

Université de Montréal

**Étude de la flore microbienne et de la formation du
biofilm dans les systèmes de récolte de la sève d'érable**

par
Luc Lagacé

Département de pathologie et de microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Mai, 2006

© Luc Lagacé, 2006



SF
607
U54
2006
V.018

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude la flore microbienne et de la formation du biofilm dans les systèmes de récolte de la
sève d'érable

présentée par :

Luc Lagacé

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Serge Messier, président-rapporteur
Mario Jacques, directeur de recherche
Denis Roy, codirecteur
Daniel Perron, membre du jury
Jacques Goulet, examinateur externe
représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Les travaux présentés dans cette thèse concernent dans un premier temps, la composition de la communauté microbienne de la sève qui a été étudiée à l'aide de la technique ARDRA et du séquençage partiel de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S appliqués sur un grand nombre de souches bactériennes isolées de la sève à la sortie des entailles. Les résultats montrent l'évolution de la contamination microbienne en cours de saison ainsi que la grande diversité de la communauté microbienne de la sève avec 22 genres bactériens différents répertoriés ainsi que la dominance des bactéries du genre *Pseudomonas* et *Ralstonia*. La plus grande diversité a d'ailleurs été observée à la mi-saison avec une valeur d'indice de diversité de Shannon de 1,1.

Dans un deuxième temps, notre étude a porté sur la caractérisation du biofilm dans le système de collecte de la sève à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB), de dénombrements microbiens et de la technique PCR-DGGE appliqués à des échantillons de sève et de surfaces correspondantes. La formation du biofilm a été observée autant à la surface des collecteurs latéraux que principaux par la MEB. Par les profils de bandes obtenus sur gel DGGE, une plus grande diversité a été obtenue dans la communauté microbienne de la sève par rapport à celle du biofilm correspondant. Cette diversité avait également tendance à diminuer en fonction de l'avancement de la saison. De plus, 12 bandes majeures ont été révélées par l'analyse DGGE de l'ensemble des échantillons.

Après séquençage de ces bandes, la prédominance du genre *Pseudomonas* a été identifiée en plus de la présence du genre *Rahnella* et d'autres genres non-identifiés.

Finalement, la susceptibilité de *Pseudomonas marginalis* isolé du système de récolte de la sève envers quatre produits biocides a été évaluée selon deux modes de croissance (planctonique ou biofilm) et selon différentes conditions de températures et de temps d'incubation. La production du biofilm a été effectuée à partir de la sève d'érable à l'aide du système MBEC™. Ce système a permis de produire des biofilms hautement reproductibles pour toutes les conditions testées. Par ces essais, il a été démontré qu'une plus grande concentration en produit biocides (~50×) était nécessaire afin d'éliminer le biofilm par rapport à celle nécessaire à l'élimination de cellules planctoniques. Ceci démontre le niveau de résistance à la désinfection du biofilm de *P. marginalis* par rapport au mode de croissance planctonique. L'hypochlorite de sodium et l'acide peracétique ont montré une plus grande efficacité à éliminer le biofilm comparativement au peroxyde d'hydrogène et aux ammoniums quaternaires. Selon ces résultats, l'hypochlorite de sodium et l'acide peracétique seraient à privilégier pour l'assainissement du système de collecte de la sève.

Les résultats de ces travaux mettent l'accent sur le contrôle de la contamination microbienne et de la formation du biofilm et offrent les bases nécessaires au développement futur de moyens permettant l'optimisation de la qualité des produits acéricoles.

Mots-clés : ARDRA, bactéries, biocides, biofilm, DGGE, érable, MBEC, sève, sirop

ABSTRACT

This thesis first describes the composition of the microbial community of maple sap through the use of the ARDRA technique and partial sequencing of 16S rRNA genes on a high number of bacterial isolates obtained from maple sap samples coming out of the tapholes. Results show the growth of microbial populations during the season and the great diversity of the microbial community with 22 different bacterial genera encountered. Predominance of the *Pseudomonas* and *Ralstonia* genera was observed among these communities. The highest diversity was obtained at mid-season with a value of Shannon diversity index of 1.1.

Our study then characterized the formation of biofilm in the sap collection system by scanning electron microscopy (SEM), microbial counts and the PCR-DGGE technique applied to samples of sap and corresponding surfaces. Biofilm formation was observed on both lateral and main lines of the collection system by SEM. From DGGE banding patterns obtained, a higher bacterial community diversity was observed in sap compared to corresponding biofilm. Diversity profile of bacterial community also showed a decreasing trend as the season progressed. Furthermore, 12 major bands were observed after DGGE analysis. Sequencing of these bands revealed the predominance of the *Pseudomonas* genus in the sap and biofilm communities and also the presence of the *Rahnella* genus as well as other unidentified genera.

Finally, the susceptibility of planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas marginalis* isolated from the sap collection system to 4 commonly used biocides was evaluated under

different temperature and growth times conditions. Biofilm production was performed in maple sap using the MBEC™ device. This system was able to provide highly reproducible biofilms for each set of conditions tested. Results demonstrated that higher (~50×) concentrations of biocides were necessary to eliminate biofilms compared to those used to eliminate planktonic cells showing the high level of resistance of biofilm to biocide treatments. Sodium hypochlorite and peracetic acid were more efficient in eliminating biofilms compared to hydrogen peroxide and quaternary-ammonium based sanitizers. According to the results obtained, sodium hypochlorite and peracetic acid would be more appropriate for maple sap collection system sanitation.

The results of this work put the emphasis on controlling the microbial contamination and the biofilm formation and provide the basis to develop better production practices that will improve the overall quality of maple products in the future.

Keywords : ARDRA, bacteria, biocides, biofilm, DGGE, maple, MBEC, sap, syrup

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xvi
INTRODUCTION.....	1
RECENSION DE LITTÉRATURE.....	3
PORTRAIT DE L'INDUSTRIE ACÉRICOLE.....	3
La production de sirop d'érable.....	3
Les pays producteurs.....	4
Le Québec acéricole.....	5
L'exportation.....	6
Les techniques de production.....	6
La composition chimique et les propriétés de la sève et du sirop d'érable.....	10
La qualité des produits acéricoles.....	15
LA MICROFLORE DE LA SÈVE D'ÉRABLE.....	18
Contamination microbienne de l'entaille de l'érable.....	18
Contamination microbienne du système de collecte de la sève.....	20
Importance de la contamination microbienne sur la qualité.....	22
LE BIOFILM.....	22
Définition du biofilm.....	23
Modèle de développement du biofilm.....	24
Facteurs impliqués dans le développement du biofilm.....	26
Adhésion initiale.....	26
Adhésion, formation de micro-colonies et début de production d'EPS.....	28
Maturation du biofilm.....	30
Dispersion des cellules libres.....	32
La résistance des biofilms aux agents antimicrobiens.....	34

Le glycocalème	35
L'état physiologique des communautés microbiennes du biofilm.....	36
Facteur de réponse générale aux stress.....	37
Les pompes à efflux	37
Communication inter-cellulaire et résistance des biofilms	38
LES DESINFECTANTS ET L'ASSAINISSEMENT DU SYSTEME DE RECOLTE DE LA SEVE.....	39
But de la désinfection.....	39
Les principaux désinfectants et leur mode d'action.....	39
L'assainissement des systèmes de récolte de la sève d'érable	43
METHODOLOGIE.....	45
Techniques moléculaires utilisées pour l'identification des micro-organismes et l'étude des communautés microbiennes.....	45
La technique ARDRA	46
Techniques moléculaires culture-indépendantes.....	47
La technique T-RFLP.....	49
La technique DGGE	49
La technique FISH	51
Techniques utilisées en laboratoire pour la visualisation du biofilm.....	52
Méthodes utilisées pour la production in vitro du biofilm et l'évaluation du pouvoir antimicrobien.....	54
CHAPITRE I.....	57
PRÉFACE AU CHAPITRE I.....	58
ABSTRACT	59
INTRODUCTION.....	60
MATERIALS AND METHODS.....	62
RESULTS.....	68
DISCUSSION	79
ACKNOWLEDGMENTS.....	83

REFERENCES.....	84
CHAPITRE II	89
PREFACE AU CHAPITRE II	90
ABSTRACT	91
INTRODUCTION	93
MATERIALS AND METHODS	96
RESULTS	103
DISCUSSION	111
ACKNOWLEDGEMENTS	114
REFERENCES.....	115
CHAPITRE III	120
PREFACE AU CHAPITRE III.....	121
ABSTRACT.....	122
INTRODUCTION	123
MATERIALS AND METHODS.....	125
RESULTS AND DISCUSSION	129
ACKNOWLEDGMENTS	138
REFERENCES.....	139
DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS	145
CONCLUSION	153
RÉFÉRENCES.....	154
ANNEXE I.....	xviii
Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence	xviii
ANNEXE II.....	xxxvii
Microbiology of maple sap and biofilm formation in maple sap collection systems	xxxvii
ANNEXE III	lx
Évaluation en laboratoire à l'aide d'une méthode en micro-plaques de 96 puits, du potentiel de formation d'un biofilm d'une série de souches bactériennes isolées du système de récolte de la sève d'érable	lx

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. – Composition chimique de la sève d’érable (Dumont 1994, Morselli et Whalen 1996).....	10
Tableau II. – Composition organique et minérale du sirop d’érable.....	14
Tableau III. – Classes de couleur du sirop d’érable	17
Tableau IV. – Sommaire des facteurs impliqués dans le développement du biofilm	34
Tableau V. – Interactions entre les désinfectants et les cellules microbiennes.....	42
Tableau VI. – Liste de techniques génétiques utilisées dans l’étude des communautés microbiennes	46
Tableau VII. – Liste des principaux systèmes utilisés en laboratoire pour la production de biofilms.....	55

CHAPITRE I

Table 1. – List of reference strains and accession numbers used for the ARDRA method development.	70
Table 2. – List of bacterial isolates obtained in this study representing each ARDRA group and their closest affiliation according to the V1, V2 and V6 hypervariable regions (8) partial sequencing (525 bp) of 16S rRNA gene.	74
Table 3. – Maple taphole bacterial isolates distribution according to ARDRA groups, restriction patterns and the evolution of the season as determined by the cumulative sap flow percentage.....	77

CHAPITRE II

Table 1. – Characteristics of the 2002 and 2003 sap flow seasons.	104
Table 2. – Identity of major bands obtained from DGGE analysis of the bacterial community of maple sap and biofilm specimens as determined by the closest relative obtained from Blast comparison.	109

CHAPITRE III

Table 1. – List of biocides and range of concentration tested..... 133

Table 2. – Biocide susceptibility (30 min challenge) of *P. marginalis* PTB2093 as a planktonic population (MBC) and a biofilm population (MBEC) evaluated by the MBEC™ system with 24 and 48 hours of incubation at 15 and 30°C in maple sap as growth medium 135

LISTE DES FIGURES

Figure 1. – Production acéricole nord-américaine de 1995 à 2004.....	4
Figure 2. Représentation schématisée du système de récolte sous vide de la sève et de sa transformation en sirop d'érable	9
Figure 3. – Inversion du saccharose en glucose et fructose par l'enzyme invertase (isomères les plus stables présentés).....	12
Figure 4. – Schéma représentant le processus de développement du biofilm.....	25
Figure 5. – Le système de communication inter-cellulaire (<i>quorum sensing</i>) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilisé afin de réguler une grande variété de gènes.....	32
Figure 6. – Illustration des techniques ARDRA et DGGE utilisées pour caractériser les micro-organismes et les communautés microbiennes.....	52
Figure 7. – Schéma du système MBEC™ utilisé pour évaluer simultanément le pouvoir antimicrobien de plusieurs produits à de multiples concentrations sur des biofilms...	56

CHAPITRE I

Figure 1. – Change in the contaminating bacterial population of the sap obtained from maple tree tapholes during the 2001 and 2002 seasons.	69
Figure 2. – Agarose gel-generated ARDRA dendrogram illustrating the relationship (similarity %) between different reference bacterial strains obtained from ATCC that were used for the ARDRA method development.....	71
Figure 3. – Dendrogram of maple sap bacterial isolates representing each ARDRA groups.	72
Figure 4. – Phylogenetic tree of 48 maple sap bacterial isolates based on 16S rRNA gene partial sequences.	75
Figure 5. – Change in the maple taphole bacterial composition over the sap flow season..	78

CHAPITRE II

- Figure 1. – Growth of total mesophilic aerobic, anaerobic, psychotrophic and *Pseudomonas* microflora in main (○) or lateral (●) collection lines or in biofilms on the inner surfaces of main (▽) or lateral (▼) line tubing during the 2002 and 2003 seasons. . 103
- Figure 2. – SEM micrographs of maple sap collection tubing inner surfaces..... 104
- Figure 3. – Negative images of parallel DGGE gels of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments showing fingerprints for biofilm and maple sap microflora obtained during periods of 25, 50, 75 or 100 % sap flow during the 2002 and 2003 seasons. 106
- Figure 4. – Dendrogram derived from DGGE analysis of the microflora on the basis of Dice's coefficient of similarity using the clustering algorithm of Ward..... 107
- Figure 5. – Shannon-Weaver index of diversity (H) calculated from DGGE analysis of the microflora of maple sap (●) or biofilm (○). 108
- Figure 6. – Relationships of partial 16S rRNA gene sequences derived from predominant DGGE bands of maple sap and biofilm to those of isolated maple sap bacteria obtained in a previous study (23)..... 110

CHAPITRE III

- Figure 1. –Biofilm formation of *P. marginalis* PTB2093 on the pegs of the MBEC™ system in maple sap after 24 and 48 h at 15°C and 30°C. Error bars are standard deviations of five independent determinations..... 129
- Figure 2. – Scanning electron micrographs of biofilms formed by *P. marginalis* PTB2093 on the pegs of the MBEC™ system in maple sap after incubation for 24 h at 15°C (A), 48 h at 15°C (B), 24 h at 30°C (C), and 48 h at 30°C (D). Bars correspond to 10 µM 130

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ARDRA	Analyse des profils de restriction de l'ADN ribosomal amplifié ou <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
Aw	Activité de l'eau ou <i>Water activity</i>
CRC	Contrôle de la répression catabolique ou <i>Catabolic repression control</i>
DGGE	Électrophorèse sur gel en gradient de dénaturant ou <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
EDTA	Acide éthylènediamine-tétracétique ou <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPS	Substance polymère extracellulaire ou <i>Extracellular polymeric substance</i>
FISH	Hybridation in situ en fluorescence ou <i>fluorescence in situ hybridization</i>
GFP	Protéine fluorescente verte ou <i>Green fluoescent protein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MEB	Microscopie électronique à balayage
MBC	Concentration minimale bactéricide ou <i>Minimal bactericidal concentration</i>
MBEC	Concentration minimale d'éradication du biofilm ou <i>Minimal biofilm eradication concentration</i>
MIC	Concentration minimale inhibitrice ou <i>Minimal inhibitory concentration</i>
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase ou <i>Polymerase chain reaction</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
SCLM	Microscope confocal à balayage au laser ou <i>Scanning confocal laser microscope</i>
T-RFLP	Polymorphisme de fragments de restriction terminaux ou <i>Terminal-restriction fragment length polymorphism</i>
VNC	Viable mais et non cultivable ou <i>viable but non-culturable</i>

À Carole

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail a été rendu possible grâce au soutien et à la coopération d'un grand nombre de personnes. Des remerciements sincères vont en tout premier lieu au Dr Mario Jacques pour avoir fait preuve d'une grande ouverture et avoir accepté de diriger mes travaux. Ce fut spécialement très agréable d'être supervisé par une personne telle que Mario qui sait partager ses connaissances scientifiques et fournir de judicieux conseils.

J'offre également mes plus sincères remerciements à mon co-directeur, le Dr Denis Roy, pour avoir cru en mes capacités et avoir su éveiller mon intérêt pour la biologie moléculaire. Je le remercie aussi pour son dévouement et pour nos échanges qui ont grandement contribué à développer mon esprit scientifique.

Des remerciements vont également aux membres du comité conseil de ma thèse, Dr Linda Saucier et Dr Robert Higgins, pour leurs encouragements et leurs conseils apportés tout au long de mes études.

