were processed within Mothur v.1.30.0 (<http://www.mothur.org>) [21] [22] as described by Comeau et al. [23]. Briefly, low-quality pyrosequencing reads and low-quality V6-V8 16S rRNA nucleotide sequences obtained following cloning along

with chimeric sequences were removed. The high-quality reads and nucleotide sequences were aligned against the bacterial SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) [24] reference alignment and were improved by removing misaligned reads. The singletons were finally excluded to yield the final dataset. These final reads were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) at the 97% similarity level, and taxonomic identification of the OTUs was carried out in Mothur against a modified 16S rRNA gene database based upon the “GreenGenes97” (<http://greengenes.lbl.gov>) [25] [26] reference files for pyrosequencing [23].

The rarefaction curves, the plot of the number of OTUs over the number of sequences sampled, were generated. The Chao 1 richness estimator, the Shannon and Simpson diversity indices, and the evenness were calculated at the 97% similarity level using Mothur.

3. Results and discussion

3.2. PCR amplification of the 16S rRNA gene V6-V8 region and 454 pyrosequencing

A total of 3268 V6-V8 454 pyrosequencing final reads was obtained. Their average length was 435 bp. At the 97% similarity level, these reads were clustered into 117 OTUs. As shown in Figure 1A, 97% of these OTUs belonged to the phylum Firmicutes. The remaining 3% belonged to the phylum Proteobacteria. All Firmicutes were assigned to three families: *Bacillaceae*, *Planococcaceae*, *Paenibacillaceae* with 76%, 14% and 7% of the total OTUs, respectively. These three families comprised six, two, and one genera. The unclassified *Bacillaceae* and *Planococcaceae* represented 16% and 2% of the total OTUs. Interestingly, the genus *Bacillus*, a member of the *Bacillaceae* family, accounted for 53% of the total OTUs. The genera *Solibacillus* and *Paenibacillus*, members of the *Planococcaceae* and *Paenibacillaceae* families, were also predominantly represented with 11% and 7% of the total OTUs.

3.2. PCR amplification of the 16S rRNA gene V6-V8 region, cloning and sequencing

A total of 494 V6-V8 sequences was obtained. They vary from 436 to 441 bp in length. Following processing, a total of 322 sequences was retained. Their average length was 439 bp. At the 97% similarity level, these sequences were clustered into 27 OTUs. As shown in Figure 1B, they all belonged to the phylum Firmicutes. Here also, all Firmicutes were assigned to three families: *Bacillaceae*, *Planococcaceae*, *Paenibacillaceae* with 74%, 19% and 7% of the total OTUs, respectively. These three families comprised two, two, and one genera. Here also, the genus *Bacillus* accounted for 70% of the total OTUs. The genera *Solibacillus* and *Paenibacillus* were also predominant with 15% and 7% of the total OTUs.

3.3. Comparison of the bacterial communities obtained using 454 pyrosequencing and clone library

The rarefaction curves showed that 454 pyrosequencing yielded more OTUs than clone library when the same number of sequences was sampled (Figure 2). Pyrosequencing revealed a richer bacterial community than clone library. In addition, pyrosequencing yielded Chao 1 and Shannon indices with higher values compared to clone library (Table 1). This indicates a richer and more diverse bacterial community, respectively. Furthermore, pyrosequencing generated a Simpson diversity index and evenness with lower values compared to clone library. Clearly, 454 pyrosequencing revealed a much more diverse bacterial community than clone library.

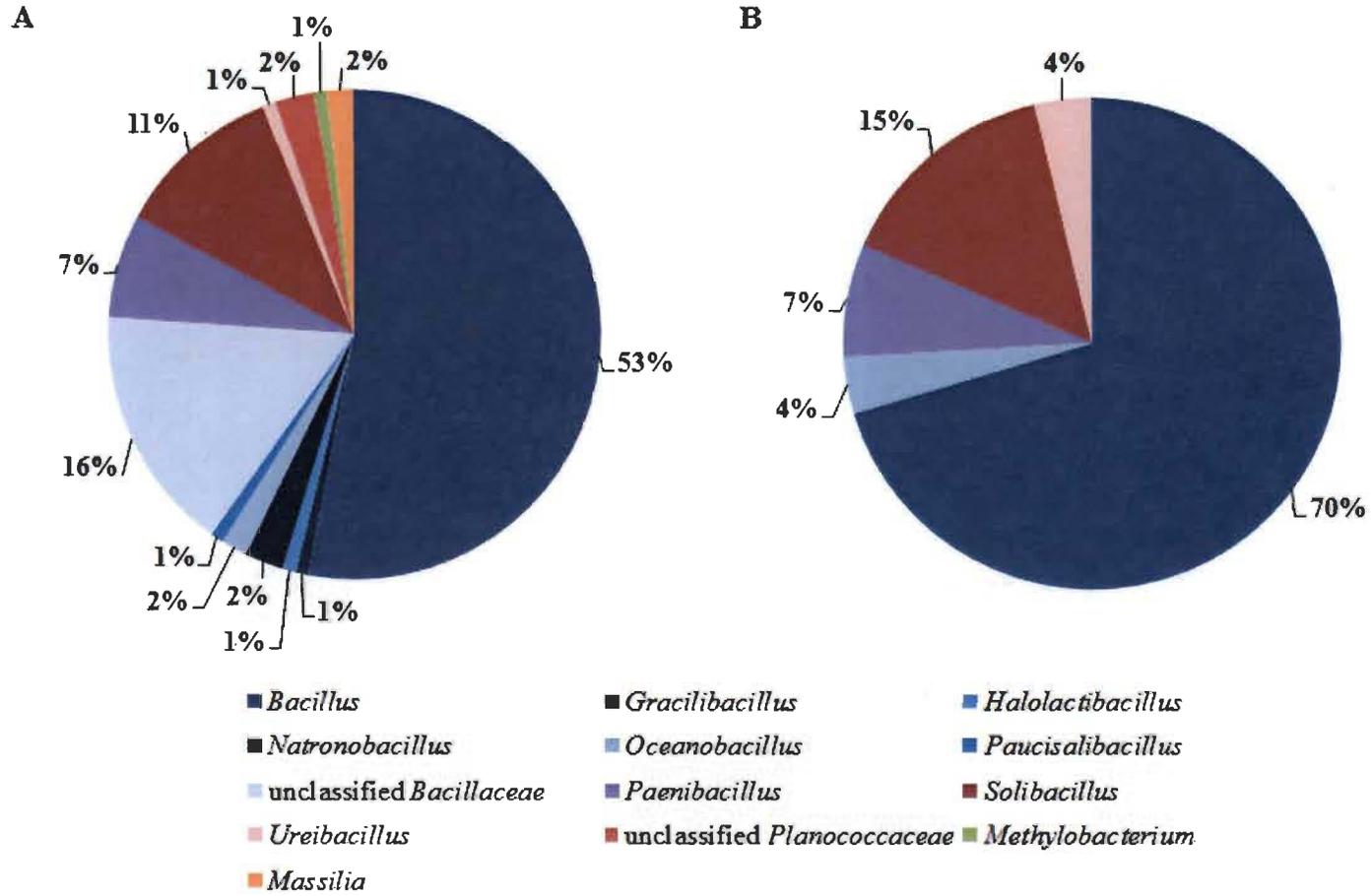


Fig. 1

Taxonomic distribution of all bacterial OTUs at the 97% similarity level. (A) Distribution of bacterial genera obtained from 454 pyrosequencing. (B) Distribution of bacterial genera obtained from clone library.