Un grand merci va aussi au conseil d'administration et au personnel du centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole inc. (Centre ACER), plus particulièrement à M. Maurice Giguère et au Dr. Patricia Ramacieri (directrice), aux chercheurs Dr. Nathalie Martin et M. Gaston Allard, au personnel technique Mme Carmen Charron, Mme Mélissa Cournoyer, M. Réjean Gaudy, M. René Desruisseaux, M. Julien

Lavoie et M. Michel Cartier, ainsi qu'à Mme Lyne Richer. Ces personnes ont été d'un immense support pour la réalisation de mes travaux et je leur en suis très reconnaissant.

Je désire également remercier certains membres du personnel du centre de recherche et de développement des aliments (CRDA) d'Agriculture Canada, Dr. Akier Assanta Maf, Mme Mélanie Pitre, M. Pierre Ward et M. Stéphane Sirois, pour leur aide et leur coopération.

Finalement, je ne voudrais pas oublier de souligner le soutien et l'encouragement apportés par ma conjointe Carole qui a été une source de motivation certaine et sans qui ce travail aurait été impossible. À mon fils Thomas, je dis merci pour avoir été là et avoir su si bien, inconsciemment peut-être, me faire oublier les moments difficiles. Je remercie également ma mère, ma famille et mes amis qui par leurs encouragements et leurs attentions, ont su me donner l'énergie nécessaire pour rencontrer mes objectifs. Une pensée va également à mon père qui j'en suis sûr, veille sur moi de là-haut.

INTRODUCTION

La croissance et l'activité des micro-organismes influencent notre vie autant de façon positive que négative. Depuis longtemps, nous tentons de combattre les micro-organismes néfastes et utilisons ceux qui présentent des caractéristiques désirables. De nos jours, à travers le monde, de grandes quantités d'antibiotiques, de désinfectants et d'agents de conservation sont utilisés afin d'éliminer ou contrôler la croissance microbienne. Cette approche est relativement efficace afin de contrôler la croissance des micro-organismes en suspension dans un liquide. Cette façon traditionnelle de cultiver les micro-organismes fait ressortir la perception que les bactéries vivent en tant qu'organismes unicellulaires. Cependant, après une observation détaillée de multiples écosystèmes naturels et les avancées récentes en microbiologie, il est devenu évident que dans la nature, l'activité microbienne est majoritairement associée aux surfaces. Il apparaît maintenant que la capacité à former un consortium coopératif et structuré de micro-organismes associés à une surface (biofilm) est une des caractéristiques les plus remarquables de ceux-ci. Cette nouvelle façon de voir la contamination microbienne en tant que communauté organisée et dynamique, implique de reconsidérer les stratégies traditionnellement utilisées pour contrevenir aux effets néfastes du développement de ces communautés microbiennes.

Avec la mondialisation des marchés et l'évolution de l'industrie alimentaire, la production des aliments requiert des contrôles de plus en plus stricts et des normes de qualité et de salubrité de plus en plus sévères. Il devient alors impératif d'adopter des procédures bien adaptées afin de réduire les risques associés à la prolifération microbienne. Le développement des techniques et des connaissances sur la formation du biofilm peut

d'ores et déjà bénéficier à l'industrie alimentaire qui doit approfondir les connaissances sur la formation de biofilms sur la surface des matériaux venant en contact avec les aliments. L'industrie acéricole n'échappe pas à cette règle puisqu'elle est soumise au même courant de développement et devra répondre aux mêmes exigences de qualité et de salubrité de la part des marchés intérieurs et extérieurs.

Hypothèse:

La sève d'érable contient une flore microbienne diversifiée capable de former un biofilm à l'intérieur du système de récolte qui va contribuer à la résistance des micro-organismes aux stress de la désinfection chimique.

Objectifs spécifiques:

1. Étudier la composition de la communauté microbienne de la sève d'érable au cours de la saison de coulée printanière
2. Étudier la formation du biofilm à l'intérieur du système de collecte de la sève d'érable et identifier les principales espèces microbiennes responsables
3. Évaluer l'importance de la formation du biofilm sur le pouvoir antimicrobien de produits chimiques de désinfection potentiellement utilisables en acériculture

RECENSION DE LITTERATURE

PORTRAIT DE L'INDUSTRIE ACERICOLE

La production de sirop d'érable

Le sirop d'érable est défini comme étant le produit obtenu par la concentration de la sève d'érable provenant exclusivement des arbres du genre botanique *Acer* (Anonyme 1998). Il est le principal produit issu de l'exploitation acéricole nord-américaine. Sa production commerciale se limite géographiquement aux régions du nord-est des Etats-Unis et du sud-est du Canada. La principale raison est que l'érable à sucre (*Acer saccharum*), l'espèce par excellence pour la production acéricole, est particulièrement abondant dans ces régions. A une échelle moindre, d'autres espèces telles que l'érable noir (*Acer nigrum*) et l'érable rouge (*Acer rubrum*) sont également utilisées pour la production acéricole (Heiligmann et Winch 1996). La production de sirop d'érable se limite également dans le temps à la période comprise entre la mi-février et la fin avril qui marque l'arrivée du printemps. Ceci découle du fait que le phénomène de la coulée de la sève fait intervenir un cycle de gel et de dégel associé à l'alternance entre la nuit et le jour. Ces conditions climatiques particulières s'observent dans les principales régions acéricoles à cette période de l'année (Heiligmann *et al.* 1996).

Les pays producteurs

Le Canada et les Etats-Unis sont les deux seuls pays producteurs de sirop d'érable dans le monde. En 2004, la production mondiale de sirop d'érable a été estimée à 49 332 tonnes métriques (Fédération des producteurs acéricole du Québec 2005). Pour cette période, le Canada a été responsable de 85 % de la production mondiale. Le Canada est donc le plus important producteur de sirop d'érable avec, en 2004, une production de 41 647 tonnes métriques pour une valeur se chiffrant à 206,2 millions de dollars CAN. La production acéricole canadienne a d'ailleurs presque doublée au cours des 10 dernières années (Fig. 1).

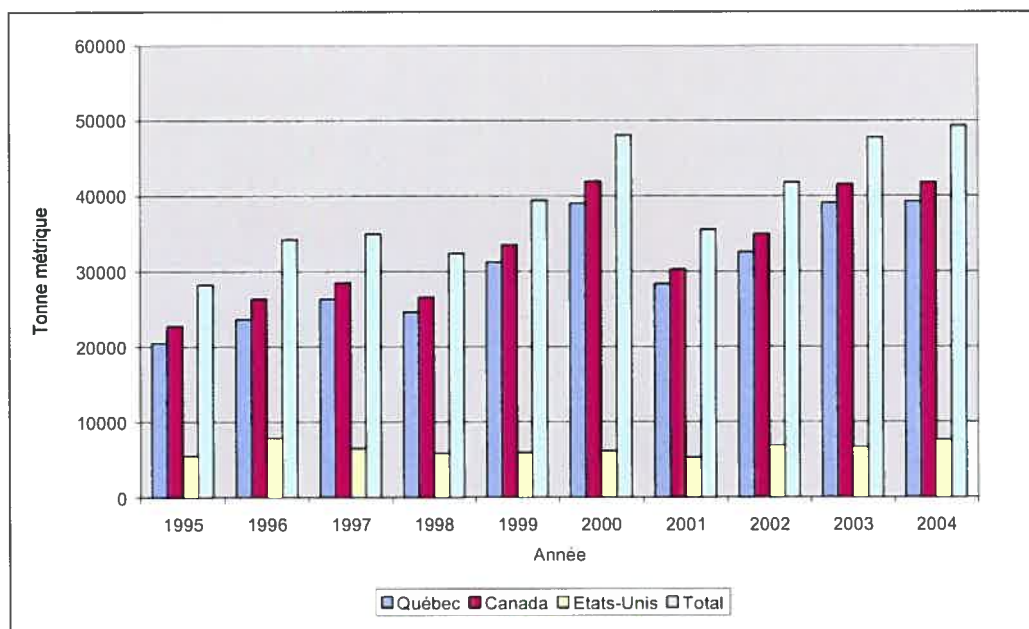


Figure 1. – Production acéricole nord-américaine de 1995 à 2004

Au Canada, on recense actuellement environ 10 000 exploitations acéricoles produisant sur une base commerciale, ce qui constitue une baisse d'environ 15% par rapport au début des années 80 (Anonyme 2005). Sur cette même période par contre, le nombre moyen d'entailles par exploitation a plus que doublé. La mise en exploitation de nouvelles entailles sur les terres publiques et privées, l'augmentation de la productivité des entreprises par la modernisation des équipements et l'amélioration des connaissances techniques des producteurs sont les facteurs responsables d'une expansion considérable de la production. Les provinces de Québec, de l'Ontario, du Nouveau-Brunswick et de la Nouvelle-Écosse sont les principales provinces productrices de sirop d'érable au Canada.

Le Québec acéricole

Le Québec est de loin la province productrice la plus importante au Canada avec 79 % de la production mondiale en 2004 (Anonyme 2005). La majeure partie de sa production se concentre dans le Centre et dans l'Est de la province. La région Chaudière-Appalaches fournit environ 39 % de la production québécoise, alors que le Bas-Saint-Laurent et l'Estrie fournissent respectivement 18 et 15 %. On estime également qu'environ 51 % des érablières du Québec comptent 3 000 entailles ou moins, 12 % en comptent 10 000 ou plus et seulement 1 % auraient plus de 30 000 entailles. Le nombre d'entailles de la province s'établit à environ 37,6 millions et c'est la région du Bas-Saint-Laurent qui revendique le plus grand nombre d'entailles par exploitation (Anonyme 2005).

L'exportation

Le Canada est le premier pays exportateur de produits d'érable au monde devant les Etats-Unis, avec des ventes dans plus de 45 pays. En 2004, le volume des exportations canadiennes a atteint un record de 31 084 tonnes métriques de sirop d'érable pour une valeur totale des exportations dépassant 154 millions de dollars. Au Canada, c'est le Québec qui a été le plus important exportateur de produits d'érable avec 93 % des ventes canadiennes totales à l'étranger en 2004. Les 9 principaux pays importateurs de produits acéricoles en 2004 ont été les Etats-Unis suivi du Japon, de l'Allemagne, du Royaume-Uni, de la France, de l'Australie, des Pays-Bas, du Danemark et de la Suisse.

Les techniques de production

Le procédé de fabrication de sirop d'érable demeure relativement simple même si les techniques de récoltes et de transformation se sont modernisées au cours des années. Il s'agit de pratiquer une entaille dans un érable et d'y recueillir la sève qui s'en échappe et de la concentrer par évaporation. Le nombre d'entailles qui peuvent être appliquées à un érable varie selon le diamètre de l'arbre bien que généralement, on pratique entre deux et quatre entailles par arbre. Un arbre bien entaillé donnera entre deux et cinq L de sève durant une bonne journée de coulée. Durant une saison de récolte entière d'une durée d'environ 6 semaines, un érable moyen aura produit entre 35 et 50 L de sève, qui une fois transformée permet d'obtenir entre 1 et 1,5 L de sirop. La méthode de récolte traditionnelle de la sève

consiste à recueillir la sève qui s'écoule des entailles dans des seaux et de transporter cette sève à la cabane pour la faire bouillir et la concentrer jusqu'à l'obtention du sirop d'érable. Cette façon de faire traditionnelle a petit-à-petit laissé la place à un mode de fabrication plus moderne. De nos jours, la très grande majorité du sirop d'érable produit est obtenue par une méthode de récolte et de transformation modernisée faisant intervenir l'utilisation d'un système de récolte de la sève par tubulure sous vide, d'un concentrateur par osmose inversée et d'un évaporateur au mazout muni de contrôles automatiques (Fig. 2).

Le système de récolte sous vide par réseaux de tubulure est devenu au cours des 20 dernières années, le mode de récolte privilégié de la sève d'érable. Il a remplacé pour la très grande majorité des acériculteurs, le mode de récolte traditionnel à l'aide de seaux. Le système moderne de récolte sous vide de la sève d'érable offre des avantages indéniables sur le plan de la productivité, des rendements en sève récoltée et de la facilité d'opération. Il deviendrait presque impossible de nos jours, d'opérer une érablière de façon rentable sans l'utilisation de ce système. L'utilisation de celui-ci a permis l'expansion de la production acéricole grâce à une exploitation de plus grandes étendues et par le fait même, d'accroître significativement la production saisonnière. Cette accroissement de la production a par la suite permis à l'industrie acéricole d'offrir ses produits sur une plus grande échelle et d'élargir ses marchés de distribution. Ce système a donc largement contribué à l'essor de l'industrie acéricole au cours des 2 dernières décennies.

Le système de récolte sous vide est généralement maintenu en place dans l'érablière pendant toute l'année. Il est composé premièrement d'un chalumeau qui est introduit dans l'entaille au moment de l'entaillage printanier (Fig. 2). Le chalumeau est relié au réseau de tubulure par un tuyau de faible longueur (diamètre interne de 8 mm et environ 50 cm de longueur) appelé la chute. La chute fait le lien entre le chalumeau et le collecteur latéral qui consiste en un tuyau de longueur intermédiaire (diamètre interne de 8 mm et environ 40 à 60 m de longueur) recueillant la sève provenant de quelques entailles (10 à 12) effectuées sur des arbres rapprochés les uns des autres (Allard et Belzile 2004). Le collecteur latéral est lui même branché à un collecteur principal d'une longueur et d'un diamètre plus important (diamètre interne de 19 à 32 mm et environ 1 km de longueur). Plusieurs collecteurs latéraux se déversent donc dans le collecteur principal qui achemine la sève dans un réservoir de transfert généralement localisé dans une station de pompage à un des points les plus bas de l'érablière. Ce système est maintenu sous vide durant la période du jour propice à la coulée (température supérieure à 0°C) et possède une pente (l'entaille étant le point le plus élevé du système) offrant ainsi un meilleur transit de la sève dans le système (Conseil des productions végétales du Québec 1994). La sève qui s'accumule dans le réservoir de transfert est ensuite pompée (ou transportée par camion) vers le bâtiment de transformation. Elle sera alors concentrée à l'aide d'un système d'osmose inversée jusqu'à une concentration se situant typiquement entre 6 et 14 °Brix (Allard et Belzile 2004). Le concentré d'osmose sera alors entreposé dans un réservoir qui servira à alimenter l'évaporateur de façon continue. C'est dans l'évaporateur que la sève sera amenée par

évaporation à la concentration minimale désirée pour le sirop (66°Brix) et que la cuisson sera réalisée afin de développer la saveur et les arômes caractéristiques du sirop d'érable. Par la suite, le sirop sera filtré afin d'éliminer les impuretés ayant précipité durant l'évaporation avant d'être emballé en grands contenants (barils) pour la vente en vrac ou en petits contenants pour la vente au détail.