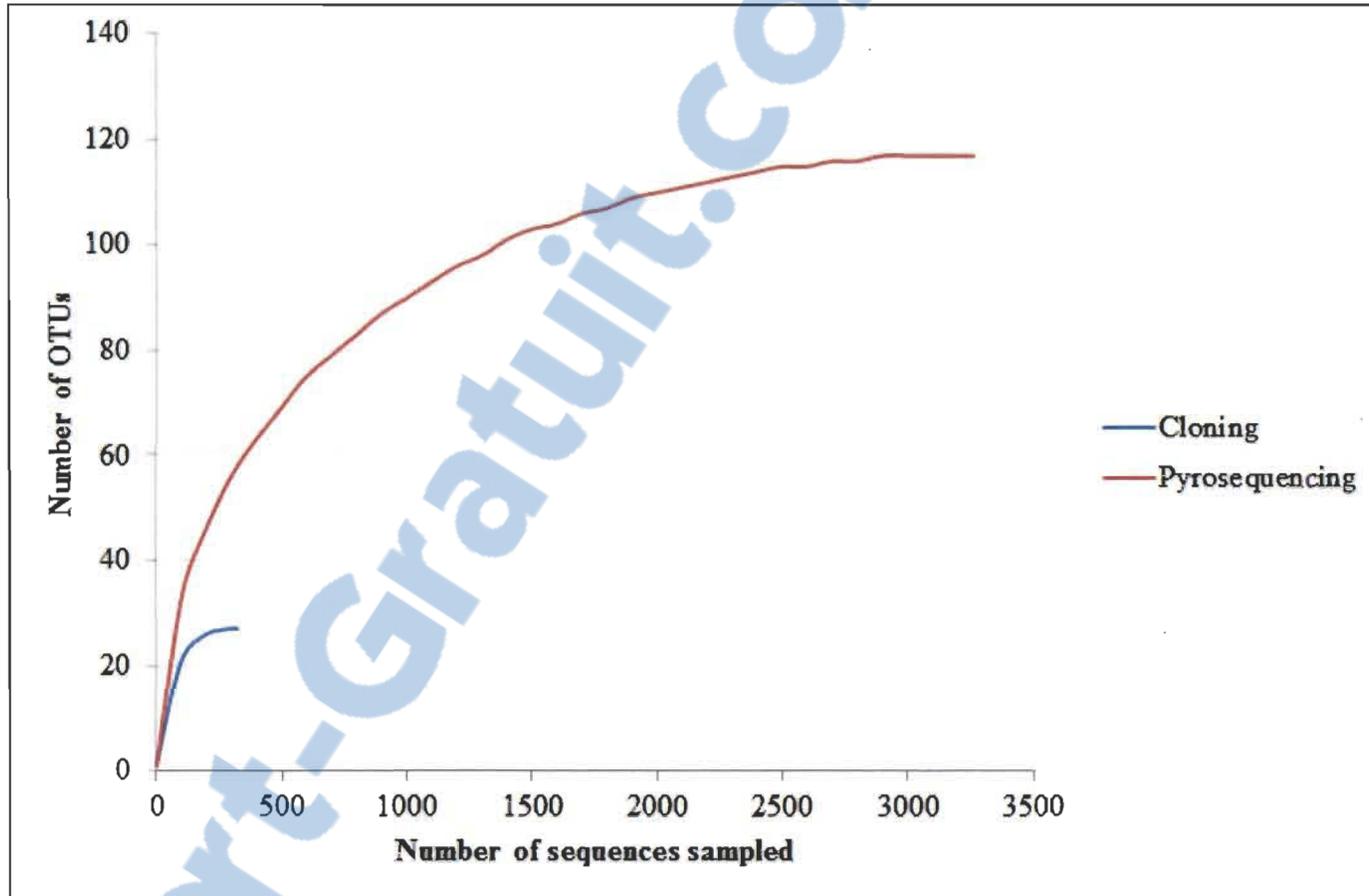


Fig. 2 Rarefaction analysis of the bacterial sequences obtained from 454 pyrosequencing and clone library at the 97% similarity level.

Table 1

Comparison of the richness and diversity of the bacterial communities for the two approaches used (97% similarity level).

	454 pyrosequencing	Clone library
Accession numbers	SRR961674	KF589334-KF589827
Number of sequences	3268	322
Chao 1 richness	117	27
Shannon diversity index	3.41	2.42
Simpson diversity index	0.06	0.14
Evenness	0.26	0.42

Bacteria, mostly Firmicutes and Proteobacteria, are introduced to the paper mill through contaminated cellulosic raw material, fresh incoming water and paper-making chemicals [2] [5]. Physical conditions in the paper mill range from basic to acidic pH, ambient and high temperatures, aerobic and anaerobic environments, etc. Bacterial spores, owing to their resistance, will survive these very harsh environmental conditions and will be selected for. This leads to the accumulation and predominance of the spore-forming Firmicutes and the near absence of the much more sensitive non-spore-forming Proteobacteria. This was shown by Öqvist et al. [8] who found *Bacillus* and *Enterococcus* in white water. Disnard et al. [27] and Rättö et al. [28] both found *Bacillus* and *Paenibacillus* in biofilms. Suihko and Stackebrandt [29], Suominen et al. [30] and Väisänen et al. [31] all found *Bacillus* and *Paenibacillus* in final recycled food packaging paper and board. Suihko and Stackebrandt [29] also found *Bacillus silvestris*, which has since been renamed *Solibacillus silvestris* [32], a genus present in our study. Likewise, McCusky Gendron et al. [11] and Namjoshi et al. [33] found *Bacillus* and *Paenibacillus* on unused paper towels and linerboard, respectively. Following use, some of these final recycled products will re-enter the recycling process. The bale of

cardboard used in our study was a mix of cardboard collected from different sources. Most cardboard present in our bale had already gone through the recycling process several times, from the recycling plant to the paper mill, the production of the final recycled products, their various uses and back. The recycling plant is also a major source of microbial contamination. It receives paper, cardboard, glass, metal, plastic and textiles from domestic, industrial and commercial sources, some potentially soiled with food, grease and other organic residues, all substrates for microbial proliferation and accumulation. Following sorting, bales will most often be stored outdoors, under different meteorological and environmental conditions (rain, snow, wind, temperature, and the presence of small rodents and birds, etc.) for extended periods. This will most certainly lead to the formation of a much more complex and dynamic microbiota.

Ultimately, bales of cardboard ready to enter the paper mill for recycling have already been in contact with several potential sources of contamination. This is what we found here with the presence of Firmicutes: *Bacillus*, *Solibacillus* and *Paenibacillus*, and the near absence of Proteobacteria in our bale of cardboard.

We are planning to follow up on this study by analyzing the bacterial community in other potential sources of contamination in a paper mill such as fresh incoming water and chemicals, additives and fillers. We will also study different bales of cardboard stored under various conditions. A better knowledge of their microbiota appears necessary to improve the storing conditions in order to reduce biofouling in the paper mill and ultimately to increase the quality of the final recycled products.

4. Conclusion

In conclusion, both methods, 454 pyrosequencing and clone library, showed the predominance of spore-forming Firmicutes in the bale of collected cardboard. However, pyrosequencing revealed a richer and more diverse bacterial community than clone library. The large number of steps in the recycling process, from the paper mill to the recycling plant and back, contributes to the bacterial microbiota revealed in this study.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant EGP 436904 – 12). We thank Dong Xu for technical help with the cloning of PCR amplicons and Hassan Chadjaa and Kokou Adjallé for assistance in bale sampling. We thank Marie-Hélène Charest and Roger Gaudreault for helpful comments throughout the course of this study.

References

1. Sorrelle, P.H. and Belgard, W.E. (1991) The effect of recycled fiber use on paper machine biological control. TAPPI Proceedings, 569-575.
2. Blanco, M.A., Negro, C., Gaspar, I. and Tijero, J. (1996) Slime problems in paper and board industry. Applied Microbiology and Biotechnology, 46, 203-20.
3. Flemming, H.C., Meier, M. and Schild, T. (2013) Mini-review: microbial problems in paper production. Biofouling, 29, 683-96.
4. Milferstedt, K., Godon, J.J., Escudié, R., Prasse, S., Neyret, C. and Bernet, N. (2012) Heterogeneity and spatial distribution of bacterial background contamination in pulp and process water of a paper mill. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39, 1751-1759.
5. 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. Journal of Applied Microbiology, 84, 1069-1084.
6. 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, 30, 141-145.
7. Suihko, M.L. and Skyttä, E. (2009) Characterisation of aerobically grown non-spore-forming bacteria from paper mill pulps containing recycled fibres. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36, 53-64.
8. Öqvist, C.K., Kurola, J., Pakarinen, J., Ekman, J., Ikävalko, S., Simell, J. and Salkinoja-Salonen, M. (2008) Prokaryotic microbiota of recycled paper mills with low or zero effluent. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35, 1165-1173.
9. 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, 65, 156-162.
10. 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, 25, 74-80.

11. McCusky Gendron, L., Trudel, L., Moineau, S. and Duchaine, C. (2012) Evaluation of bacterial contaminants found on unused paper towels and possible postcontamination after handwashing: A pilot study. *American Journal of Infection Control*, 40, e5-e9.
12. Väisänen, O.M., Nurmiaho-Lassila, E-L., Marmo, S.A. and Salkinoja-Salonen, M.S. (1994) Structure and composition of biological slimes on paper and board machines. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 641-653.
13. 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*, 33, 734-740.
14. Granhall, U., Welsh, A., Throbäck, I.N., Hjort, K., Hansson, M. and Hallin, S. (2010) Bacterial community diversity in paper mills processing recycled paper. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 1061-1069.
15. Tirola, M., Lahtinen, T., Vuento, M. and Oker-Blom, C. (2009) Early succession of bacterial biofilms in paper machines. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 929-937.
16. Woese, C.R. (1987) Bacterial Evolution, *Microbiological Reviews*, 51, 221-271.
17. Hugenholtz, P., Goebel, B.M. and Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180, 4765-74.
18. Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M. and Herndl, G.J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 12115-12120.
19. Comeau, A.M., Li, W.K.W., Tremblay, J.E., Carmack, E.C. and Lovejoy, C. (2011) Arctic Ocean microbial community structure before and after the 2007 record sea ice minimum. *PLoS ONE*, 6, e27492.
20. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467.

21. Schloss, P.D. (2009) A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PLoS ONE*, 4, e8230.
22. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. and Weber, C.F. (2009) Introducing Mothur: Open source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7537-7541.
23. Comeau, A.M., Harding, T., Galand, P.E., Vincent, W.F. and Lovejoy, C. (2012) Vertical distribution of microbial communities in a perennially-stratified Arctic lake with saline, anoxic bottom waters. *Scientific Reports*, 2, 604.
24. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glöckner, F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590-D596.
25. DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. and Andersen, G.L. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5069-5072.
26. Werner, J.J., Koren, O., Hugenholtz, P., DeSantis, T.Z., Walters, W.A., Caposaro, J.G., Angenent, L.T., Knight, R and Ley, R.E. (2012) Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16S rRNA gene surveys. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 6, 94-103.
27. Disnard, J., Beaulieu, C. and Villemur, R. (2011) Composition of the bacterial biota in slime developed in two machines at a Canadian paper mill. *Canadian Journal of Microbiology*, 57, 91-104.
28. Rättö, M., Suihko, M.L. and Siika-aho, M. (2005) Polysaccharide-producing bacteria isolated from paper machine slime deposits. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 109-114.

29. Suihko, M.L. and Stackebrandt, E. (2003) Identification of aerobic mesophilic bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibres. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 25-34.
30. Suominen, I., Suihko, M.L. and Salkinoja-Salonen, M. (1997) Microscopic study of migration of microbes in food-packaging paper and board. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 104-113.
31. Väisänen, O.M., Mentu, J. and Salkinoja-Salonen, M. (1991) Bacteria in food packaging paper and board. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 130-133.
32. Krishnamurthi, S., Chakrabarti, T. and Stackebrandt, E. (2009) Re-examination of the taxonomic position of *Bacillus silvestris* Rheims et al. 1999 and proposal to transfer it to *Solibacillus* gen. nov. as *Solibacillus silvestris* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1054-1058.
33. Namjoshi, K., Johnson, S., Montello, P. and Pullman, G.S. (2010) Survey of bacterial populations present in US-produced linerboard with high recycle content. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 416-427.

CHAPITRE III

CONCLUSION

Ces travaux ont démontré qu'un ballot de carton est contaminé par une population bactérienne et qu'il est possible de l'identifier par deux méthodes de biologie moléculaire : la banque de clones et le pyroséquençage.

Cette étude présente toutefois quelques limites. Les ballots de carton sont très hétérogènes : ils comportent des matières provenant de différentes sources et de milieux variés. Puisque les flores microbiennes ne seront pas nécessairement les mêmes d'un endroit à un autre dans un même ballot, il devient important d'établir une bonne représentativité au sein du ballot. Dans le cadre de travaux futurs, plusieurs échantillons seraient prélevés à différents endroits sur le ballot, puis un séquençage à haut débit serait effectué pour chacun de ces échantillons. De plus, ces mêmes échantillons pourraient être mélangés et une seule réaction de séquençage suivrait. Des séquençages à haut débit pourraient également être effectués avec plusieurs ballots de carton afin d'étudier la représentativité d'un ballot à un autre.

Une autre limite à ces travaux est que l'identification taxonomique des bactéries ne se fait qu'au niveau du genre, puisque les séquençages nucléotidiques sont basés sur une portion de gène seulement, car le pyroséquençage ne génère que des fragments d'environ 500 pb. Bien que cela donne une information générale sur la composition bactérienne dans le ballot de carton, il est difficile d'établir un lien précis entre les bactéries identifiées et celles que l'on retrouve dans les différentes composantes des papeteries. Il serait intéressant, à court terme, d'effectuer une identification taxonomique plus approfondie, soit de déterminer les bactéries aux niveaux des espèces et des sous-espèces. Pour ce faire, il faut utiliser des gènes de ménage, qui sont des gènes qui s'expriment dans toutes les cellules et dont leurs produits assurent des fonctions

essentielles à la survie cellulaire. Des exemples de gènes de ménage sont les gènes *adh*, *gdh* et *ppk*. Leurs produits sont respectivement l'adénylate kinase, la glucose-6-P-déshydrogénase et la polyphosphate kinase (Maiden *et al.*, 1998).

Comme les ballots de carton ne sont pas les seules sources de fibres, il faudrait étudier les microflores d'autres types de matières premières de la papetière, comme des ballots de papiers mélangés et de papier journal. Également, les différentes microflores du système d'eau devraient être analysées. Cela comprend l'eau fraîche entrant dans la papetière, l'eau blanche qui est recirculée ainsi que les biofilms qui se forment sur les filtres et dans les tuyaux. Il faudrait aussi déterminer le contenu microbiologique des additifs et des produits finis pour avoir une vue d'ensemble des microflores dans la papetière. Cela permettrait d'identifier plus précisément la ou les sources potentielles de contamination bactérienne au sein de la papetière.

De plus, comme les ballots de papier et carton sont entreposés avant d'être utilisés, des travaux supplémentaires pourraient cibler les effets de l'entreposage extérieur qu'ont sur les flores bactériennes des ballots. Les conditions météorologiques (température, pluie, neige, etc.) ainsi que la durée de l'entreposage seraient étudiées. Également, toutes les composantes de la papetière pourraient aussi être analysées pour identifier les archéobactéries et les eucaryotes (moisissures, levures, champignons, etc.). Une fois la ou les sources majeures de contamination identifiées, un traitement antimicrobien efficace pourrait être développé et appliqué directement à la source.

À plus long terme, la mise en place de telles mesures de contrôle et de suivi des microflores devrait mener à une diminution des contaminants microbiens, de la quantité de biofilms et de l'utilisation de biocides. Également, les arrêts de production nécessaires en raison du nettoyage et de l'entretien de la machinerie seraient moins fréquents et la qualité des produits finis serait meilleure.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blanco, M.A., Negro, C., Gaspar, I. et Tijero, J. (1996). Slime problems in paper and board industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46, 203-208.
- Bobbie, R.J. et White, D.C. (1980). Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl Environ Microbiol*, 39, 1212-1222.
- Cascades Groupe Papiers Fins (s.d.a). *Fabrication de la pâte désencrée*. Site téléaccessible à l'adresse <http://papiers.cascades.com/env_pate-desencree.php>. Consulté le 19 novembre 2013.
- Cascades Groupe Papiers Fins (s.d.b). *Fabrication du papier*. Site téléaccessible à l'adresse <http://papiers.cascades.com/env_fabrication-papier.php>. Consulté le 19 novembre 2013.
- Chaudhary, A., Gupta, L.K., Gupta, J.K. et Banerjee, U.C. (1998). Levanases for control of slime in paper manufacture. *Biotechnol Adv*, 16, 899-912.
- Commission mondiale sur l'environnement et le développement (1988). *Notre avenir à tous*. Montréal : Éditions du Fleuve.
- Desjardins, E. et Beaulieu, C. (2003). Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30, 141-145.
- Disnard, J., Beaulieu, C. et Villemur, R. (2011). Composition of the bacterial biota in slime developed in two machines at a Canadian paper mill. *Can J Microbiol*, 57, 91-104.
- Flemming, H.C., Meier, M. et Schild, T. (2013). Mini-review: Microbial problems in paper production. *Biofouling*, 29(6), 683-96.
- Gouvernement du Québec (1990). *Loi sur la Société québécoise de récupération et de recyclage*. Québec : Ministère de l'Environnement, Publications du Québec.
- Gouvernement du Québec (2010). *Les papiers et les cartons*. Vermette, F. Québec : Recyc-Québec.
- Gouvernement du Québec (2013). *Bilan 2010-2011 de la gestion des matières résiduelles au Québec*. Québec : Recyc-Québec.