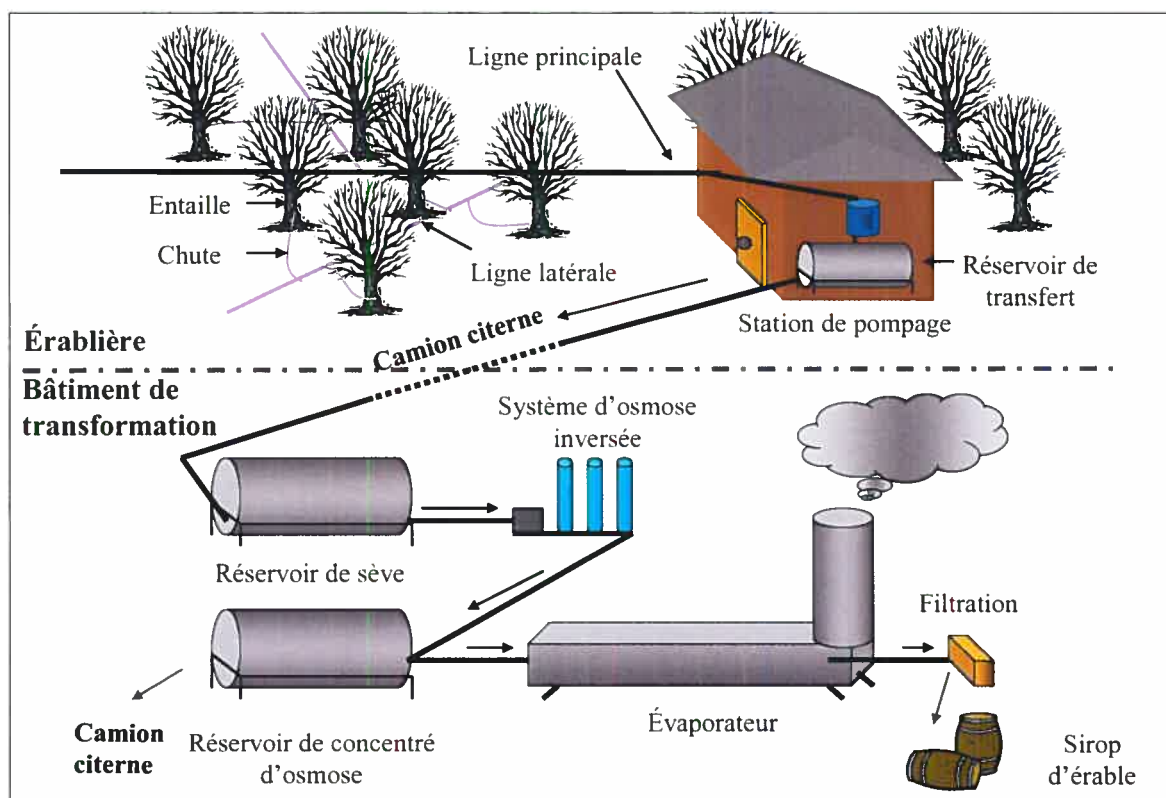


Figure 2. Représentation schématisée du système de récolte sous vide de la sève et de sa transformation en sirop d'érable

La composition chimique et les propriétés de la sève et du sirop d'érable

La sève qui est produite lors d'une journée de coulée est unique et va produire un sirop qui aura ses propriétés propres. De légères différences dans la composition chimique de la sève se traduiront par l'obtention d'un sirop qui aura une saveur et une couleur différentes. Le Tableau I présente la plage des valeurs des concentrations des principaux composés qui peuvent se retrouver dans la sève d'érable (Dumont 1994, Morselli et Whalen 1996). L'interaction entre ces composés lors de l'étape d'évaporation déterminera les propriétés du sirop d'érable qui sera produit.

Tableau I. – Composition chimique de la sève d'érable (Dumont 1994, Morselli et Whalen 1996)

Composés	Étendue des concentrations possibles (basées sur la concentration en solides totaux)
Solides totaux	1,00 – 5,40 %
Saccharose	98,00 – 99,99 %
Sucre inverti (glucose)	0,00 – 0,17 %
Composés phénoliques	0,00 – 4,55 ppm
Amines primaires	0,53 – 36,10 ppm
Peptides	0,40 – 18,57 ppm
Acides aminés (libres)	0,00 – 11,30 ppm
Protéines	0,00 – 50,90 ppm
Acides organiques	2,03 – 45,00 ppm

Le saccharose est le principal sucre de la sève : elle en contient plus de 98 % de son poids en extrait sec. Ceci laisse paraître que la sève n'est qu'une solution sucrée. Cependant, si c'était le cas, cette solution ne pourrait pas soutenir la vie de l'arbre. Ce sont les composés présents en proportion de moins de 2 % (acides aminés, acides organiques,

composés phénoliques, hormones, minéraux, etc.) qui font de la sève un fluide physiologique et qui permet d'initier la croissance à l'intérieur de l'arbre (Morselli et Whalen 1996). Cette fraction minoritaire de composés va également jouer un rôle important durant l'étape d'évaporation sur la saveur et les propriétés du sirop d'érable.

La composition et les propriétés de la sève varient en fonction des conditions climatiques, de l'état d'avancement de la saison et de la contamination microbienne (Morselli et Whalen 1996). La sève d'érable a un pH qui se situe généralement au voisinage de la neutralité. Cependant, si des micro-organismes contaminent la sève, elle aura tendance à s'acidifier pour donner des valeurs de pH aussi basses que 4,0 (Morselli et Whalen 1996). Une acidification de la sève produira un sirop qui aura des caractéristiques particulières avec dans la plupart des cas un défaut de goût. De plus, la sève d'érable ne contient normalement pas de sucres invertis. Cependant, certains micro-organismes qui contaminent la sève ont la possibilité d'hydrolyser le saccharose (sucre non réducteur) et de libérer les sous-unités glucose et fructose (sucres invertis et réducteurs) par le biais d'une enzyme appelée invertase (Fig. 3). De cette manière, des sucres invertis s'accumuleront dans la sève et pourront réagir dans les étapes subséquentes d'évaporation. Les sèves inverties sont particulièrement sensibles à la caramélisation, une réaction chimique de dégradation qui s'opère lorsqu'on chauffe une solution de sucres et qui donne une coloration intense et un goût âcre à la solution (Naghski et Willits 1957). De plus, la présence de sucres invertis dans la sève favorisera une autre réaction de brunissement non enzymatique appelée la réaction de Maillard. Cette réaction fait intervenir la portion

réductrice d'un sucre réducteur (inverti) et la portion aminée libre d'un acide aminé. Au cours de cette réaction, il y aura réarrangement moléculaire et production de pigments (Danehy 1986). La réaction de Maillard occasionnera alors elle aussi une intensification de la couleur du sirop. La sève d'érable contiendrait aussi un autre type de monosaccharide, le québrachitol (1-*O*-methyl-L-inositol). Ce polyol cyclique a été identifié par Stinson *et al.* (1967) et serait selon ces auteurs, le principal monosaccharide retrouvé dans la sève en début de saison alors que la contamination microbienne et la concentration en sucres invertis sont généralement faibles.

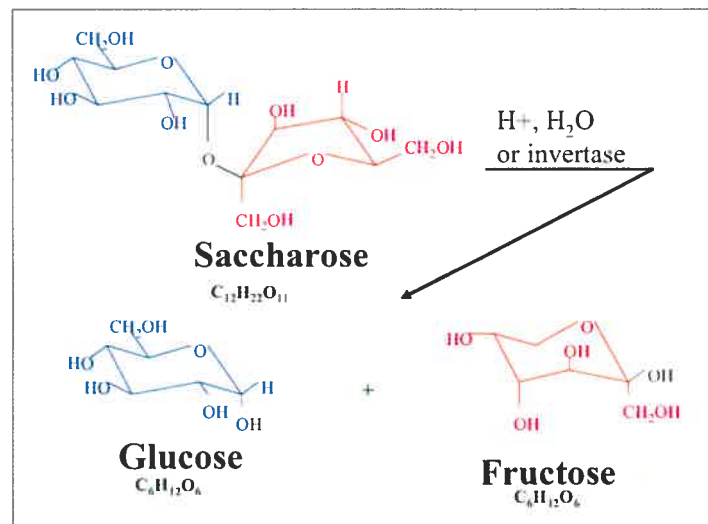


Figure 3. – Inversion du saccharose en glucose et fructose par l'enzyme invertase (isomères les plus stables présentés)

La sève d'érable peut également contenir des acides aminés. Les acides aminés sont présents dans la sève à l'état de trace en cours de saison et vont augmenter en concentration à l'approche de la fin de la saison. Le réchauffement de la température en fin de saison crée

des changements métaboliques au niveau des cellules de l'arbre et une augmentation des acides aminés dans la sève (Morselli et Whalen 1996). L'augmentation de la concentration en acides aminés dans la sève occasionne des mauvais goûts dans le sirop d'érable qui font partie des défauts majeurs que l'on peut y rencontrer.

Les composés phénoliques font aussi partie de la composition de la sève d'érable. Kermasha *et al.* (1995) en ont répertorié une liste dont les principaux sont l'acide sinapinique, l'acide *p*-coumarique, la syringaldéhyde, la coniféraldéhyde, la vanilline, l'acide vanillique et l'acide homovanillique. Ces composés sont pour la plupart issus de la dégradation de la lignine et seraient liés à l'état de santé de l'arbre (Morselli et Whalen 1996). Ces composés sont généralement reconnus pour avoir des propriétés nutritionnelles intéressantes (pouvoir anti-oxydant) et sont une source potentielle de valorisation des produits de l'érable qui servira dans le futur à démarquer les produits acéricoles des autres produits concurrents.

En résumé, le sirop d'érable est un produit naturel et par conséquent, possède une composition qui varie en fonction de différents paramètres génétiques, environnementaux et technologiques. La composition de la sève aura cependant un impact majeur sur la composition et les propriétés du sirop d'érable. De plus, le procédé d'évaporation qui élimine une grande partie de l'eau, concentre les constituants de la sève jusqu'à plus de 40 fois et influence la qualité du sirop de façon non négligeable. Le Tableau II fait état des principaux composés qui sont retrouvés dans le sirop d'érable. Selon la réglementation

provinciale, le sirop d'érable doit avoir une concentration minimale en extraits secs solubles de 66°Brix déterminée au réfractomètre à 20°C (Anonyme 1998).

Tableau II. – Composition organique et minérale du sirop d'érable

Composés	Concentrations	
^a Sucres (% ou g/100g de sirop)	Saccharose	51,7 – 75,6
	Glucose	0,0 – 9,6
	Fructose	0,0 – 4,0
	Autres sucres	Traces
^b Acides organiques (% ou g/100g de sirop)	Malique	0,141
	Citrique	0,015
	Succinique	0,012
	Fumarique	0,006
	Non identifié	Traces
^c Composés phénoliques (ng/mL)	Acide férulique	34,1
	Syringaldéhyde	28,5
	Vanilline	23,9
	Coniféraldéhyde	17,8
	Acide sinapinique	14,7
	Acide syringique	14,3
	Acide homovanillique	13,2
	Acide <i>p</i> -coumarique	10,8
	Acide vanillique	3,9
	Coniférylalcool	2,1
^d Acides aminés (µmole/g de sirop à 1°Brix)	Cystathionine	3,0680 – 20,2770
	Tyrosine	0,2235 – 2,8840
	Arginine	0,4840 – 1,0530
	Acide aspartique	0,2200 – 0,9495
^b Vitamines (mg/L)	Niacine	276
	Acide pantothénique	600
	Riboflavine	60
	Acide folique	Traces
	Pyridoxine	Traces
	Biotine	Traces
	A	Traces
^b Minéraux (ppm)	Potassium	1300–3900
	Calcium	400–2800
	Magnésium	12–360
	Manganèse	2–220
	Sodium	0–6
	Phosphore	79–183
	Fer	0–36
	Zinc	0–90
	Cuivre	0–2
	Étain	0–33
	Plomb	0–0,25

^aStuckel et Low 1996, ^bMorselli et Whalen 1996, ^cKermasha *et al.* 1994, ^dDumont et Beaupré 1994

Cette concentration se situe très près du taux de saturation de la solution et permet au sirop d'érable d'avoir une activité de l'eau (A_w) tout près de 0.85, ce qui constitue une barrière à la détérioration microbienne au cours de l'entreposage (Kissinger 1973, Whalen et Morselli 1984). Le sirop d'érable possède un pH qui peut varier entre 5,9 et 7,9 (Stuckel et Low 1996). Sa couleur pourra prendre différentes intensités dépendant de différents facteurs tels que la présence de précurseurs (sucres invertis, acides aminés) dans la sève et de l'intensité des traitements thermiques appliqués.

Sous l'influence du traitement thermique d'évaporation de la sève, les éléments dissous vont se concentrer et certains éléments minéraux vont précipiter pour former un sel. Ce sel, appelé « räche » ou « pierre de sucre », est composé principalement de malate de calcium et formera un dépôt dans l'évaporateur (Allard et Belzile 2004). Une partie du sel insolubilisé restera en suspension dans le sirop, obligeant ainsi le producteur à procéder à une filtration du sirop pour le rendre limpide (Fig. 2).

La qualité des produits acéricoles

La croissance de l'industrie acéricole québécoise a traditionnellement été assurée par le développement de la capacité de production et de la productivité des entreprises. Aujourd'hui, ayant atteint un niveau de production qui dépasse la demande, ce développement repose essentiellement sur la qualité et la conformité des produits offerts et aussi sur la valorisation potentielle des propriétés (nutraceutiques, anti-oxydants, etc.) des produits acéricoles par rapport aux produits concurrents (miel, sucre de table, etc.). Une

analyse du secteur acéricole québécois (Anonyme 2002) indique d'ailleurs que la qualité des produits acéricoles serait le meilleur gage de développement de cette industrie. Les stratégies de développement devront donc dans le futur être orientées vers ces aspects de la production et de la transformation afin d'assurer une réelle croissance de l'industrie.

La couleur et la saveur sont les deux principales caractéristiques qui déterminent la qualité du sirop d'érable. La loi québécoise définit le sirop d'érable selon 2 catégories (Anonyme 1998).

Le sirop d'érable est de catégorie 1 :

- a) s'il est limpide et de couleur uniforme ;
- b) s'il possède la saveur caractéristique du sirop d'érable ;
- c) s'il est exempt de goût de caramel ou de sève et de malate de calcium insolubilisé ; et
- d) s'il a tout au plus une trace de cristallisation.

Le sirop d'érable est de catégorie 2 :

- a) s'il est limpide ;
- b) s'il possède la saveur caractéristique du sirop d'érable ;
- c) s'il a tout au plus une trace de cristallisation ; et
- d) s'il a tout au plus les défauts suivants : un goût de caramel ou une trace de malate de calcium insolubilisé.

Le sirop d'érable est également classé selon sa couleur. La couleur du sirop d'érable est mesurée par le % de transmission de lumière déterminée au spectrophotomètre à une

longueur d'onde de 560nm. Le Tableau III montre les différentes classes de couleur du sirop d'érable en fonction du % de transmission de lumière. Ainsi, plus le sirop d'érable est clair, plus il a une valeur commerciale élevée.

Tableau III. – Classes de couleur du sirop d'érable

Classe de couleur	Abréviation	% de transmission de lumière
Extra clair	AA	75 % et plus
Clair	A	De 60,5 à 74,9 %
Médium	B	De 44 % à 60,4
Ambré	C	De 27% à 43,9 %
Foncé	D	Moins de 27 %

La saveur du sirop d'érable joue également un rôle dans la valeur commerciale du sirop. L'industrie acéricole valorise les sirops d'érable qui ont un goût caractéristique de l'érable et qui sont dépourvus de défaut de saveur (caramel intense, fermentation, goût de bourgeons, résidus de produits chimiques de lavage et d'assainissement, etc.). Les sirops présentant des défauts de saveur seront écartés ou bien on leur attribuera un prix moindre lors de l'inspection en fonction des défauts identifiés. Pour l'instant, aucune valorisation du sirop d'érable n'est faite basée sur l'étendue des goûts et des nuances organoleptiques qui peuvent être perçus comme appropriés pour les sirops produits à chaque année. Cette situation pourrait cependant changer, parce qu'il est maintenant possible de caractériser le goût du sirop d'érable de façon précise et standardisée à l'aide d'un outil appelé *La Roue des Flaveurs du Sirop d'Érable* (http://www.agr.gc.ca/roue_erable). Cet outil qui est un

guide de référence circulaire, est essentiellement destiné à un panel de dégustateurs et permet d'évaluer le sirop sur la présence d'une multitude d'arômes et de saveurs en utilisant les descripteurs appropriés. Ceci pourrait permettre dans l'avenir de catégoriser les sirops selon des familles de saveurs et d'arômes et ainsi mieux rencontrer les exigences de plus en plus précises des consommateurs de produits de l'érable.