- Granhall, U., Welsh, A., Throbäck, I.N., Hjort, K., Hansson, M. et Hallin, S. (2010). Bacterial community diversity in paper mills processing recycled paper. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37, 1061-1069.
- Hugenholz, P., Goebel, B.M. et Pace, N.R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*, 180(18), 4765-74.
- Humble, M.W., King, A. et Phillips, I. (1977). API ZYM: A simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J Clin Path*, 30, 275-277.
- Hutchinson, M. (2007). *Vos déchets et vous : Un guide pour comprendre et agir*. Québec : Éditions MultiMondes.
- Klahre, J. et Flemming, H.C. (2000). Monitoring of biofouling in paper mill systems. *Water Res*, 34, 3657-3665.
- Kurissery, S.R., Kanavillil, N., Leung, K.T., Chen, A., Davey, L. et Schraft, H. (2010). Electrochemical and microbiological characterization of paper mill biofilms. *Biofouling*, 26, 799-808.
- Lahtinen, T., Kosonen, M., Tirola, M., Vuento, M. et Oker-Blom, C. (2006). Diversity of bacteria contaminating paper machines. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33, 734-740.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R. et al. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 3140-3145.
- McCusky Gendron, L., Trudel, L., Moineau, S. et Duchaine, C. (2012). Evaluation of bacterial contaminants found on unused paper towels and possible postcontamination after handwashing: A pilot study. *Am J Infect Control*, 40, e5-e9.
- Miller, J.M. et Rhodes, D.L. (1991). Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. *J Clin Microbiol*, 29(6), 1143-1147.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. et Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.

- Namjoshi, K., Johnson, S., Montello, P. et Pullman, G.S. (2010). Survey of bacterial populations present in US-produced linerboard with high recycle content. *J Appl Microbiol*, 108, 416-427.
- Öqvist, C.K., Kurola, J., Pakarinen, J., Ekman, J., Ikävalko, S., Simell, J. et al. (2008). Prokaryotic microbiota of recycled paper mills with low or zero effluent. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35, 1165-1173.
- Rättö, M., Suihko, M.L. et Siika-aho, M. (2005). Polysaccharide-producing bacteria isolated from paper machine slime deposits. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 25, 109-114.
- Robertson, L.R. (2008). *Monograph on microbiology of papermaking systems*. TAPPI Microbiology and Microbial Technology Committee. Norcross, GA: TAPPI Press.
- Rondon, M.R., August, P.R., Betterman, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R. et al. (2000). Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Env Microbiol*, 66(8), 2541-2547.
- Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467.
- Schloss, P.D. (2009). A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PLoS ONE*, 4, e8230.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. et al. (2009). Introducing Mothur: Open source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75, 7537-7541.
- Siqueira, J.F., Fouad, A.F. et Rôças, I.N. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol*, 4, 10743.
- Suihko, M.L. et Stackebrandt, E. (2003). Identification of aerobic mesophilic bacilli isolated from board and paper products containing products containing recycled fibres. *J Appl Microbiol*, 94, 25-34.
- Suihko, M.L. et Skyttä, E. (2009). Characterisation of aerobically grown non-spore-forming bacteria from paper mill pulps containing recycled fibres. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 53-64.

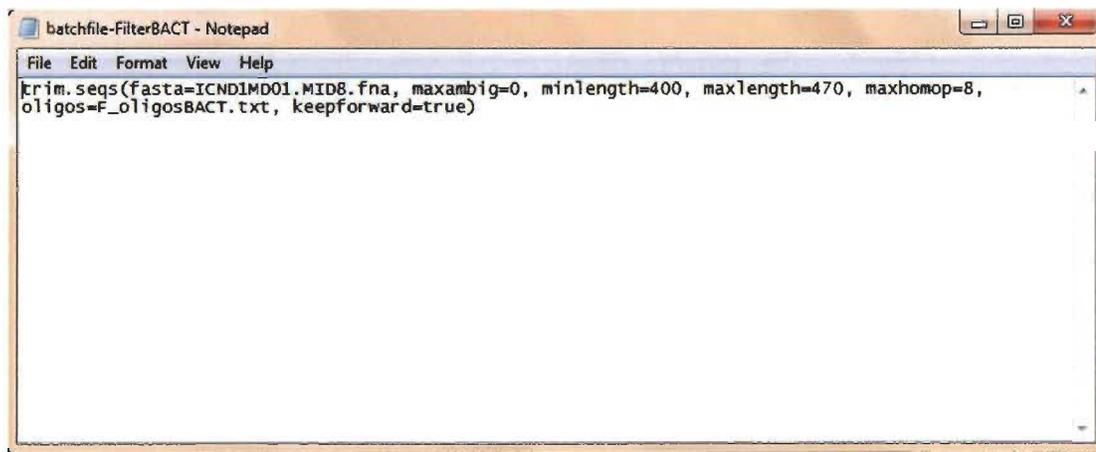
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R. et al. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 12115–12120.
- Tirola, M., Lahtinen, T., Vuotto, M. et Oker-Blom, C. (2009). Early succession of bacterial biofilms in paper machines. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 929-937.
- Tremblay, F. et Desjardins, J. (2009). *Manifestement vert*. Montréal : Les Éditions du Trécarré.
- Väisänen, O.M., Mentu, J. et Salkinoja-Salonen, M. (1991). Bacteria in food packaging paper and board. *J Appl Bacteriol*, 71, 130-133.
- Väisänen, O.M., Weber, A., Bennisar, A., Rainey, F.A., Busse, H.J. et Salkinoja-Salonen, M.S. (1998). Microbial communities of printing paper machines. *J Appl Microbiol*, 84, 1069-1084.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. et Woolverton, C.J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology* (7^e éd.). New York, NY : McGraw-Hill Higher Education.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol Rev*, 51(2), 221-271.

ANNEXE A

ÉTAPES D'OPTIMISATION DES SÉQUENCES, DE GÉNÉRATION DE STATISTIQUES ET DE CLASSIFICATION EN UNITÉS TAXONOMIQUES OPÉRATIONNELLES AVEC LE LOGICIEL MOTHUR

Les séquences du gène de l'ARN ribosomique 16S générées dans ce travail, suite au clonage de gène et au pyroséquençage, ont fait l'objet d'analyses bio-informatiques à l'aide du logiciel Mothur. Mothur est une suite informatique permettant de filtrer et d'aligner des séquences, de les classer en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) et de calculer des indices de diversité. Afin d'optimiser les séquences, des fichiers-lot de scripts sont créés, puis utilisés dans le logiciel Mothur.

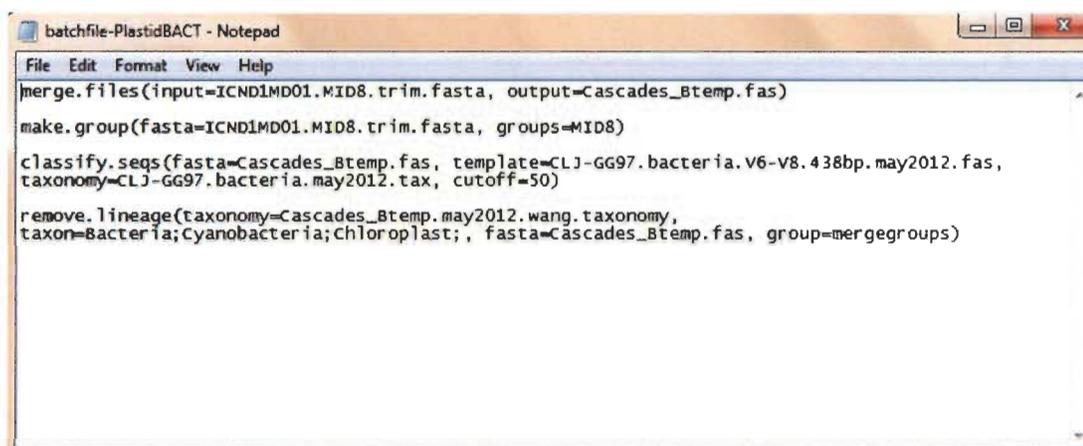
La première étape d'optimisation des séquences est de filtrer les séquences brutes obtenues par pyroséquençage. Pour ce faire, un fichier-lot est créé (Figure A.1). Il contient le script nécessaire pour qu'il soit reconnu par le logiciel Mothur. Les longueurs minimales et maximales des séquences doivent être déterminées (*minlength* et *maxlength*) ainsi que la longueur maximale des homopolymères (*maxhomop*). Ce fichier est utilisé dans le logiciel Mothur via l'Invite de commande.



```
batchfile-FilterBACT - Notepad
File Edit Format View Help
trim.seqs(fasta=ICND1MD01.MID8.fna, maxambig=0, minlength=400, maxlength=470, maxhomop=8,
oligos=F_oligosBACT.txt, keepforward=true)
```

Figure A.1 Fichier-lot contenant le script pour la filtration des séquences brutes.