LA MICROFLORE DE LA SÈVE D'ÉRABLE

Contamination microbienne de l'entaille de l'érable

Morselli et Whalen (1991) ont démontré que les tissus d'un arbre en santé et fraîchement entaillé étaient stériles ou pratiquement stériles, ce qui suggère que la contamination microbienne de l'entaille doit nécessairement venir de son environnement immédiat. L'entaille constitue donc le premier point d'entrée des micro-organismes dans la sève. Par aspiration de la sève qui exsude de l'entaille, les micro-organismes qui s'y développent durant la saison de coulée pourront être dirigés vers le système de récolte sous vide et le coloniser. L'entaille pourrait donc être considérée comme un point de contrôle critique du niveau de contamination microbienne de la sève. Afin d'éviter l'introduction de micro-organismes dans l'entaille, on recommande d'adopter des pratiques sanitaires d'entaillage en utilisant des chalumeaux et des équipements propres (Gouvernement de l'Ontario 2004). Un produit assainisseur à base d'alcool éthylique dénaturé (ADQ-2J) est actuellement homologué afin d'assainir la surface des chalumeaux et des équipements lors de l'entaillage (Filière acéricole du Québec 2005). Comme le développement microbien à l'entaille

augmente généralement en fonction de l'avancée de la saison, la diminution ou l'arrêt prématuré de la coulée semble être associé à la prolifération microbienne à l'entaille (Naghski et Willits 1955, Sheneman *et al.* 1958). Ceci a mené à l'utilisation de comprimés de paraformaldéhyde comme antimicrobiens afin de contrôler la prolifération microbienne à l'intérieur de l'entaille (Costilow *et al.* 1962). Ce produit n'est présentement plus utilisé en raison de dommages internes causés au tissu de l'arbre (Shigo et Laing 1970, Walters et Shigo 1978) et à la présence de résidus dans le produit fini (Lagacé *et al.* 2002, 2003).

Des efforts ont par ailleurs été consacrés dans le passé afin d'identifier les micro-organismes retrouvés dans la sève d'érable. Une étude menée par Edson (1912) démontre l'évolution de la contamination microbienne de la sève en fonction de l'avancée de la saison et rapporte la présence dominante des bactéries par rapport aux levures et moisissures. De plus, certains groupes bactériens y sont mentionnés tels que *Bacillus aceris* responsable de la sève filante ainsi que des bactéries donnant une fluorescence verte à la sève. Plus tard, Fabian et Buskirk (1935) ont identifié *Aerobacter aerogenes* comme responsable de la formation de sève filante. Les travaux les plus significatifs sur l'identification des micro-organismes de la sève ont cependant été réalisés par Sheneman et Costilow (1958) qui ont rapporté la présence d'une multitude d'espèces de bactéries, levures et moisissures dans la sève issue directement de l'entaille. Selon cette étude, un total de 469 souches ont été isolées et identifiées à l'aide de clés d'identification phénotypique. De ces souches, on a remarqué la prédominance d'un groupe de bactéries en forme de bâtonnets Gram-négatifs, psychotrophes, comprenant les genres *Pseudomonas*,

Flavobacterium et *Achromobacter* et représentant 67 % des souches isolées. *Pseudomonas geniculata* a été associé à plus de 50 % des souches de ce groupe et à environ 37 % de l'ensemble des souches isolées. Le 2^{ème} groupe le plus important était composé de bactéries en forme de coques Gram-positifs du genre *Micrococcus* représentant environ 17 % des souches isolées. Les 3^{ème} et 4^{ème} groupes étaient formés d'espèces hétérogènes de bactéries en forme de bâtonnets Gram-positifs formant ou non des spores. Neuf espèces représentant cinq genres différents de levures ont également été identifiées lors de cette étude. Parmi les espèces les plus souvent rencontrées figuraient *Trichosporon pullulans*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida* sp., *Torulopsis aerea* et *Cryptococcus laurentii*. Quant aux moisissures, l'étude en a identifié neuf genres dont les principaux étaient *Penicillium* et *Phoma*. Une étude préliminaire menée par Goulet *et al.* (1985) a obtenu les mêmes profils de contamination de la sève en plus d'identifier le pouvoir inhibiteur de la sève de première coulée coïncidant avec la présence de composés phénoliques et la teinte jaune de la sève.

Contamination microbienne du système de collecte de la sève

La sève d'érable, de par sa richesse en différents éléments nutritifs (Tableau I), est reconnue pour être un bon milieu pour la croissance des micro-organismes (Morselli et Whalen 1996). Bien que la croissance microbienne sera relativement limitée par une température fraîche en début de saison, elle pourra atteindre plus de 10^6 UFC par mL de sève vers la fin de la saison alors que la température extérieure est relativement plus élevée (Lagacé *et al.* 2002, Morselli et Whalen 1991). Il a notamment été observé que la

température atteinte à l'intérieur de la tubulure du système de récolte sous vide de la sève peut dans certains cas dépasser de 4 à 30°C la température extérieure (Walters et Yawney 1978, Morselli et Whalen 1979). Dans certains cas, le soleil peut grandement contribuer à augmenter la température de la sève qui s'écoule dans le réseau de récolte, ce qui favorisera la croissance microbienne. Pour limiter ce phénomène, certains producteurs utiliseront une tubulure de couleur pâle (blanc) plutôt que noire ou entoureront leur tubulure noire d'une gaine de plastique blanc qui isolera la tubulure et limitera le réchauffement par le soleil.

Si la contamination microbienne de l'entaille a relativement été bien documentée dans le passé, il n'en est pas de même pour la contamination microbienne du système de récolte. L'avènement des systèmes de récolte sous vide de la sève dans l'industrie acéricole est survenu après l'étude la plus complète sur la microbiologie de la sève de Sheneman et Costilow (1958). Sipple *et al.* (1970) ont cependant démontré que peu de différences avaient été obtenues entre une sève récoltée traditionnellement (seaux) comparée à une sève récoltée par tubulure du point de vue de la qualité microbiologique. Seuls King et Morselli (1983 et 1985) rapportent que des microorganismes peuvent adhérer à la surface de la tubulure du système de récolte et associent cette adhésion au ralentissement ou à l'arrêt de la circulation de la sève dans le système. Ils identifient la prédominance de bactéries du genre *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* biotypes A et G) à la surface de la tubulure ainsi que la présence de bactéries entériques. A cette époque, l'utilisation du système de récolte par tubulure était relativement restreinte et on ne connaissait pas encore la notion de biofilms microbiens telle qu'on la définit aujourd'hui.

Importance de la contamination microbienne sur la qualité

Comme il a été mentionné précédemment, la couleur et le goût sont les principaux critères qui déterminent la qualité et la valeur commerciale du sirop d'érable. Parmi les différents facteurs susceptibles d'influencer la qualité du sirop d'érable en cours de saison, la contamination microbienne de la sève demeure sans doute le facteur le plus important. Des recherches ont clairement démontré dans le passé que la croissance et le métabolisme des micro-organismes de la sève ont un impact majeur sur la couleur et le goût du sirop d'érable (Morselli *et al.* 1985, Morselli et Whalen 1979, Morselli et Whalen 1991, Naghski et Willits 1957, Lagacé *et al.* 2002). Les conditions qui favoriseront la croissance des micro-organismes de la sève telles que la température et le temps d'entreposage, auront conséquemment un impact négatif sur la qualité du sirop. Tel que décrit précédemment, les micro-organismes de la sève vont pouvoir dégrader les sucres de la sève et favoriser les réactions de brunissement non enzymatique (caramélisation et réaction de Maillard) lors de l'évaporation, ce qui aura pour effet d'intensifier la couleur du sirop d'érable et de lui conférer des goûts indésirables. C'est pourquoi tout les efforts doivent être entrepris afin de limiter la présence ainsi que la croissance des micro-organismes de la sève afin d'optimiser la qualité et la valeur commerciale du sirop d'érable.

LE BIOFILM

Au début du vingtième siècle, on reconnaissait déjà la préférence des populations bactériennes aquatiques à vivre en communauté en association avec une surface (Henrici

1933, ZoBell 1935, 1943). Ces premières observations ont par la suite ouvert la voie au développement d'un véritable champ de connaissance portant sur l'étude de la formation du biofilm dans divers applications autant industrielles que médicales. Le paradigme longtemps évoqué de la croissance des micro-organismes en suspension dans un liquide (planctonique), laisse maintenant la place au mode de croissance de cellules attachées à une surface (sessile) dans l'étude de la physiologie et du développement des micro-organismes en laboratoire. Il est présentement établi, suite à l'observation directe de plusieurs habitats naturels, que la majorité des micro-organismes vivent attachés à une surface, dans un micro-environnement sous forme d'un biofilm structuré et non pas sous forme libres en suspension (Costerton *et al.* 1995). La croissance sous forme sessile est de plus en plus considérée comme le mode de croissance usuel alors que la croissance sous forme planctonique ne serait jugée que transitoire (Jefferson 2004).

Définition du biofilm

Plusieurs définitions du biofilm ont été proposées dans la littérature. De ces multiples définitions, trois éléments de base reviennent régulièrement : micro-organismes, polymère extracellulaire et surface. Ces trois éléments constituent donc le fondement du concept de biofilm. Costerton *et al.* (1999) ont défini le biofilm comme étant une communauté structurée de cellules bactériennes enfouies dans une matrice polymérique produite par ces bactéries et adhérees à une surface inerte ou vivante. Elder *et al.* (1995) ont décrit le biofilm comme étant un consortium fonctionnel de micro-organismes inclus dans une matrice

d'exopolymère développée. D'une façon simple et générale, le biofilm peut donc être défini comme une communauté de micro-organismes attachés à une surface et enveloppés par une matrice polymérique extracellulaire. La formation de biofilm est un phénomène largement répandu dans la nature. Des biofilms peuvent entre autre se retrouver à la surface de lentilles cornéennes, sur la coque des bateaux, dans la tuyauterie servant au transport du lait, sur les roches d'un cours d'eau et sur différents implants médicaux (Carpentier et Cerf 1993, Costerton *et al.* 1987, Costerton *et al.* 1995, Costerton *et al.* 1999, Elder *et al.* 1995). Le biofilm peut être formé à partir d'une ou plusieurs espèces microbiennes sur un large éventail de surfaces biotiques ou abiotiques. Les biofilms formés à partir d'espèces microbiennes mixtes prédominent dans la plupart des environnements alors que les biofilms d'espèces simples sont surtout retrouvés dans les cas d'infections ou à la surface d'implants médicaux (O'Toole *et al.* 2000b).

Modèle de développement du biofilm

Tout comme la définition du biofilm, plusieurs modèles ont été proposés dans le passé pour schématiser les étapes de développement du biofilm (Dunne, 2002, Hall-Stoodley *et al.* 2004, Stoodley *et al.* 2002, Toutain *et al.* 2004). A cet égard, les *Pseudomonas* font partie des micro-organismes les plus souvent utilisés pour démontrer les étapes de formation du biofilm. Le modèle présenté à la Figure 4 basé sur celui de Stoodley *et al.* (2002), résume le développement du biofilm en 4 phases, accompagnées de photos en microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface du système de récolte de la sève

de la sève d'érable. Ce modèle décrit la formation du biofilm sous forme d'un cycle où les cellules planctoniques s'associent à la surface, s'y attachent fermement et produisent un biofilm structuré à partir duquel, des cellules vont être libérées et retourner momentanément en phase planctonique.

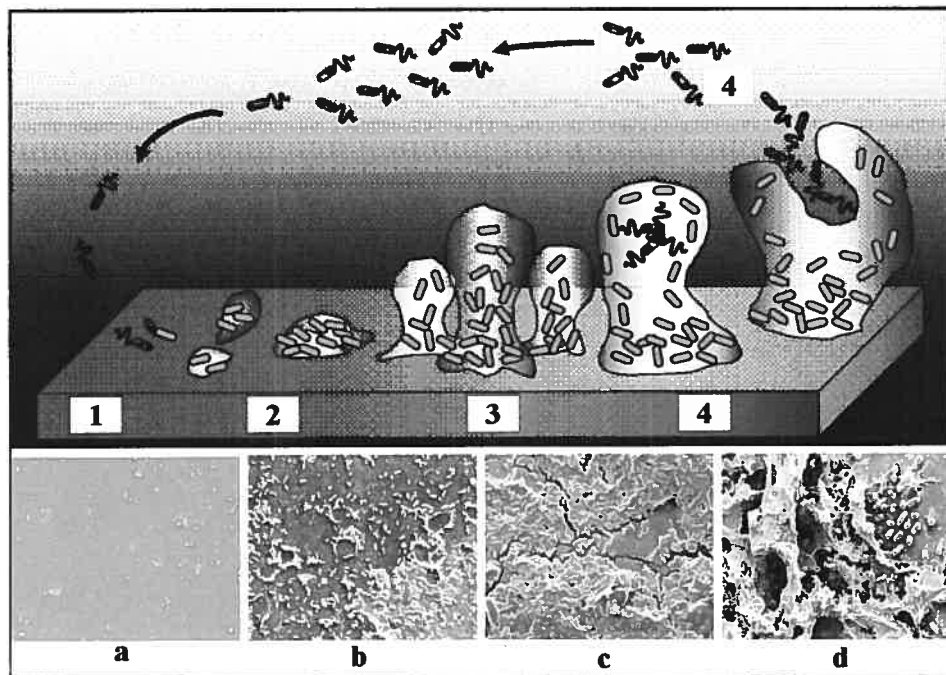


Figure 4. – Schéma représentant le processus de développement du biofilm. Étape 1: attachement initial (réversible); étape 2: adhésion, formation de micro-colonies et début de production d'EPS (irréversibles); étape 3: maturation du biofilm et étape 4: dispersion de cellules libres. Les images (a-d) montrent la croissance du biofilm par des photos en MEB de sections de tubulure du système de collecte de la sève d'érable prélevées en érablière à différents moments de la saison de coulée.

Facteurs impliqués dans le développement du biofilm

Adhésion initiale

Plusieurs facteurs peuvent influencer la transition de l'état planctonique à l'état sessile des cellules bactériennes (Fig. 4, étape 1). À cet égard, la nature et les propriétés de la surface sur laquelle les cellules vont adhérer joue un rôle important. En général, l'adhésion bactérienne est favorisée lorsque la rugosité de la surface augmente (Arnold *et al.* 2000, Jones *et al.* 1999, Morgan et Wilson 2001, Picioreanu *et al.* 2001, Taylor *et al.* 1998). L'augmentation du niveau d'attachement associé à la rugosité de la surface a été attribuée à la protection des cellules contre les forces de cisaillement et à l'augmentation de l'aire de la surface accessible pour l'adhésion.

L'hydrophobicité des cellules et de la surface sur laquelle les cellules vont faire contact, a également été associée à l'attachement initial (Busscher *et al.* 1984). Cette hydrophobicité relative des surfaces peut être évaluée en laboratoire grâce à la mesure de l'angle de contact formé par différents solvants (eau, formamide, α -bromonaphtalène) à la surface du matériau ou d'un tapis bactérien (van der Mei *et al.* 1998). L'importance de l'effet de l'hydrophobicité sur l'attachement bactérien peut donc varier en fonction de la combinaison organisme-milieu-surface étudiée. Typiquement, l'hydrophobicité des cellules a été associée à l'augmentation du niveau d'attachement et de façon linéaire pour *Pseudomonas* sp. issue du milieu marin (Fletcher et Loeb 1979). Il semble cependant que l'hydrophobicité optimale des cellules pour l'attachement varie dépendamment des souches étudiées. Van der Mei *et al.* (1998) ont cependant démontré après l'analyse de

l'hydrophobicité de 142 souches provenant de 17 genres microbiens, qu'aucune généralisation ne peut être faite quant à la nature des espèces et leur hydrophobicité respective. L'hydrophobicité cellulaire a été associée à la présence de structures à la surface des cellules telles que les lipopolysaccharides (LPS), pili, flagelles et autres, qui vont varier en fonction des espèces, de l'état physiologique des cellules et des conditions environnementales prévalentes. Il devient alors difficile d'associer l'attachement cellulaire strictement à l'hydrophobicité des cellules et des supports.

Bien qu'elle semble moins importante que l'hydrophobicité, la charge électrostatique peut également, dans certains cas, jouer un rôle significatif dans l'attachement bactérien à une surface (van Loosdrecht *et al.* 1989, van der Mei et Busscher 2001). Cependant, sachant que les cellules bactériennes et les surfaces sont souvent entourées d'une couche ionique de même signe (-), le chevauchement de ces couches résulte en une répulsion électrostatique. L'amplitude de cette répulsion dépendra de la charge potentielle des surfaces qui peut être évaluée par la mesure du potentiel zeta (Saito *et al.* 1997). Certaines structures à la surface des cellules (pili, flagelles) peuvent par ailleurs participer à l'attachement initial en établissant un pont entre la cellule et la surface et en maintenant la cellule à une distance suffisante et de ce fait, contrevenir à la répulsion électrostatique (Heckels *et al.* 1976). De plus, la motilité flagellaire va faciliter le transport des cellules vers la surface et favorisera le contact intime de la cellule avec cette surface permettant ainsi son attachement.