Par la suite, un autre fichier-lot est créé pour éliminer les séquences contaminantes, comme par exemple l'ADN chloroplastique (Figure A.2). Ce fichier est utilisé dans le logiciel Mothur via l'Invite de commande.



```

merge.files(input=ICND1MD01.MID8.trim.fasta, output=Cascades_Btemp.fas)
make.group(fasta=ICND1MD01.MID8.trim.fasta, groups=MID8)
classify.seqs(fasta=Cascades_Btemp.fas, template=CLJ-GG97.bacteria.v6-v8.438bp.may2012.fas,
taxonomy=CLJ-GG97.bacteria.may2012.tax, cutoff=50)
remove.lineage(taxonomy=Cascades_Btemp.may2012.wang.taxonomy,
taxon=Bacteria;Cyanobacteria;Chloroplast;, fasta=Cascades_Btemp.fas, group=mergegroups)

```

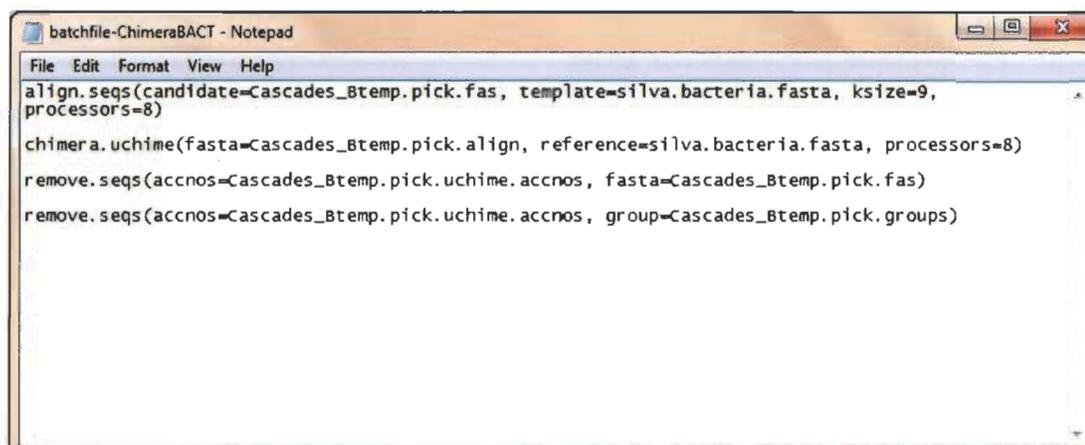
Figure A.2 Fichier-lot contenant le script pour l'élimination des séquences contaminantes.

L'étape suivante, celle de l'élimination des chimères, doit obligatoirement se faire sur un super-ordinateur en raison de la capacité computationnelle requise. Un fichier-lot est créé et le nombre de processeurs (*processors*) doit être de huit (Figure A.3). Cela signifie que les séquences seront séparées en huit et traitées en parallèle.

Le super-ordinateur utilisé dans ce projet est Colosse de l'Université Laval. Il fonctionne sous Linux. Pour envoyer une commande informatique, il faut tout d'abord créer un fichier de soumission en format *.sh* (Figure A.4). Ce dernier sera reconnu par l'ordonnanceur de tâches du super-ordinateur, dans ce cas Moab. Le fichier de soumission doit comporter les options souhaitées pour la tâche à exécuter. Les options sont reconnues avec le script *#PBS*. Le chemin vers le programme doit également être indiqué.

Tous les fichiers nécessaires à la tâche doivent être transférés sur le super-ordinateur en utilisant un logiciel de transfert FTP, puis les fichiers doivent avoir comme

permission la cote 775. La commande peut être directement lancée sur Colosse avec le script *msub*.

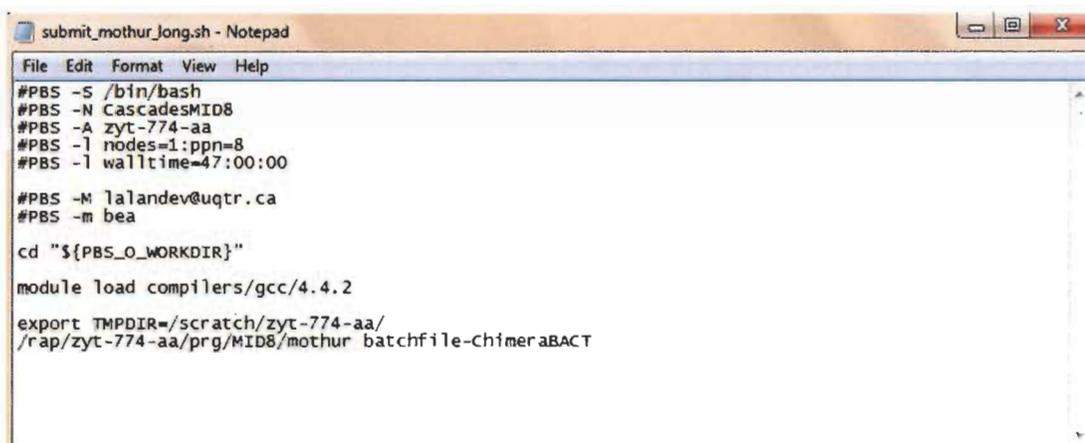


```

batchfile-ChimeraBACT - Notepad
File Edit Format View Help
align.seqs(candidate=Cascades_Btemp.pick.fas, template=silva.bacteria.fasta, ksize=9,
processors=8)
chimera.uchime(fasta=Cascades_Btemp.pick.align, reference=silva.bacteria.fasta, processors=8)
remove.seqs(accnos=Cascades_Btemp.pick.uchime.accnos, fasta=Cascades_Btemp.pick.fas)
remove.seqs(accnos=Cascades_Btemp.pick.uchime.accnos, group=Cascades_Btemp.pick.groups)

```

Figure A.3 Fichier-lot contenant le script pour l'élimination des chimères.



```

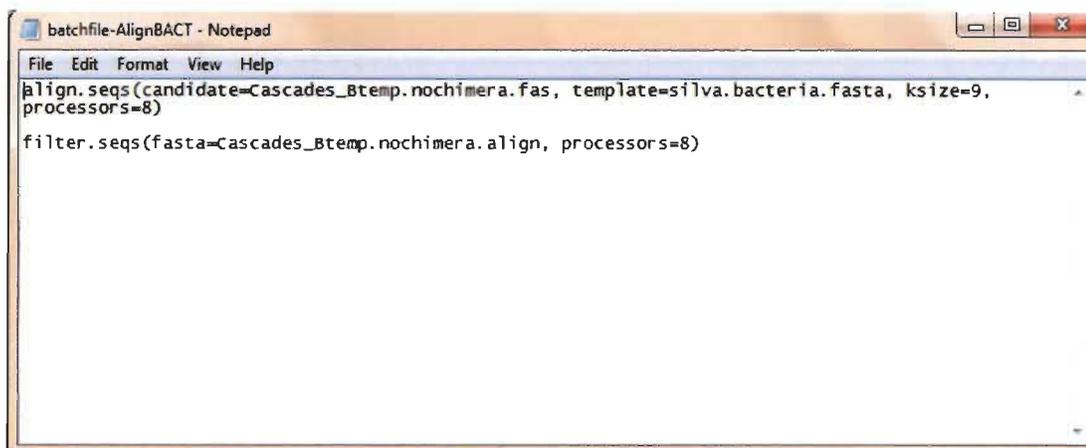
submit_mothur_jong.sh - Notepad
File Edit Format View Help
#PBS -S /bin/bash
#PBS -N CascadesMID8
#PBS -A zyt-774-aa
#PBS -l nodes=1:ppn=8
#PBS -l walltime=47:00:00
#PBS -M lalandev@uqtr.ca
#PBS -m bea
cd "${PBS_O_WORKDIR}"
module load compilers/gcc/4.4.2
export TMPDIR=/scratch/zyt-774-aa/
/rap/zyt-774-aa/prg/MID8/mothur batchfile-ChimeraBACT

```

Figure A.4 Fichier de soumission pour le lancement d'une commande dans le super-ordinateur Colosse.

L'étape suivante est l'alignement des séquences. Cette étape doit également s'effectuer sur le super-ordinateur. Il faut donc créer un fichier-lot contenant le script nécessaire pour effectuer la tâche (Figure A.5). Le fichier de soumission pour le lancement de la commande dans Colosse doit également être modifié pour inclure le nouveau fichier-lot. Une fois la tâche terminée, le fichier en format .fasta doit être ouvert dans le logiciel BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Il faut éliminer toutes les séquences qui comportent des grands trous (*gaps* en anglais). Une

fois terminé, il faut retenir la position de la dernière base de l'amorce R pour l'étape suivante (Figure A.6).



```

batchfile-AlignBACT - Notepad
File Edit Format View Help
align.seqs(candidate=Cascades_Btemp.nochimera.fas, template=silva.bacteria.fasta, ksize=9,
processors=8)
filter.seqs(fasta=Cascades_Btemp.nochimera.align, processors=8)

```

Figure A.5 Fichier-lot contenant le script pour l'alignement des séquences.