Les caractéristiques du milieu environnant vont également avoir un rôle à jouer dans l'étape initiale d'adhésion. Il a été démontré dans plusieurs études que le pH et la force ionique du milieu ont une influence sur l'attachement aux surfaces inertes. *P. aeruginosa* montre un attachement maximal à pH neutre et à une force ionique faible (Busalmen et de Sanchez 2001). Certains cations (Ca^+ , Na^+ , La^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+}) peuvent également favoriser l'attachement de *P. fluorescens* aux surfaces abiotiques (Fletcher 1988, O'toole et Kolter 1998b). La formation d'un film de conditionnement à la surface du support par l'adsorption d'éléments nutritifs du milieu va également intervenir dans les tous premiers instants de la rencontre entre la cellule et la surface et influencer son adhésion.

Adhésion, formation de micro-colonies et début de production d'EPS

Après un certain temps de contact avec la surface, l'attachement réversible devient irréversible (Fig. 4, étape 2). Plusieurs facteurs sont responsables de cette adhésion irréversible. Parmi ceux-ci, il y a la formation de micro-colonies. Une micro-colonie consiste en un petit agrégat de cellules associées à une surface (O'Toole et Kolter 1998a, Sauer et Camper 2001). La formation de micro-colonies est assurée par la présence de certains types de pili (Tfp) à la surface de la bactérie. Ces pili vont permettre une certaine forme de mouvement en saccades (*twitching motility*) des cellules à la surface faisant intervenir un mécanisme d'extension, d'attachement et de rétraction des pili et qui rendra possible l'agglomération des cellules et la formation de micro-colonies (Merz *et al.* 2000). L'attachement irréversible est généralement l'étape où les cellules se départissent de leurs flagelles et adoptent le phénotype de mouvement en saccades (*twitching motility*) (Sauer et

Camper 2001). Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont particulièrement été associées au mouvement en saccades Tfp-dépendant et à la formation de micro-colonies. Il a été démontré que des cellules mutantes de *P. aeruginosa* et *P. putida* dépourvues de pili Tfp sont capables d'association avec la surface sous forme d'une mono-couche mais sont incapables de former des micro-colonies et de développer un biofilm normal. *Pseudomonas aeruginosa* constitue un exemple éloquent de ce phénomène faisant intervenir les pili de type IV (Tfp). Chez *P. aeruginosa*, la production de pili est régulée par des signaux nutritionnels par l'intermédiaire des changements au niveau du Crc (*Catabolic repression control*) aussi responsable de la régulation des gènes de biosynthèse de l'alginate et de la dérégulation des gènes de synthèse flagellaire (O'toole *et al.* 2000a). Le mouvement en saccades des cellules associé aux pili de type IV et conséquemment la formation de micro-colonies, sont aussi responsables chez *P. aeruginosa* de l'architecture tri-dimensionnelle du biofilm qui, une fois mature, prend la forme d'un champignon. Cette structure sous forme de champignon est entourée de canaux pouvant laisser passer librement les éléments nutritifs et l'oxygène donnant ainsi accès à ces éléments aux cellules enfouies profondément dans le biofilm. La formation de micro-colonies permet donc de focaliser la croissance des cellules à de multiples endroits de la surface et d'accroître l'adhésion avec celle-ci jusqu'à recouvrir entièrement la surface.

En plus de la formation des micro-colonies, les cellules à cette étape-ci vont commencer à produire un polymère extracellulaire (EPS) qui va les ancrer à la surface et conduire à l'attachement irréversible. La production d'EPS peut être contrôlée par certains gènes

induits par le contact des cellules avec la surface. Par exemple, les gènes responsables de la biosynthèse de l'alginate chez *Pseudomonas aeruginosa* peuvent être induits suite à l'attachement (Boyd et Chakrabarty 1995). On estime d'ailleurs que la régulation positive des gènes pour la production d'alginate par *P. aeruginosa* surviendrait après 15 minutes seulement suivant l'attachement initial dans un système de culture en continu (Davies et Geesey 1995).

Maturation du biofilm

La maturation du biofilm représente l'étape la plus déterminante pour la différenciation des biofilms. Sauer *et al.* (2002) ont estimé entre autre une différence de plus 50 % dans les protéines produites par *P. aeruginosa* entre l'étape de maturation du biofilm et les cellules planctoniques. Parmi les caractéristiques qui distinguent l'étape de maturation, il y a la synthèse d'EPS et la communication inter-cellulaire ou *quorum sensing*. La production d'EPS s'avère importante pour le maintien des cellules à la surface (Davies et Geesey 1995) et pour la stabilité de la structure de la communauté microbienne du biofilm (Branda *et al.* 2005). La matrice d'EPS peut être composée de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. L'alginate produite par *P. aeruginosa* figure probablement parmi les EPS les mieux caractérisés. La production d'alginate est notamment régulée en réponse à des signaux environnementaux (privation en azote, osmolarité, etc.). Cette production d'EPS va s'accroître durant la phase de maturation du biofilm (Fig. 4, étape 3), contribuant ainsi à l'épaississement de sa structure, à son architecture et à la protection accrue des cellules. L'architecture (forme champignon ou aplatie) du biofilm et les

propriétés qui y sont associées dépendent du type d'EPS produit en plus du mouvement en saccade responsable de la formation de micro-colonies. Ces EPS peuvent varier d'une espèce à l'autre et d'une souche à l'autre pour une même espèce, ce qui contribue à la différenciation des divers biofilms (Nivens *et al.* 2001, Danese *et al.* 2000). Hentzer *et al.* (2001) attribuent aussi cette différenciation aux conditions nutritionnelles (type de nutriments et disponibilité) retrouvées à l'intérieur du biofilm.

La communication inter-cellulaire (*quorum sensing*) est également indispensable pour la formation du biofilm (Davies *et al.* 1998, Juhas *et al.* 2005). La mise en évidence du système de communication inter-cellulaire à l'intérieur du biofilm illustre bien le niveau de complexité de ce micro-environnement qui le distingue du mode de croissance planctonique. Un exemple du système de communication inter-cellulaire (*quorum sensing*) basé sur le modèle de *P. aeruginosa* est présenté à la Figure 5 (Miller et Bassler 2001). A l'instar des organismes pluricellulaires, les micro-organismes du biofilm ont la capacité de percevoir des changements dans leur environnement et de s'y adapter en conséquence (Shapiro 1998, Webb *et al.* 2003). L'adaptation à ces changements se fait par l'intermédiaire de la régulation des gènes par le système de communication inter-cellulaire qui dépend de la densité cellulaire. Davies *et al.* (1998) ont démontré que *P. aeruginosa* PAO1 nécessite la présence d'auto-inducteurs (produit du gène *lasI*) pour le développement d'un biofilm normal et différencié. La communication intercellulaire est notamment responsable de la régulation de la synthèse d'EPS (alginate) et d'une multitude d'autres gènes pour la formation du biofilm (Juhas *et al.* 2005, Hentzer *et al.* 2004).

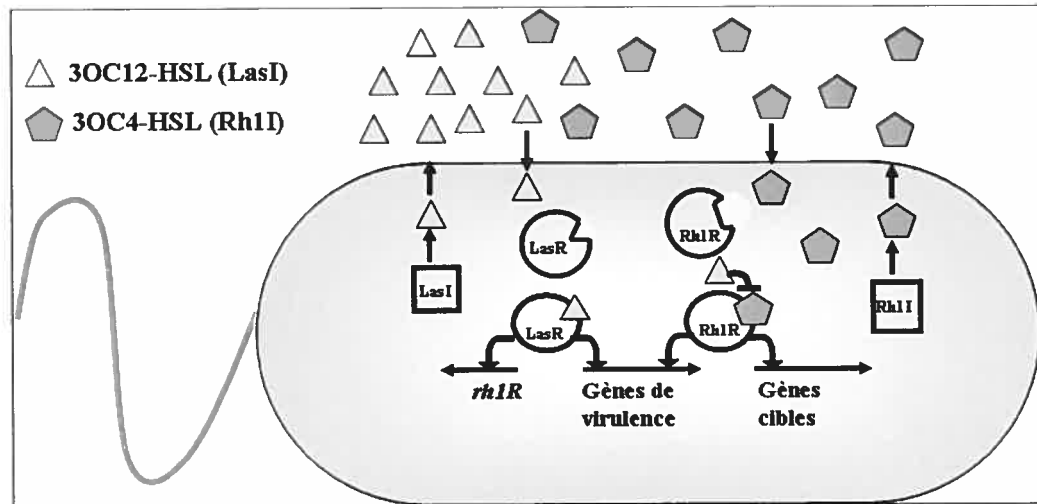


Figure 5. – Le système de communication inter-cellulaire (*quorum sensing*) de *Pseudomonas aeruginosa* utilisé afin de réguler une grande variété de gènes. Le système fonctionne par paire auto-inducteur/détecteur. La protéine LasI produit la molécule auto-inductrice *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone [triangles] et la protéine RhII synthétise la molécule auto-inductrice *N*-(butryl)-homoserine lactone [pentagones]. L'activateur transcriptionnel LasR se lie à l'auto-inducteur LasI-dépendant quand cette molécule signal atteint une concentration critique. Le complexe LasR–auto-inducteur se fixe aux régions promotrices d'une variété de facteurs de virulence et stimule leur transcription. De plus, le complexe LasR–auto-inducteur induit la transcription de *rhIR* pour initier un 2^{ème} circuit de *quorum sensing*. RhIR fixé à l'auto-inducteur RhII-dépendant active la transcription d'une partie des gènes de virulence aussi activé par LasR en plus d'autres gènes cibles non régulés par LasR. L'auto-inducteur LasI-dépendant interfère avec la fixation entre RhII et son auto-inducteur. Sans doute, cette action assure que le circuit LasI/LasR est établi prioritairement au circuit RhII/RhIR. La quinolone signal de *Pseudomonas* (PQS) assure également la régulation entre les circuits Las et RhI.

Dispersion des cellules libres

La dispersion est l'étape où les cellules sont libérées du biofilm et retournent en phase planctonique fermant ainsi le cycle de développement du biofilm (Fig. 4. étape 4). Cette étape du développement du biofilm a été relativement peu étudiée jusqu'à présent. Selon Stoodley *et al.* (2001), le détachement des cellules du biofilm peut survenir sous différentes

conditions d'écoulement du fluide environnant. Pour *Pseudomonas fluorescens*, la dispersion des cellules du biofilm mature serait aussi liée à la privation en certains nutriments et à la perte de polymère extracellulaire possiblement sous contrôle enzymatique (lyase) (Allison *et al.* 1998). Davey *et al.* (2003) rapportent également la production de biosurfactants (rhamnolipides) par *P. aeruginosa* qui pourraient favoriser la dispersion des cellules de la matrice du biofilm. Selon l'hypothèse de Stoodley *et al.* (2002), la dispersion des cellules du biofilm mature pourrait aussi être sous l'influence du système de communication *inter-cellulaire* (*quorum sensing*) où une augmentation de la concentration en molécules inductrices serait responsable de la régulation de la production d'enzymes de dégradation de la matrice d'EPS. La dispersion des cellules du biofilm revêt donc un intérêt particulier puisque les cellules ainsi libérées auront la possibilité de contaminer d'autres surfaces ou fluides et causer différents problèmes tant au niveau médical qu'industriel (aliments, eau potable).

Tableau IV. – Sommaire des facteurs impliqués dans le développement du biofilm

Étape de développement du biofilm	Facteurs
Adhésion initiale (étape 1)	Rugosité (surface) Hydrophobicité (surface et cellules) Charge électrostatique (surface et cellules) Propriétés du fluide environnant (pH, force ionique, vitesse, température) Motilité flagellaire Film de conditionnement
Adhésion irréversible (étape 2)	Disponibilité des nutriments (privation) Production d'EPS Mouvement en saccades (<i>twitching motility</i>) Formation de micro-colonies
Maturation du biofilm (étape 3)	Production d'EPS Communication <i>inter-cellulaire</i> (<i>quorum sensing</i>)
Dispersion des cellules libres (étape 4)	Condition d'écoulement du fluide environnant Enzymes de dégradation (lyase) Disponibilité des nutriments (privation) Bio-surfactants Communication <i>inter-cellulaire</i> (<i>quorum sensing</i>)

La résistance des biofilms aux agents antimicrobiens

Les bactéries acquièrent un certain nombre d'avantages à vivre sous forme de biofilm par rapport au mode de vie planctonique. Dans un cours d'eau par exemple, les cellules microbiennes du biofilm sont protégées des agressions de l'environnement extérieur telles que les radiations ultraviolets (Pozos *et al.* 2004), les molécules antimicrobiennes, la chaleur (Frank et Kofi 1990) et les bactériophages (Hicks et Rowbury 1987). Les biofilms constituent donc un réservoir de micro-organismes capables de résister aux fluctuations de l'environnement. Ces micro-organismes deviennent, une fois libérés, une source potentielle de contamination des fluides et autres produits tels que les aliments.

Le glycocalème

L'observation générale concernant la résistance aux agents antimicrobiens est à l'effet que les populations microbiennes vivant en biofilms sont plusieurs centaines de fois moins susceptibles à une vaste gamme de biocides non apparentés chimiquement (Gilbert *et al.* 2002). Cette résistance s'opère à plusieurs niveaux. La matrice d'EPS, aussi appelée glycocalème, cimente les cellules du biofilm les unes aux autres et englobe les molécules et les ions de l'environnement (Sutherland 2001). Dans une communauté d'espèces mixtes dans laquelle chaque espèce produit un polymère différent, il se produit alors une mosaïque de micro-colonies entourées de polymères ayant différentes propriétés physico-chimiques. Selon des premières études sur le sujet (Slack et Nichols 1982, Costerton *et al.* 1987), le glycocalème pourrait servir de barrière à la diffusion des biocides à l'intérieur du biofilm. Cette explication générale a cependant été réfutée suite à des études sur les coefficients de diffusion de certains antibiotiques (Gordon *et al.* 1988, Nichols *et al.* 1989). À lui seul, le retard dans la diffusion des agents antimicrobiens ne peut donc pas expliquer la réduction de la susceptibilité des biofilms. Cependant, selon la nature des polymères composant le biofilm, ceux-ci pourront interagir avec les biocides et contribuer à leur inactivation. Ce serait entre autres le cas pour les produits tels que les halogènes, les aldéhydes et les peroxydes dont la capacité à réagir avec la matrice polymérique est énorme (Gardner et Stewart 2002). Le glycocalème peut également servir à piéger les enzymes extracellulaires produites par les micro-organismes ainsi qu'à concentrer les métabolites secondaires produits et les ions provenant du fluide environnant (Flemming *et al.* 2000).

Ces enzymes extracellulaires immobilisées auront alors la capacité de dégrader certains composés antimicrobiens et ainsi contribuer à protéger les cellules du biofilm. C'est le cas entre autres des enzymes aldéhyde lyase et déshydrogénase qui peuvent se retrouver piégées dans le biofilm et offrir une protection notamment contre le formaldéhyde et le glutaraldéhyde (Gardner et Stewart 2002).

L'état physiologique des communautés microbiennes du biofilm

En plus du glycocalème, l'état physiologique des communautés microbiennes du biofilm peut agir comme modulateur de la résistance aux biocides. L'état physiologique des cellules du biofilm peut entre autres être influencé par la disponibilité des nutriments et le taux de croissance (Gilbert *et al.* 1990). À l'intérieur du biofilm, de nombreux phénotypes physiologiques peuvent co-exister, reflétant ainsi l'hétérogénéité du glycocalème et la formation de gradients chimiques, électrochimiques et nutritifs. La résistance aux biocides attribuée aux changements dans l'état physiologique des cellules et surtout au taux de croissance cellulaire ralenti, fait intervenir des changements au niveau de la composition cellulaire incluant les acides gras, les phospholipides et les protéines de la membrane (Gilbert *et al.* 2004). Ces changements ont d'ailleurs été intimement associés à la disponibilité en nutriments à l'intérieur du biofilm. Cet état de privation des cellules et leur taux de croissance ralenti confèrent aux cellules du biofilm enfouies profondément à l'intérieur de la matrice, une susceptibilité aux biocides moindre comparativement à celles situées en périphérie ayant plus facilement accès aux nutriments et possédant un taux de croissance plus élevé.

Facteur de réponse générale aux stress

Il a également été suggéré que le taux de croissance ralenti de certaines cellules du biofilm n'était pas uniquement induit par la disponibilité des nutriments mais aussi par un facteur de réponse générale aux stress (Brown et Barker 1999). Les mécanismes de réponse aux stress résultent généralement en des changements physiologiques qui agissent en protégeant les cellules contre divers stress environnementaux tels que les chocs thermiques, les changements de pH, et plusieurs agents chimiques. Le régulateur central de cette réponse est le facteur sigma, *rpoS*, connu pour être exprimé en phase de croissance stationnaire (Mah et O'toole 2001). L'expression de *rpoS* à l'intérieur du biofilm induirait ce qu'on appelle un état de dormance des cellules qui conduirait à la réponse générale aux stress d'une population de cellules en diminuant la perméabilité de la membrane externe et par la synthèse de nucléotides hautement phosphorylées conduisant ainsi à la résistance vis-à-vis un bon nombre d'agents physiques et chimiques (Fux *et al.* 2005, Gilbert *et al.* 2004).

Les pompes à efflux

Les cellules bactériennes comportent de façon générale un certain nombre de systèmes de transport au niveau de la membrane cytoplasmique ayant un rôle vital pour les cellules comme l'absorption de nutriments essentiels et l'excrétion de composés toxiques ainsi que pour le maintien de l'homéostasie cellulaire (Paulsen *et al.* 1996). Certains de ces systèmes sont impliqués dans la résistance aux agents antimicrobiens dont l'expression des pompes à efflux multidrogues (*multidrug efflux pumps*). Chez les bactéries à Gram négatif et positif,

l'expression de ces pompes est induite par l'exposition à des doses sous létales d'une grande variété d'agents antimicrobiens (Gilbert *et al.* 2004) exerçant ainsi une pression sélective sur certains de ces systèmes. Comme leur nom l'indique, les pompes à efflux multidrogues sont capables d'excréter hors de la cellule différents produits antimicrobiens de différentes natures et de structures moléculaires différentes. Un exemple de ces systèmes sont les pompes à efflux multidrogues QacA-G retrouvés notamment chez *Staphylococcus aureus* et qui sont responsables de la tolérance envers différents composés antimicrobiens tels que les ammoniums quaternaires et la chlorhexidine (Paulsen *et al.* 1996). Selon Hentzer *et al.* (2004), les pompes à efflux multidrogues pourraient contribuer au phénotype de résistance des biofilms aux agents antimicrobiens.

Communication inter-cellulaire et résistance des biofilms

La communication inter-cellulaire (*quorum sensing*) semble elle aussi être associée à la récalcitrance aux agents biocides des cellules du biofilm. Un exemple de cette récalcitrance est celui rapporté par Hassett *et al.* (1999) qui ont démontré que la communication inter-cellulaire (*quorum sensing*) dans les biofilms de *P. aeruginosa* était associée au contrôle de l'expression des gènes codant pour les enzymes catalase et superoxyde dismutase responsables de la dégradation du peroxyde d'hydrogène et de la résistance au stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène.

LES DESINFECTANTS ET L'ASSAINISSEMENT DU SYSTEME DE RECOLTE DE LA SEVE

But de la désinfection

Selon Holah (1995), l'assainissement est principalement réalisée dans le but d'éliminer tout matériau indésirable (résidus d'aliments, micro-organismes, corps étrangers, résidus de produits chimiques de lavage) de la surface, de façon économique et à un niveau tel que les résidus qui persistent, sont d'un risque minimal pour la qualité et l'innocuité du produit. Ces matériaux appelés souillures sont généralement apportés par les opérations normales de préparation des aliments telles que les éclaboussures, l'entretien des équipements et la contamination provenant de l'environnement immédiat. On considère d'ailleurs que l'assainissement chimique est inefficace sans qu'il y ait eu au préalable, un lavage complet des surfaces afin d'éliminer les matériaux pouvant interférer avec les produits assainisseurs. Le lavage des surfaces est donc extrêmement important et fait partie intégrante d'un programme en 2 étapes de lavage et d'assainissement des équipements.

Les principaux désinfectants et leur mode d'action

L'industrie alimentaire à recours à divers produits d'assainissement dans ces processus d'entretien sanitaire des équipements en contact avec les aliments. Les principaux se regroupent sous divers classes soient : les agents oxydants, les agents d'alkylation, les agents se liant aux ions métalliques, les agents se liant aux acides nucléiques, les agents de

dénaturation des protéines et les agents réagissant avec les lipides (Lambert 2004, Russell 2001). Ces principaux produits sont listés au Tableau V avec leur mode d'interaction avec les cellules microbiennes.

Le peroxyde d'hydrogène, l'hypochlorite de sodium, l'acide peracétique et les isothiazolones sont tous des agents oxydants. Ils doivent leur activité antimicrobienne à leur effet oxydant sur les protéines, en particulier sur les groupements thiols des résidus de cystéines. Ces groupements sont particulièrement importants pour la structure et les fonctions des protéines. D'ailleurs, plusieurs enzymes importantes (déhydrogénases) dans le fonctionnement des cellules microbiennes contiennent des résidus de cystéines au niveau de leur sites actifs. L'oxydation des groupements thiols résulte en une inhibition du métabolisme des cellules.

Des molécules telles que le formaldéhyde et le glutaraldéhyde réagissent avec les résidus d'acides nucléiques et de protéines par alkylation, une modification chimique irréversible résultant en une inhibition du métabolisme et de la division cellulaire. Les groupements chimiques susceptibles de réagir avec les aldéhydes sont les radicaux amines, carboxyls, thiols, hydroxyls, imines et amides. Ces réactions entre ces groupements et les aldéhydes peuvent provoquer la réticulation des protéines et l'inactivation du métabolisme des cellules.

Les ions métalliques divalents jouent un rôle important dans la stabilisation de la structure des lipides membranaires et des ribosomes en plus d'agir comme co-facteurs pour

plusieurs enzymes. Par exemple, la liaison du magnésium à un agent chélatant tel que l'acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA), résulte notamment en des dommages à la membrane cellulaire externe des bactéries à Gram négatif et en une augmentation de la sensibilité aux autres agents antimicrobiens possiblement grâce à une augmentation de la perméabilité des cellules. L'addition de l'EDTA à la formulation d'agents antimicrobiens non seulement va aider à la stabilité et la solubilité des agents en solution mais peut aussi aider à l'activité antimicrobienne de certains produits.

Bien que peu utilisés en industrie alimentaire, les produits tels que les colorants acridines (proflavine, quinacrine) ont une affinité spécifique pour les acides nucléiques. Ils inactivent les cellules microbiennes en se fixant à l'ADN par insertion (intercalation) entre les paires de bases de la double hélice, bloquant ainsi la réplication et l'expression des gènes et la synthèse protéique.

Les phénols et les alcools sont des agents qui dénaturent la structure des protéines en se fixant aux résidus d'acides aminés et en déplaçant les molécules d'eau. Ces changements au niveau de la structure des protéines sont dépendants de la concentration utilisée. A plus faible concentration, il peut en résulter une inhibition des enzymes. Lorsque la concentration est plus élevée par contre, il en résulte des dommages à la membrane cellulaire causant des fuites du contenu cellulaire ou plus sévèrement, une dénaturation totale provoquant la coagulation des protéines du cytoplasme.

Les détergents cationiques (ammoniums quaternaires) et les bisbiguanides sont des agents agissant sur les lipides. Ils exercent leur activité antimicrobienne par l'interaction avec les lipides anioniques de la membrane cytoplasmique et de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. A faible concentration, ces agents provoquent des dommages à la membrane et la fuite des constituants du cytoplasme en brisant les interactions entre les lipides et les protéines membranaires. A concentration élevée, ils provoquent la dénaturation des protéines et la coagulation du cytoplasme.

Tableau V. – Interactions entre les désinfectants et les cellules microbiennes

Désinfectant	Cible	Type d'interaction	Effet sur la cellule
Peroxyde d'hydrogène, acide peracétique, hypochlorite, iodure, mercures organiques	Groupements thiols des protéines	Oxydation des groupements thiols	Inhibition d'enzymes clés, modification des protéines de structure
Aldéhydes, oxyde d'éthylène	Groupements aminés des protéines, acides nucléiques	Alkylation des groupements aminés des protéines et des acides nucléiques	Inhibition des fonctions des enzymes et des acides nucléiques
Hypochlorite, chlorure, iodure	Acides aminés aromatiques des protéines	Halogénéation des acides aminés aromatiques des protéines	Inhibition d'enzymes clés, modification des protéines de structure
EDTA	Ions métalliques divalents (calcium, magnésium) de la paroi cellulaire et de la membrane	Chélation des ions métalliques	Domages à la paroi cellulaire et à la membrane, inhibition des métallo-enzymes
Acridines	ADN	Insertion entre les paires de bases	Inhibition de la réplication de l'ADN
Phénols, alcools	Protéines cytoplasmiques et membranaires	Dénaturation et précipitation des protéines	Inhibition des enzymes, dommages à la membrane, coagulation cytoplasmique
Ammoniums quaternaires, chlorhexidine	Lipides des membranes cellulaires	Liaison aux groupements phosphate et aux chaînes d'acides gras des phospholipides	Domages à la membrane, fuite de constituants de la cellule, coagulation cytoplasmique à concentration élevée

L'assainissement des systèmes de récolte de la sève d'érable

Afin d'assurer une valeur commerciale optimale des produits acéricoles, un entretien adéquat du système de récolte de la sève d'érable est incontournable. Diverses méthodes d'assainissement des systèmes de récolte sous vide de la sève ont été élaborées dans le passé en tenant compte de la configuration des systèmes et de la présence potentielle de résidus de produits assainisseurs dans le sirop d'érable (Allard et Belzile 2004). La présence de résidus dans le sirop est un sujet préoccupant pour la production acéricole puisque le procédé de fabrication permet la concentration de ces résidus (jusqu'à plus de 40×) qui peuvent atteindre des teneurs pouvant potentiellement apporter des défauts sensoriels et contrevenir au principe de pureté du produit acéricole. C'est pourquoi des rinçages abondants avec de l'eau ou du filtrat d'osmose inversée sont conseillés suivant les traitements d'assainissement. Pour les traitements appliqués en cours de saison, ceux-ci seront limités aux tubes collecteurs principaux et se feront généralement par aspiration de la solution assainissante à partir de la tête du système (Allard et Belzile 2004). Il est également suggéré de faire, en cours de saison, des rinçages périodiques du système avec de l'eau ou du filtrat d'osmose inversée et d'appliquer un traitement à l'aide d'une solution assainissante seulement lorsque les rinçages ne sont plus suffisants et que la qualité du sirop produit se détériore. Pour les traitements appliqués à la fin de la saison de récolte, ceux-ci s'appliquent à tout le système, soient les tubes latéraux et les tubes principaux. Les traitements peuvent être effectués par aspiration ou par refoulement de la solution

assainissante dans le système. La technique par aspiration utilisée en fin de saison ressemble à celle utilisée en cours de saison à la différence que la solution assainissante est aspirée par les chalumeaux. Pour ce faire, le système est maintenu sous vide et la solution est transportée dans un petit réservoir à travers l'érablière. Les chalumeaux sont alors décrochés tour à tour et la solution est aspirée par le chalumeau. De cette façon, la solution assainissante vient en contact avec toutes les parties du réseau de collecte. L'assainissement des collecteurs principaux se fait de la même façon que pour le traitement en cours de saison. La technique par refoulement quant à elle, consiste à pomper sous pression la solution assainissante à partir de la queue du système (station de pompage). Une fois le système mis sous pression avec la solution, on parcourt l'érablière afin de décrocher les chalumeaux un à un et faire sortir la solution sous pression à travers chacun des chalumeaux. Afin d'augmenter la turbulence et la progression de la solution dans le système, une quantité d'air peut être incorporée sous pression avec la solution assainissante à l'aide d'un dispositif spécialement conçu pour cette application. L'assainissement en fin de saison est lui aussi suivi d'une étape de rinçage abondant avec de l'eau ou du filtrat d'osmose inversée. La solution assainissante la plus fréquemment utilisée consiste à préparer une solution d'environ 600 ppm d'hypochlorite de sodium (Allard et Belzile 2004).

METHODOLOGIE

Techniques moléculaires utilisées pour l'identification des micro-organismes et l'étude des communautés microbiennes

Une panoplie de techniques génétiques ont été développées au cours des dernières années afin d'étudier la composition et la dynamique des communautés microbiennes de divers écosystèmes. Étant donné que ces techniques sont souvent désignées par des acronymes, il devient parfois difficile de les reconnaître et de les distinguer. Le Tableau VI dresse une liste de plusieurs de ces techniques en donnant leur désignation usuelle et leur abréviation. Dans plusieurs cas, ces techniques sont basées sur les propriétés du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) (Alkorta *et al.* 2003). Ce gène a été intensivement étudié pour une très grande variété de bactéries et permet d'identifier au niveau de l'espèce les organismes composant un écosystème. Une quantité impressionnante de séquences de l'ADNr 16S d'une très grande variété d'espèces bactériennes sont d'ailleurs recensées dans les diverses banques de données d'instituts nationaux (ex. : GenBank) permettant ainsi d'effectuer des comparaisons avec ces séquences. Ce gène est souvent qualifié de marqueur de l'évolution puisqu'il contient dans sa séquence des régions hautement conservées pour toutes les espèces bactériennes. La particularité de ce gène est qu'il contient aussi dans sa séquence des régions signatures qui sont propres à chacune des espèces, ce qui permet leur différenciation.