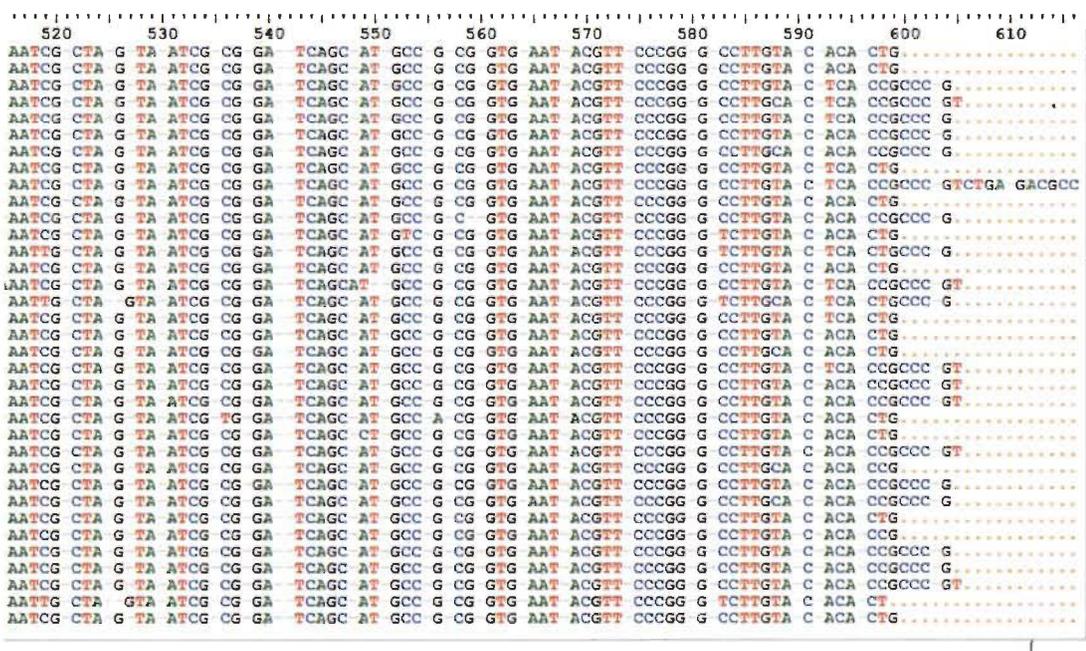


Figure A.6 Visualisation des séquences avec le logiciel BioEdit.

Dans le logiciel Mothur, sous Windows, une ligne de commande doit être entrée manuellement, afin d'éliminer toute portion de séquence se retrouvant après la dernière base de l'amorce R (Figure A.7).

```

Department of Microbiology & Immunology
University of Michigan
pschloss@umich.edu
http://www.nothur.org

When using, please cite:
Schloss, P.D., et al., Introducing mothur: Open-source, platform-independent, co
mmunity-supported software for describing and comparing microbial communities. A
ppl Environ Microbiol, 2009. 75(23):7537-41.

Distributed under the GNU General Public License

Type 'help()' for information on the commands that are available
Type 'quit()' to exit program

mothur > chop.seqs(fasta=Cascades_Btemp.nochimera.alignT.fas, countgaps=true, nu
mbases=650)_

```

Figure A.7 Ligne de commande utilisée dans le logiciel Mothur pour éliminer les fragments de séquences se retrouvant après la dernière base de l'amorce R.

Une fois l'étape d'alignement des séquences terminée, une étape d'élimination des singletons doit être effectuée sur le super-ordinateur. Les singletons sont des OTUs ne comportant qu'une seule séquence nucléotidique. Comme pour les étapes précédentes, un fichier-lot comportant le script doit être rédigé (Figure A.8). La classification en OTUs (*hcluster*) doit se faire à un niveau de 97% de similarité (*cutoff=0.03*).

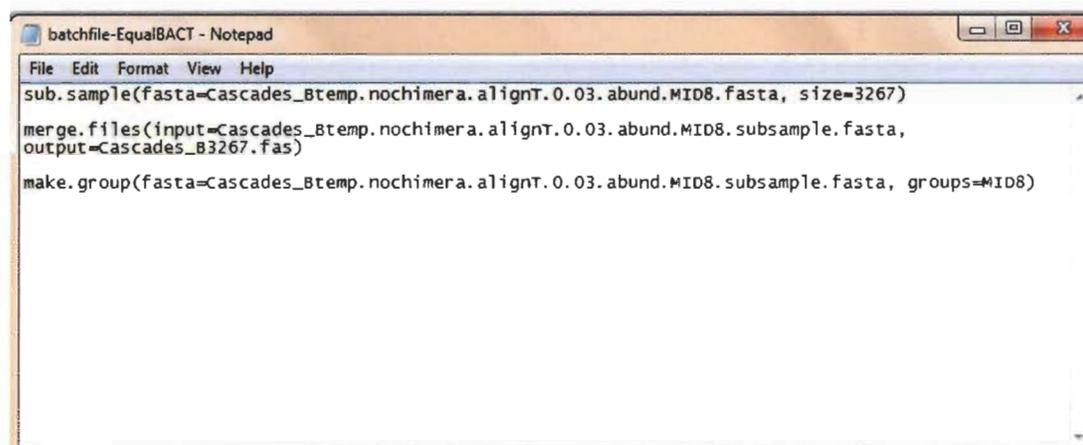
```

batchfile-SingletonsBACT - Notepad
File Edit Format View Help
unique.seqs(fasta=Cascades_Btemp.nochimera.alignT.fas)
dist.seqs(fasta=Cascades_Btemp.nochimera.alignT.unique.fas, cutoff=0.03, processors=8)
hcluster(column=Cascades_Btemp.nochimera.alignT.unique.dist,
name=Cascades_Btemp.nochimera.alignT.names, cutoff=0.03, method=furthest)
split.abund(fasta=Cascades_Btemp.nochimera.alignT.fas,
list=Cascades_Btemp.nochimera.alignT.unique.fn.list, cutoff=1, label=0.03, accnos=true)
get.seqs(accnos=Cascades_Btemp.nochimera.alignT.unique.fn.0.03.abund.accnos,
group=Cascades_Btemp.nochimera.groups)
split.groups(fasta=Cascades_Btemp.nochimera.alignT.0.03.abund.fasta,
group=Cascades_Btemp.nochimera.pick.groups)

```

Figure A.8 Fichier-lot comportant le script pour l'élimination des singletons.

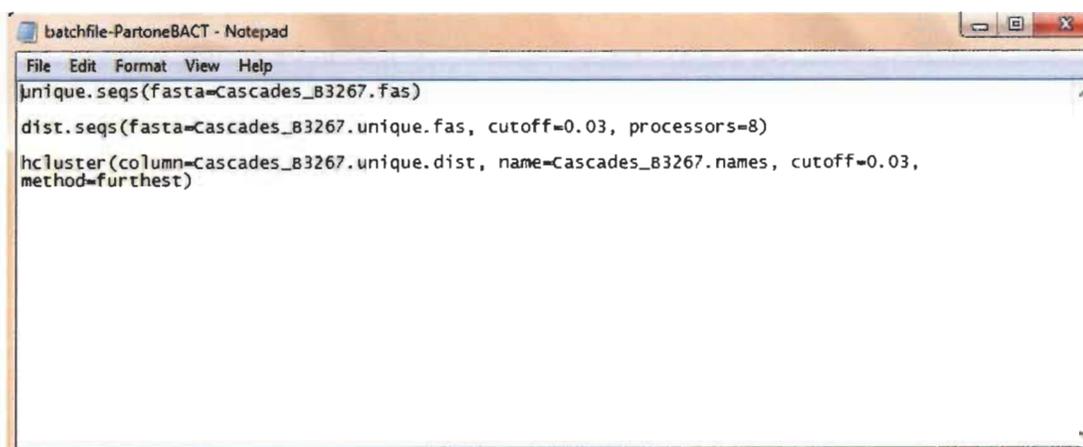
La dernière étape d'optimisation des séquences est une égalisation et se fait elle aussi sur le super-ordinateur. La Figure A.9 montre le fichier-lot, qui doit inclure la quantité de séquences ($size=3267$).



```
batchfile-EqualBACT - Notepad
File Edit Format View Help
sub.sample(fasta=Cascades_Btemp.nochimera.align.0.03.abund.MID8.fasta, size=3267)
merge.files(input=Cascades_Btemp.nochimera.align.0.03.abund.MID8.subsample.fasta,
output=Cascades_B3267.fas)
make.group(fasta=Cascades_Btemp.nochimera.align.0.03.abund.MID8.subsample.fasta, groups=MID8)
```

Figure A.9 Fichier-lot contenant le script pour l'égalisation finale des séquences.