Tableau VI. – Liste de techniques génétiques utilisées dans l'étude des communautés microbiennes

Désignation usuelle	Abréviation	Références
Amplified (DNA) fragment length polymorphism	AFLP	Vandamme <i>et al.</i> 1996 Vanechoutte 1996
Arbitrary primed polymerase chain reaction	AP-PCR	Vanechoutte 1996
Amplified ribosomal DNA restriction analysis	ARDRA	Vanechoutte 1996
Polymerase chain reaction of BOX elements	BOX-PCR	Rademaker <i>et al.</i> 1998
Denaturing gel gradient electrophoresis	DGGE	Muyzer 1999
Polymerase chain reaction of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences	ERIC-PCR	Rademaker <i>et al.</i> 1998
Fluorescence in situ hybridization	FISH	Amann <i>et al.</i> 1995
Intergenic spacer analysis (= ITS analysis)	IGS	Gürtler et Stanisich 1996
Polymerase chain reaction of long interspersed elements	Inter-LINE-PCR	Smida <i>et al.</i> 1996
Internal transcribed spacer analysis (= RISA)	ITS	Gürtler et Stanisich 1996
Multilocus enzyme electrophoresis	MLEE	Selander <i>et al.</i> 1986
Pulsed field gel electrophoresis	PFGE	Vandamme <i>et al.</i> 1996. Vanechoutte 1996.
Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction-generated amplicons	PCR-RFLP	Vandamme <i>et al.</i> 1996 Vanechoutte 1996
Polymerase chain reaction of random-amplified polymorphic DNA	RAPD-PCR	Vanechoutte 1996
Pulsed field gel electrophoresis (of DNA digested by) rare cutting endonucleases	RC-PFGE	Vanechoutte 1996
Polymerase chain reaction of (DNA sequences between) repetitive extragenic palindromic elements	REP-PCR	Rademaker <i>et al.</i> 1998
Polymerase chain reaction of (DNA sequences between) repetitive (REP, ERIC or BOX) elements	Rep-PCR	Rademaker <i>et al.</i> 1998
Ribosomal intergenic spacer analysis	RISA	Gürtler et Stanisich 1996
Temperature gradient gel electrophoresis	TGGE	Muyzer 1999
Teminal restriction fragments length polymorphism	T-RFLP	Marsh 1999

La technique ARDRA

Le séquençage de l'ADNr 16S pour l'identification d'une grande quantité d'isolats bactériens peut parfois être long et coûteux. Dans ce cas, il devient intéressant d'utiliser une méthode moléculaire complémentaire moins exigeante qui permet de faire des regroupements d'isolats de même espèce et de limiter le séquençage à quelques isolats représentatifs d'un même groupe pour identification ou tout simplement, de comparer les profils obtenus à des profils d'organismes témoins. L'analyse des profils de restriction de

l'ADN ribosomal amplifié ou *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) permet de faire ce type de regroupement basé sur le profil de restriction de l'ADNr 16S des isolats bactériens. Cette méthode décrite à la Figure 6, consiste à isoler les bactéries d'un échantillon sur milieu synthétique en laboratoire, d'extraire l'ADN chromosomique, d'amplifier l'ADNr 16S par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) à l'aide d'amorces universelles spécifiques à des régions bien conservées du gène pour toutes les espèces bactériennes et à procéder à la digestion des amplicons à l'aide d'une combinaison d'enzymes de restriction. Les différents fragments de restriction sont ensuite observés sur gel d'électrophorèse pour chaque isolat analysé. Comme l'ADNr 16S contient dans sa séquence des régions signatures qui sont similaires pour une même espèce mais divergentes pour des espèces différentes, il en sera de même pour les profils de restriction. Ainsi, les profils de restriction similaires sur gel d'électrophorèse peuvent être regroupés et le groupe identifié par comparaison avec des profils d'organismes témoins ou par séquençage seulement pour un ou quelques isolats représentatifs du groupe. Cette technique a été utilisée avec succès notamment pour la caractérisation et l'identification des bifidobactéries (Roy et Sirois 2001, Ventura *et al.* 2001) et des lactobacilles (Andrighetto *et al.* 1998, Drake *et al.* 1996, Giraffa *et al.* 1998, Roy *et al.* 2001, Ventura *et al.* 2000).

Techniques moléculaires culture-indépendantes

Aujourd'hui, il est généralement admis que la culture des micro-organismes sur milieux synthétiques en laboratoire ne révèle qu'une mince portion de la population réelle des

écosystèmes naturels. L'émergence depuis quelques années de techniques moléculaires qui évitent le recours à la culture sur milieu synthétique, a ouvert de nouvelles perspectives aux problèmes liés à l'étude de la composition et des dynamiques de populations des écosystèmes microbiens riches et complexes. Ces techniques dites «culture-indépendantes», permettent d'obtenir un aperçu plus juste de la composition microbienne d'un écosystème puisqu'il est difficile voire impossible, pour plusieurs espèces microbiennes, de les cultiver en laboratoire. Ces organismes viables mais non cultivables (VNC) représenteraient une grande majorité des micro-organismes composant les écosystèmes naturels. Suite à des études en écologie moléculaire, on estime d'ailleurs entre 1 et 5 % seulement les espèces microbiennes qui ont été isolées (Hunter-Cevera 1998). Olsen *et al.* (1986) ont été parmi les premiers à proposer une approche moléculaire sans avoir recours à la culture en laboratoire pour l'étude des populations microbiennes naturelles. Parmi les techniques moléculaires «culture-indépendantes» les plus couramment utilisées dans l'étude de la composition et de la diversité des écosystèmes microbiens, on retrouve la technique du polymorphisme de fragments de restriction terminaux ou *Terminal-restriction fragment length polymorphism* (T-RFLP), la technique d'électrophorèse en gradient de dénaturant ou *Denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) et la technique de l'hybridation in situ en fluorescence ou *fluorescence in situ hybridization* (FISH).

La technique T-RFLP

La technique T-RFLP est une technique couplant l'amplification PCR avec un système de séquençage automatique qui permet la détection par laser des fragments d'ADN marqués en fluorescence (Marsh 1999). Cette technique est basée sur la digestion par des endonucléases de restriction de produits d'amplification PCR contenant un marqueur fluorescent à leur extrémité 5'. L'ADN extrait de l'échantillon est amplifié par PCR en utilisant des amorces homologues aux régions conservées du gène cible, habituellement le gène codant pour l'ARNr 16S. Une des amorces contient un marqueur fluorescent à son extrémité 5'. Les amplicons générés sont alors digérés par une enzyme de restriction. Les fragments d'ADN provenant de la digestion sont ensuite migrés dans un gel d'électrophorèse de polyacrylamide ou dans un appareil automatique d'électrophorèse capillaire muni d'un détecteur de fluorescence permettant la détection seulement des fragments terminaux marqués. Un programme d'analyse des patrons de fragments de restriction terminaux peut finalement être utilisé afin de comparer de façon numérique les patrons de différents échantillons (Kitts 2001).

La technique DGGE

La technique DGGE quant à elle, est une technique aussi basée sur l'amplification PCR, généralement de l'ADNr 16S, appliquée à un échantillon contenant une population mixte d'espèces bactériennes (Muyzer *et al.* 1993, Muyzer et Smalla 1998). Initialement, l'ADN total provenant de l'ensemble des espèces retrouvées dans l'échantillon est extraite (Fig. 6).

L'amplification PCR est ensuite réalisée à l'aide d'amorces spécifiques aux régions conservées de l'ADNr 16S permettant de générer des amplicons le plus souvent inférieurs à 800 paires de bases. Une pince GC (*GC-clamp*) riche en guanine et cytosine est attachée à l'extrémité 5' d'une des amorces afin d'améliorer la migration des amplicons dans le gel d'électrophorèse et d'éviter la dissociation complète des brins d'ADN sous l'influence de l'agent dénaturant. Les amplicons produits sont ensuite migrés dans un gel d'électrophorèse à base de polyacrylamide contenant un gradient de dénaturant (urée – formamide) linéaire (TGGE : lorsque la température est l'agent dénaturant). Les amplicons provenant d'espèces différentes possèdent également des différences au niveau de leur séquence nucléotidique. Ces différences auront un impact sur le profil de fusion de ces amplicons. Selon leur profil de fusion respectif, les différents amplicons seront plus ou moins influencés par le gradient de dénaturant et migreront à des positions distinctes dans le gel d'électrophorèse. Ainsi, les amplicons provenant d'une même espèce migreront à la même position alors que ceux d'espèces différentes migreront à des positions plus ou moins éloignées. Chacune des bandes du gel dénaturant correspond donc en principe à une espèce contenue dans l'échantillon étudié. Des profils DGGE peuvent donc être générés pour différents écosystèmes et ensuite être comparés entre eux. Il est également possible d'extraire les bandes du gel dénaturant et procéder au séquençage de l'amplicon pour connaître son affiliation taxonomique après alignement avec des séquences références (Muyzer 1999).

La technique FISH

Contrairement aux techniques T-RFLP et DGGE, la technique FISH n'est pas basée sur l'amplification PCR. Cette technique a été grandement utilisée en microbiologie environnementale afin d'étudier les écosystèmes microbiens complexes (Amann *et al.* 1995, 1996). Elle consiste essentiellement à : 1) la préparation de l'échantillon et à la fixation des cellules, généralement à l'aide de paraformaldehyde ; 2) l'immobilisation des cellules sur une lame de microscope, généralement recouverte de téflon ; 3) des traitements afin d'accroître la perméabilité des cellules (facultatif) ; 4) l'hybridation in situ à l'aide de sondes oligonucléotiques marquées en fluorescence (Giraffa et Neviani 2001). Après l'hybridation, les lames sont observées au microscope en épi-fluorescence. Cette technique utilisant des sondes moléculaires a l'avantage contrairement aux techniques classiques de culture, d'être rapide, spécifique et applicable à des cultures mixtes, en plus de permettre la détermination de bactéries VNC. La technique FISH a récemment été appliquée avec succès pour la caractérisation d'un biofilm composée d'espèces mixtes de bactéries à Gram positif et négatif en utilisant une approche multiplex permettant la détection jusqu'à six espèces différentes simultanément (Thurheer *et al.* 2004).

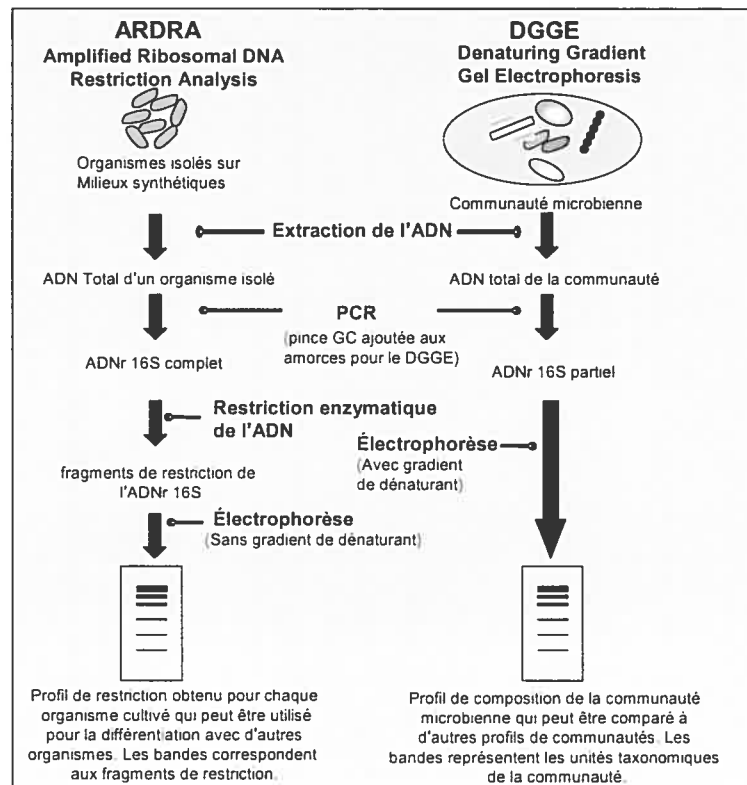


Figure 6. – Illustration des techniques ARDRA et DGGE utilisées pour caractériser les micro-organismes et les communautés microbiennes

Techniques utilisées en laboratoire pour la visualisation du biofilm

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été largement utilisée pour l'observation du biofilm (An et Friedman 1997). Elle permet l'observation du biofilm à une haute résolution contrairement aux techniques de microscopie optique et permet donc de visualiser les composantes du biofilm avec un fort grossissement. Cependant, comme cette technique opère sous vide élevé et requiert généralement une coloration aux métaux lourds, les spécimens doivent être déshydratés. Comme la matrice du biofilm est largement

composée d'eau, de polysaccharides et d'autres composés, elle est sujette à produire des artefacts suite à la déshydratation. Cette caractéristique fait en sorte qu'il est difficile d'obtenir en MEB une représentation exacte de la structure du biofilm tel qu'il existe dans la nature à cause de la technique de préparation de l'échantillon (McLean *et al.* 2004).

La microscopie confocale au laser ou *scanning confocal laser microscope* (SCLM) a révolutionné la compréhension de l'arrangement cellulaire à l'intérieur du biofilm. Bien qu'elle n'offre pas une aussi bonne résolution que la MEB, la SCLM permet l'observation du biofilm vivant complètement hydraté en procédant à de multiples balayages à différents plans focaux à travers l'échantillon (Adair *et al.* 2000). La reconstruction assistée par ordinateur des images produites permet par la suite de faire une représentation tridimensionnelle du biofilm. Lorsque cette technique est couplée à la technique FISH, elle permet d'obtenir de l'information sur la composition microbienne du biofilm ainsi que sur sa structure tridimensionnelle, tout en utilisant une méthode de préparation qui offre un minimum de perturbation de l'échantillon (Manz *et al.* 1995). Il est également possible avec la technique FISH – SCLM de visualiser l'expression *in situ* de gènes notamment par l'utilisation d'un gène rapporteur tel que celui codant pour la protéine fluorescente verte ou *green fluorescent protein* (GFP). Le clonage du gène *gfp* en amont d'un promoteur responsable de l'expression d'un gène fonctionnel spécifique peut alors permettre de détecter *in situ* l'expression de ce gène à l'intérieur du biofilm (Stretton *et al.* 1998).

Méthodes utilisées pour la production *in vitro* du biofilm et l'évaluation du pouvoir antimicrobien

Les microbiologistes ont traditionnellement évalué l'efficacité des agents antimicrobiens en déterminant la concentration minimale inhibitrice ou *minimal inhibitory concentration* (MIC) et la concentration minimale bactéricide ou *minimal bactericidal concentration* (MBC) (Fux *et al.* 2005). La MIC et la MBC déterminent l'activité antimicrobienne des biocides sur des bactéries en suspension dans un liquide (cellules planctoniques). Or, les cellules sessiles du biofilm sont reconnues pour être plus tolérantes aux agents antimicrobiens que les cellules planctoniques (Costerton *et al.* 1999). Pour les produits biocides destinés à être utilisés dans des systèmes où il y a possibilité de formation d'un biofilm, l'évaluation de l'efficacité potentielle de ces produits devrait être réalisée en laboratoire sur des cellules adhérees sous forme de biofilm. Pour ce faire, une quantité appréciable de systèmes inspirés de différents environnements ont été utilisés pour la production de biofilms *in vitro*. Quelques uns des systèmes les plus utilisés sont listés au Tableau VII. Le problème avec la plupart de ces systèmes vient du fait qu'il est particulièrement difficile voire impossible de reproduire économiquement et dans un délai raisonnable, une multitude de biofilms équivalents pour l'évaluation de la susceptibilité vis-à-vis une large gamme de produits biocides. Or, parmi ces systèmes, on retrouve le système MBEC™. Ce système illustré à la Figure 7, a été mis au point par l'équipe du Dr Ceri de l'Université de Calgary (Canada).

Tableau VII. – Liste des principaux systèmes utilisés en laboratoire pour la production de biofilms

Systèmes	Exemple d'application rapportée	Références
Réacteur à réservoir avec agitation continue / <i>Continuously Stirred Tank Reactor</i> (CSTR)	Production de biofilms sur supports submergés en condition de culture chemostat pour l'étude de l'expression de gènes de bactéries de la cavité buccale	Burne <i>et al.</i> 1997
Appareil de Robbins modifié / <i>Modified Robbins Device</i> (MRD)	Production en conditions continues de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> pour étudier la résistance aux antibiotiques	Dominique <i>et al.</i> 1994, Giwerzman <i>et al.</i> 1991
Réacteur à disque rotatif / <i>Rotating Disk Reactor</i> (RDR)	Étude simulant l'environnement d'un bol de toilette pour la production de biofilm et l'évaluation d'agents biocides	Pitts <i>et al.</i> 2001
Réacteur à anneaux rotatifs / <i>Rotating Annular Reactor</i> (RAR)	Système permettant de simuler les conditions d'un système de distribution de l'eau pour évaluer la formation du biofilm, l'encrassement des surfaces et la bio-corrosion	Lawrence <i>et al.</i> 2000
Cellule d'adhésion dynamique / <i>Flow Cell Systems</i>	Étude de la dynamique d'attachement des bactéries à divers surfaces	Dalton <i>et al.</i> 1996
Système MBEC™ / <i>MBEC™ system</i> (<i>Calgary biofilm device</i>)	Étude de l'efficacité d'antibiotiques sur des biofilms d' <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	Ceri <i>et al.</i> 1999

Le système MBEC™ fait partie d'une catégorie de système permettant la production de biofilms équivalents et reproductibles pour l'évaluation simple et simultanée de plusieurs agents biocides à différentes concentrations. Le système consiste en une micro-plaque de 96 puits équipée d'un couvercle sur lequel on retrouve 96 tiges venant s'insérer dans chacun des puits et sur lesquels les biofilms seront formés suivant l'incubation avec agitation d'une solution bactérienne déposée à l'intérieur des puits. Le système MBEC™ permet ainsi d'obtenir une valeur qui est une alternative à la MIC et la MBC, c'est à dire une valeur de concentration d'un biocide permettant l'élimination du biofilm. Cette valeur, est appelée la concentration minimale d'éradication du biofilm ou *minimal biofilm eradication concentration* (MBEC) (Ceri *et al.* 2001). Ce système a été utilisé avec succès notamment dans la caractérisation de la formation du biofilm et de la susceptibilité aux

biocides de *Mycobacterium phlei* (Bardouniotis *et al.* 2001) ainsi que pour une gamme de bactéries pathogènes d'animaux (Olson *et al.* 2002).