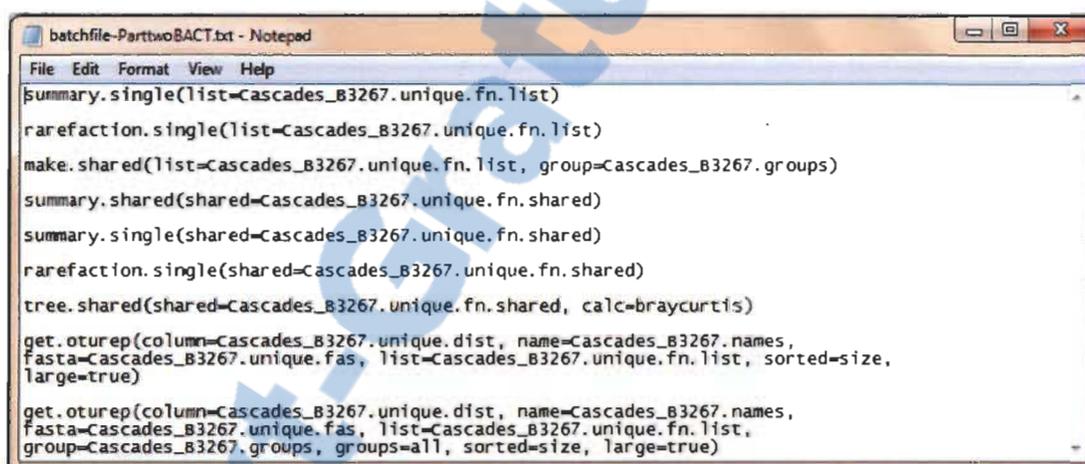
Une fois les étapes d'optimisation des séquences terminées, ces dernières peuvent être classifiées en OTUs. Cette classification se fait sur le super-ordinateur et avec le fichier-lot de la Figure A.10.



```
batchfile-PartoneBACT - Notepad
File Edit Format View Help
unique.seqs(fasta=Cascades_B3267.fas)
dist.seqs(fasta=Cascades_B3267.unique.fas, cutoff=0.03, processors=8)
hcluster(column=Cascades_B3267.unique.dist, name=Cascades_B3267.names, cutoff=0.03,
method=furthest)
```

Figure A.10 Fichier-lot contenant le script pour la classification des séquences en OTUs.

La génération de statistiques se fait également sur le super-ordinateur Colosse. Des commandes spécifiques sont requises pour créer un fichier contenant les indices de diversité et de richesse et un fichier contenant les informations pour la raréfaction (Figure A.11). Les résultats sont générés sous format Excel. La Figure A.12A représente les résultats de statistiques et la Figure A.12B montre les résultats de raréfaction. Une valeur statistique, l'uniformité (*evenness* en anglais), doit être calculée à partir de l'indice de diversité Shannon et du nombre d'OTUs. La courbe de raréfaction est créée à partir de la première colonne, qui représente les séquences, et de la colonne 0.03, qui représente le nombre d'OTUs classifiés à un niveau de similarité de 97%.



```

batchfile-ParttwoBACT.txt - Notepad
File Edit Format View Help
summary.single(list=Cascades_B3267.unique.fn.list)
rarefaction.single(list=Cascades_B3267.unique.fn.list)
make.shared(list=Cascades_B3267.unique.fn.list, group=Cascades_B3267.groups)
summary.shared(shared=Cascades_B3267.unique.fn.shared)
summary.single(shared=Cascades_B3267.unique.fn.shared)
rarefaction.single(shared=Cascades_B3267.unique.fn.shared)
tree.shared(shared=Cascades_B3267.unique.fn.shared, calc=braycurtis)
get.oturep(column=Cascades_B3267.unique.dist, name=Cascades_B3267.names,
fasta=Cascades_B3267.unique.fas, list=Cascades_B3267.unique.fn.list, sorted=size,
large=true)
get.oturep(column=Cascades_B3267.unique.dist, name=Cascades_B3267.names,
fasta=Cascades_B3267.unique.fas, list=Cascades_B3267.unique.fn.list,
group=Cascades_B3267.groups, groups=all, sorted=size, large=true)

```

Figure A.11 Fichier-lot contenant le script pour générer les statistiques, dont les indices de diversité et de richesse.

Finalement, pour attribuer à chaque OTU sa taxonomie, il faut entrer manuellement une ligne de commande dans le logiciel Mothur (Figure A.13). Les résultats sont une fois encore sous format Excel (Figure A.14). La colonne représentant la taxonomie et la colonne représentant le nombre d'OTUs sont celles qui servent à créer des graphiques.

A

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
2	label	group	subs	chao	chao_1ci	chao_1hi	ace	ace_1ci	ace_1hi	jackknife	jackknife	jackknife	shannon	shannon	shannon	ngshanno	simpson	simpson	simpson
3	unique	MID8	2062	3875.533	5300.752	6487.97	9485.934	8096.901	10125.74	9910.929	8279.799	11542.07	7.383397	7.330089	7.406125	7.914158	0.000678	0.000594	0.000762
4	0.01	MID8	662	917.2333	845.8884	1216.261	952.899	888.8335	1037.86	1049.16	968.2448	1130.176	3.852939	5.812342	5.892536	5.890356	0.004544	0.0042	0.004888
5	0.02	MID8	256	296.4483	278.0542	335.1837	315.6236	293.0109	352.0585	325	302.9752	348.6248	4.405089	4.359631	4.405047	4.485625	0.020598	0.019532	0.021865
6	0.05	MID8	117	117	117	0	117.9419	117.0294	121.1189	0	0	0	3.411225	3.362516	3.459932	3.444193	0.06171	0.057979	0.065447
7																			
8																			
9																			
10																			
11																			
12																			
13																			

B

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
2	numsamples	unique	lc	hc	0.01	lc	hc	0.02	lc	hc	0.05	lc	hc	0.1	lc	hc
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	100	97	99	100	93	75	90	32	44	60	23	27	40			
5	200	189	182	194	163	133	155	77	68	86	48	39	54			
6	300	276	266	285	235	179	205	94	84	106	56	48	64			
7	400	359	347	371	292	237	247	109	98	121	63	55	72			
8	500	440	426	453	296	250	281	121	110	133	89	61	78			
9	600	517	501	532	296	279	312	132	121	144	75	67	81			
10	700	592	576	610	323	303	339	143	130	154	79	71	88			
11	800	665	647	684	347	330	365	152	140	163	81	76	91			
12	900	736	717	755	376	352	384	159	147	171	87	79	95			
13	1000	805	785	816	390	373	409	167	155	178	90	82	98			
14	1100	872	852	895	410	391	428	174	162	185	93	85	101			
15	1200	936	914	962	428	412	465	180	169	192	96	89	105			
16	1300	1003	979	1027	445	427	463	188	174	197	98	91	105			
17	1400	1066	1040	1092	462	444	498	192	180	202	101	94	107			
18	1500	1127	1102	1153	477	453	493	193	183	207	103	96	109			
19	1600	1188	1163	1214	491	471	508	202	190	212	104	98	110			
20	1700	1247	1221	1274	505	488	522	207	196	216	106	100	111			
21	1800	1305	1279	1333	518	502	535	211	202	220	107	102	112			
22	1900	1363	1336	1388	530	514	547	215	205	225	109	103	113			
23	2000	1419	1393	1444	542	526	557	219	209	228	110	105	114			
24	2100	1474	1450	1496	554	537	569	223	214	232	111	106	115			
25	2200	1529	1504	1551	565	549	580	227	218	235	112	108	116			
26	2300	1582	1557	1606	576	560	590	231	221	238	113	109	116			
27	2400	1635	1613	1658	588	571	600	234	225	241	114	110	117			
28	2500	1687	1664	1709	596	581	609	237	228	244	115	111	117			
29	2600	1738	1717	1756	603	592	618	240	232	246	115	112	117			
30	2700	1788	1768	1809	615	603	627	242	235	248	116	113	117			
31	2800	1839	1821	1857	624	613	635	245	238	251	116	113	117			

Figure A.12 Fichiers Excel contenant les statistiques du lot de séquences générées par pyroséquençage. A) Statistiques pour les indices de diversité et de richesse. B) Statistiques pour la raréfaction.

```

Department of Microbiology & Immunology
University of Michigan
pschloss@umich.edu
http://www.nothur.org

When using, please cite:
Schloss, P.D., et al., Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2009. 75(23):7537-41.

Distributed under the GNU General Public License

Type 'help()' for information on the commands that are available
Type 'quit()' to exit program

mothur > classify_seqs(fasta=Cascades_B3267.unique.fn.0.03.MID8_rep.fasta, template=CLJ-GG97.bacteria.U6-U8.438bp.may2012.fas, taxonomy=CLJ-GG97.bacteria.may2012.tax, cutoff=50)_

```

Figure A.13 Ligne de commande utilisée dans le logiciel Mothur pour identifier taxonomiquement les OTUs.

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
2	taxlevel	rankid	zooon	daughterlevel	total											
3	0.0.		Root	1	157											
4	1.0.1		Bacteria	3	117											
5	2.0.1.27		Firmicutes	1	138											
6	3.0.1.27.1		Bacilli	1	115											
7	4.0.1.27.1.1		Bacillales	3	116											
8	5.0.1.27.1.1.2		Bacillaceae	7	99											
9	6.0.1.27.1.1.2.7		Bacillus	0	92											
10	6.0.1.27.1.1.2.12		Gracilibacillus	0	1											
11	6.0.1.27.1.1.2.15		Halolactobacillus	0	1											
12	6.0.1.27.1.1.2.18		Natronobacillus	0	3											
13	6.0.1.27.1.1.2.19		Oceanobacillus	0	2											
14	6.0.1.27.1.1.2.23		Paenobacillus	0	1											
15	6.0.1.27.1.1.2.35		unclassified	0	10											
16	5.0.1.27.1.1.5		Paenibacillaceae	1	0											
17	6.0.1.27.1.1.5.5		Paenibacillus	6	0											
18	5.0.1.27.1.1.7		Planococcaceae	3	17											
19	6.0.1.27.1.1.7.5		Solibacillus	0	13											
20	6.0.1.27.1.1.7.11		Ureibacillus	0	1											
21	6.0.1.27.1.1.7.13		unclassified	0	3											
22	3.0.1.57		Proteobacteria	2	3											
23	3.0.1.57.1		Alphaproteobacteria	1	1											
24	4.0.1.57.1.5		Rhizobiales	1	1											
25	5.0.1.57.1.5.8		Methyllobacteriaceae	1	1											
26	6.0.1.57.1.5.8.2		Methyllobacterium	0	1											
27	3.0.1.57.2		Betaproteobacteria	1	2											
28	4.0.1.57.2.2		Burkholderiales	1	2											
29	5.0.1.57.2.2.5		Caulobacteraceae	1	2											
30	6.0.1.57.2.2.5.6		Moraxilla	0	2											

Figure A.14 Résultat de l'identification taxonomique des OTUs.

ANNEXE B

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES D'IDENTIFICATION DE FLORES BACTÉRIENNES DE BALLOTS DE PAPIER ET DE CARTON ANALYSÉES PAR PYROSÉQUENÇAGE

Les flores bactériennes ont été déterminées par pyroséquençage, en plus du ballot de carton, dans des ballots de papiers mélangés, comprenant différents cartons d'emballage alimentaire et du papier, ainsi que des ballots de papier journal. Comme les ballots peuvent être entreposés à l'extérieur pour une période allant jusqu'à un an, ils ont été analysés aux temps 0 et 1 an d'entreposage. Les séquences obtenues ont été regroupées en OTUs à un niveau de similarité de 97%, puis classifiées selon leur embranchement (Figure B.1). Tous les ballots dont les flores bactériennes ont été identifiées ont été comparés à l'aide de courbes de raréfaction (Figure B.2).

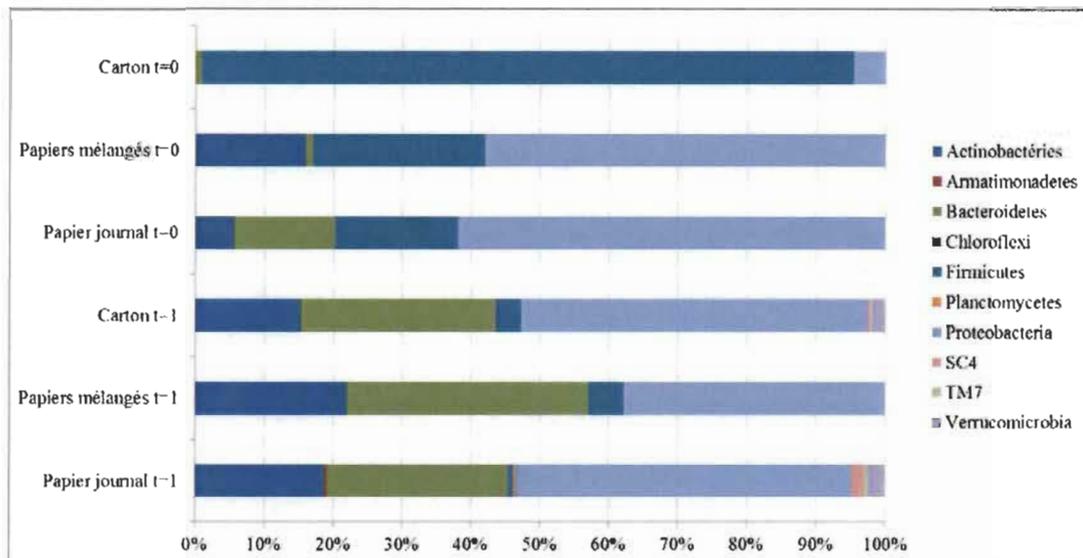


Figure B.1 Distribution des embranchements, à un niveau de similarité de 97%, des OTUs bactériens, obtenus par pyroséquençage, dans les ballots de carton, de papiers mélangés et de papier journal, aux temps 0 (t=0) et un an (t=1) d'entreposage extérieur.

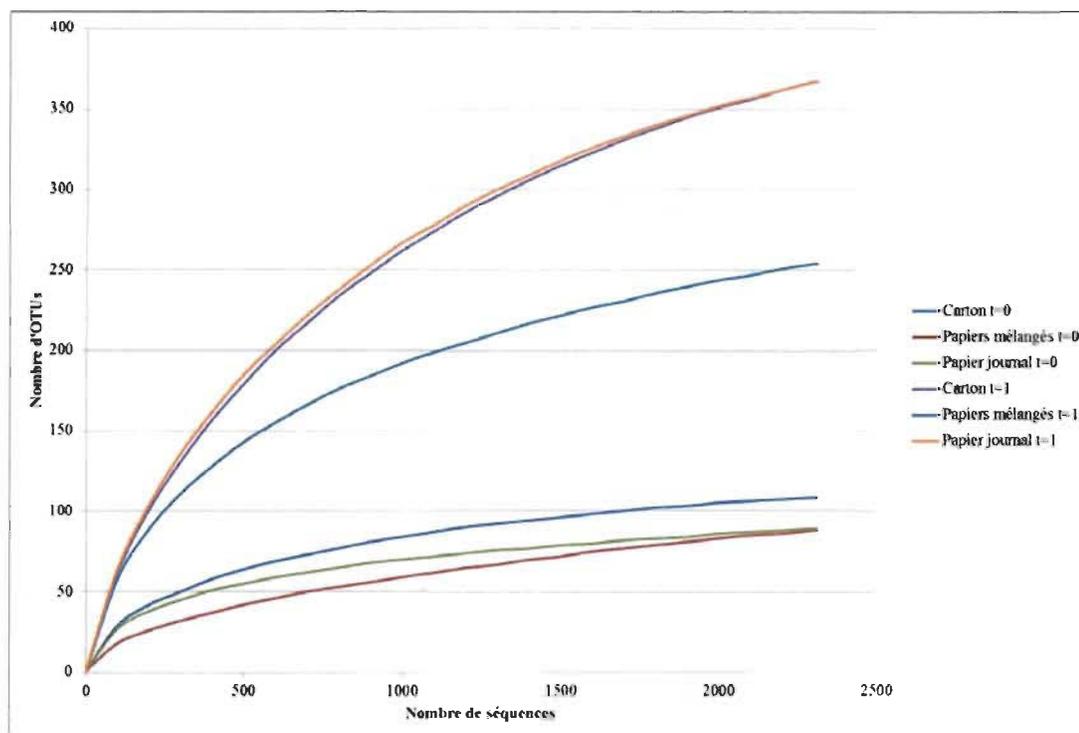


Figure B.2 Courbes de raréfaction des séquences bactériennes obtenues par pyroséquençage, à un niveau de similarité de 97%, pour les ballots de carton, de papiers mélangés et de papier journal, aux temps 0 ($t=0$) et un an ($t=1$) d'entreposage extérieur.