Figure 7. – Schéma du système MBECTM utilisé pour évaluer simultanément le pouvoir antimicrobien de plusieurs produits à de multiples concentrations sur des biofilms

CHAPITRE I

Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing

Lagacé, L.^{123*}, M. Pitre², M. Jacques³, D. Roy²⁺

¹Centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole Inc. 3600 boul. Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Qc. J2S 8E3. Canada. ²Centre de recherche et de développement sur les aliments. Agriculture et Agro-alimentaire Canada. 3600 boul. Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Qc. J2S 8E3. Canada. ³Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Qc. J2S 7C6, Canada.

+ Present address : Department of Food Science and Nutrition, Laval University, Qc, Canada G1K 7P4

Applied and Environmental Microbiology. 2004. 70:2052–2060

PRÉFACE AU CHAPITRE I

Ce chapitre décrit la composition de la communauté bactérienne de la sève d'érable obtenue grâce à la technique *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) et au séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, appliqués sur des isolats bactériens obtenus à la sortie de l'entaille à différentes périodes des saisons de coulée 2001 et 2002. Ce travail a été nécessaire afin de mettre à jour les connaissances sur le développement et l'identification de la flore microbienne de la sève à l'aide d'outils moléculaires, permettant ainsi de fixer les bases afin d'approfondir par la suite l'étude des communautés microbiennes de la sève et du biofilm.

Le manuscrit présenté à ce chapitre a été écrit entièrement par moi-même. J'ai également procédé à l'élaboration du design expérimental, à la supervision de l'échantillonnage et à la standardisation des techniques. J'ai réalisé une bonne partie des travaux de laboratoire et effectué l'analyse complète des résultats. La contribution de Mme M. Pitre se situe au niveau technique par son assistance à l'application de la technique ARDRA et au séquençage. Dr M. Jacques et Dr D. Roy ont tout les deux supervisé les travaux et édité le manuscrit qui a été publié dans *Applied and Environmental Microbiology*.

ABSTRACT

The bacterial community of maple sap was characterized from samples obtained at the taphole of maple trees for the 2001 and 2002 seasons. Among the 190 bacterial isolates, 32 groups were formed according to the similarity of the banding patterns obtained by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). A subset of representative isolates for each ARDRA group was identified by 16S rRNA gene fragment sequencing. Results showed a wide variety of organisms with 22 different genera encountered. *Pseudomonas* and *Ralstonia* of the gamma and beta *Proteobacteria* respectively, were the most frequently encountered genera. Gram-positive bacteria were also observed and *Staphylococcus*, *Plantibacter* and *Bacillus* were the most highly represented genera. Sampling period corresponding to 50% of the cumulative sap flow percentage presented the highest bacterial diversity according to its Shannon diversity index value (1.1). Gamma *Proteobacteria* were found to be dominant almost from the beginning of the season to the end. These results are providing interesting insights on maple sap microflora that will be useful for further investigation related to microbial contamination and quality of maple products and also for guiding new strategies on taphole contamination control.

INTRODUCTION

Maple sap is collected from maple trees (*Acer saccharum* Marsh.) during the spring season for the production of maple syrup and other maple products. The sap is a solution containing between 1 to 5.4% solids composed of different organic compounds such as sucrose, glucose, fructose, organic acids, nitrogenous and phenolic compounds as well as different minerals (19). This solution is known to be a good nutrient medium for microorganisms, and their growth in the sap will eventually affect the quality of maple syrup and other end products (15, 18, 21). These microorganisms can enter the sap notably by unsanitary tapping, as the taphole constitutes their first point of entry into maple sap. They will after grow in the sap as it progresses in the tubing collection system and storage tanks. Since a number of years, taphole microbial contamination has been a subject of interest for scientists and people involved in maple syrup production. Solutions to control this contamination have been proposed without any real success. Nevertheless, bacteria have already been found predominant in the sap compared to yeasts and moulds (15), and efforts have also been made in the past for their identification. The most significant work was reported by Sheneman and Costilow (25) who found several species of bacteria in the tapholes of maple trees consisting mainly of Gram-negative rod shape aerobic bacteria identified as *Pseudomonas*, *Achromobacter*, and *Flavobacterium*. Among them, *Pseudomonas geniculata* was the most frequently encountered species.

Since these pioneer works on maple sap microbiology, maple syrup production operations have significantly changed (10). Tapping procedures now uses smaller spouts made of plastic materials instead of larger metallic spouts. Maple sap collection procedures also differ from historical ones by using plastic tubing and vacuum instead of metal buckets. Added to the evolution of the sugarbush operations are the microbiological identification methods that have also considerably evolved over the years. Molecular tools for the identification of microorganisms are now of common use and the 16S rRNA gene analysis is intensively used in phylogeny studies. Among the 16S rRNA gene analysis methods, the amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) has been successfully used for bacterial community analysis in a great variety of environments including food (2, 7, 22, 23).

All these changes are contributing to the need of updated information on microbial ecology of maple sap. Therefore, the aim of this work was to analyze the culturable bacterial community of maple sap coming out of the taphole by molecular techniques. Better knowledge of sap bacterial composition will undoubtedly contribute to improve control strategies to prevent taphole contamination.

MATERIALS AND METHODS

Maple sap sampling

Microbial contamination of maple sap was assessed by performing bacterial counts on samples aseptically collected from the tapholes. Maple sap samples were collected during the 2001 and 2002 spring seasons at the Centre ACER experimental sugarbush located near the city of Victoriaville (Québec, Canada) in one of the world's biggest maple syrup production region. The samples were obtained from randomly selected tapholes at 5 different periods evenly distributed over the season in terms of sap volume percentage (0, 25, 50, 75 and 100%), determined by historical monitoring of seasonal sap yield. Tapping procedures were applied according to the current recommendations and no chemical products were used during tapping to prevent microbial contamination. For each sampling period, 10 samples were collected for a total of 50 samples per season. In order to collect sap sample from the taphole, the spout was delicately removed and a sterile device made of a spout and a test tube was inserted into the taphole to aseptically obtain 20 ml of sap by applying vacuum to the device. Sap samples were kept frozen at -20°C prior to analysis.

Bacterial counts and culture isolation

Bacterial counts were performed on each maple sap sample. Total aerobic counts were obtained by diluting the samples in 0.1% peptone water (Difco laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) and spread plating in duplicate on plate count agar (PCA) (Difco laboratories,

Detroit, MI, U.S.A.) supplemented with 0.5% of sucrose. Incubation was performed at 30°C for 48 hours followed by 7°C for 10 days to increase the differences in colony appearance. Bacterial isolates were obtained from PCA plates presenting between 30 and 150 colonies (between 1 to 8 colonies per sample). The isolates were picked to represent the widest variation of colony appearance (form, colour and texture) and then purified by 3 successive cultivations on tryptic soy agar (TSA) (Difco) at 30°C for 24 to 48 hours. Stock cultures were prepared in Brain heart infusion (BHI) (Difco) supplemented with glycerol and kept frozen at -80°C prior to use.

Total DNA extraction

The DNA of bacterial isolates was prepared according to the procedures of Vincent *et al.* (27) with the exception that for Gram-negative bacteria, no mutanolysin was used. The concentration of purified DNA was measured using Hoechst 33258 dye and a fluorometer (Hoefer DyNA Quant 200, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).

PCR amplification

Amplified 16S rRNA gene was obtained from each isolate and reference strain by PCR with the following universal primers: F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (2), and R1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (28) which are targeted to universally conserved regions and permit the amplification of an approximately 1500 bp fragment. PCR amplification was carried out in a Geneamp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CO, USA). Reaction tubes contained 25 ng (5µl) of DNA

extract, 1U of Taq DNA polymerase (Pharmacia Biotech), 1X buffer (10 mM Tris-HCl (pH9.0), 1.5 mM MgCl₂, 500 mM KCl), 10 mM dNTP, 20 pmol/μl of each primer. Initial DNA denaturation and enzyme activation steps were performed at 95°C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 56°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The presence and yield of specific PCR product (16S rRNA gene) was monitored by 1% agarose (w/v) (BioShop Canada) gel electrophoresis at 200V for 1 h in 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer and made visible by ethidium bromide staining and UV transillumination.

Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) procedure

Three restriction enzymes were selected on the basis of simulated digests of the complete 16S rRNA gene sequences of chosen reference strains retrieved from GenBank. These strains are listed along with the accession numbers in Table 1. The selection of the reference strains was based on a preliminary study performed in our laboratory on bacterial population of maple sap from which different isolates were identified (data not shown) using the API 20E and 20NE strips (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France). The enzymatic reactions were simulated via the NEB cutter software version 1.0 of the New England BioLabs website, using all commercially available enzymes. For digest experiments, cost-effective combinations of three enzymes were chosen, revealing clearly different (and thus by agarose gel electrophoresis clearly resolvable) restriction site polymorphisms in the reference strains sequences. Unpurified PCR products were each digested with the three selected restriction enzymes in separated reactions. The chosen enzymes were *RsaI*, *HaeIII*

and *AluI*. The digestions were performed for 2 h at 37°C in 20 µl reaction volumes containing 10 µl of the PCR product solution, 2 µl of the commercially supplied incubation buffer, 7.5µl water and 0.5 µl (10U/µl) of the restriction enzyme. Reaction products (10 µl) were run on a 2% agarose 1000 gel (GibcoBRL, Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) in 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer for 4 h at 250V under refrigeration. Gels were stained with ethidium bromide, made visible by UV transillumination, and digitalized with gel print 2000i system (Bio/Can Scientific Inc., ON, Canada). The images were analyzed with the GelCompar software (Molecular Analyst Software Fingerprinting Plus, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The background was subtracted by the rolling disk method, and the normalized patterns obtained with each enzyme were combined to obtain a single pattern for each isolate or reference strain. The patterns were used to construct a dendrogram by using the UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) clustering algorithm using the Pearson correlation coefficient along with the fine optimization option. Bacterial isolates showing the same banding pattern were assembled to form a group. After distribution of the isolates according to their group and the sampling period (Table 2), the bacterial diversity was calculated for each sampling period by the Shannon diversity index (17). For the diversity index calculation (Fig. 4), the following equation was used : $H = 1/N \sum - (\log N_i - \log N) N_i$, in which N represents the total number of isolates in a sampling period and N_i is the number of isolates for a single group.

Cloning, plasmid extraction and digestion

Amplified PCR products of representatives of each ARDRA group were randomly selected and ligated into the pCR2.1-TOPO cloning vector (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Ligated DNA was transformed into competent *E. coli* TOP10 cells (Invitrogen) by electroporation (Gene pulser Bio-Rad 25 μ F, 2.5 kV). To determine positive clones, plasmid inserts were extracted by the method of Holmes and Quigley (11) except that isopropanol precipitation of DNA was replaced by two successive precipitations with ammonium acetate 7.5M and ethanol 100%. The extracts were digested with the restriction endonuclease *Eco*RI. 2 μ l of the extracts were digested with 1U of the restriction endonuclease in a total volume of 20 μ l. The digestions were carried out as recommended by the manufacturer, with the appropriate restriction buffer at 37°C for 2 h. DNA fragments were resolved in 1% (w/v) agarose gels (BioShop Canada) with 1X Tris-acetate-EDTA buffer (TAE). DNA was visualised by transillumination with UV light after staining the gels with ethidium bromide. Plasmid DNA of positive clones were then purified with the QIAprep Spin Miniprep kit (Quiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the recommendations of the manufacturer.

16S rRNA gene partial sequencing and sequence analysis

PCR products obtained from 48 cloned bacterial isolates were sequenced using an Applied Biosystems 310 sequencer (ABI 310 DNA Sequencer, Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit, Perkin Elmer). Sequences of the PCR products (each 1500 pb)

obtained with the F27 and R1492 primers were partially sequenced using primers M13F (Invitrogen), 342R (16) and 800R (1). The partial sequences used to determine similarities were analyzed from the F27 primer to the conserved region corresponding to the following sequence: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGTAATAC-3', thus giving an approximately 525 bp fragment. The 16S rRNA gene sequences which have been determined in the present study were deposited in the NCBI database, and are available under the accession numbers shown in Table 2. The FASTA database of the European Bioinformatics Institute (EMBL), accessible on the internet (<http://www.ebi.ac.uk/fasta/>) was used to find nearly identical sequences for the 16S rRNA gene sequences determined. The ClustalW program, from the European Bioinformatics Institute (EMBL), accessible on the net (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) was used to align the sequences. Sequence dissimilarities were converted to evolutionary distances according to Jukes and Cantor (13). The construction of neighbour-joining tree (Fig. 4) (24) and bootstrap analysis of 500 resamplings (6) were performed using the Mega 2 software (version 2.1, Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

RESULTS

Taphole bacterial contamination

The log number of CFU per millilitre of sap directly obtained from maple tree tapholes was measured at 5 sampling periods over the 2001 and 2002 seasons to assess the change in the contaminating bacterial population (Fig. 1). Results show that bacterial contamination of the taphole was quite low at the beginning of the season, but that it progressively reached a higher concentration of bacteria from the middle of the season to the end. The 2001 samples contamination tended to be lower but not significantly different than the 2002 samples. The mean daily air temperatures during the 2001 and 2002 seasons were 6.2°C and 5.1°C respectively and the average sap volume per taphole obtained for 2001 and 2002 were relatively similar at 88 and 83 L/taphole respectively. The extent of the 2001 season was 42 days with 34 days of sap flow while the extent of the 2002 season was 56 days with 35 days of sap flow.

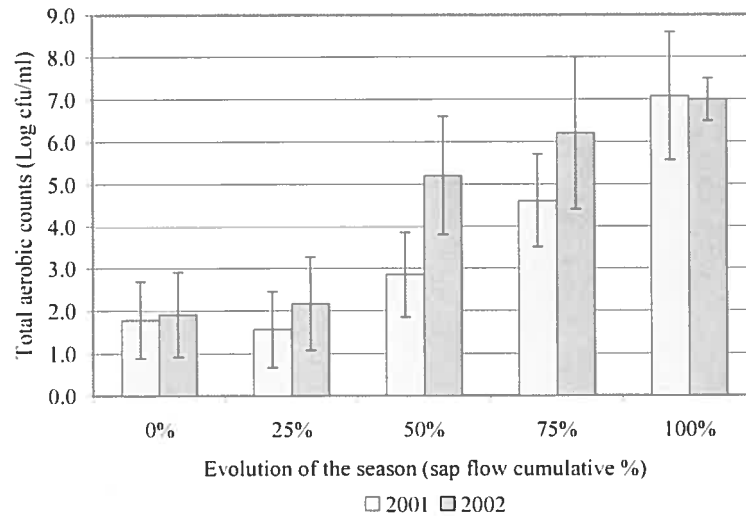


Figure 1. – Change in the contaminating bacterial population of the sap obtained from maple tree tapholes during the 2001 and 2002 seasons. Average results (n=10) are presented with standard deviations (bars) for each sap flow cumulative percentage.

ARDRA analysis on reference strains

The ARDRA method was first applied on reference strains obtained from ATCC (Table 1), to verify if the method was able to provide enough discrimination between the banding patterns of different genera and species of bacteria. The results of ARDRA analysis on reference strains (Fig. 2) show that the method was able to differentiate between reference strains at the genus level with a similarity lower than 50% between strains of different genus.

Table 1. – List of reference strains and accession numbers used for the ARDRA method development.

Name	ATCC number	Accession number
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	14150	–
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	AJ251468
<i>Pseudomonas putida</i>	12633	D84020
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13525	D84013
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	9446	AF094723
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	11426	AB021414
<i>Burkholderia thailandensis</i>	700388	U91838
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	19374	AB021404
<i>Alcaligenes latus</i>	29712	D88007
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	43272	D84004
<i>Kocuria rosea</i>	186	X87756
<i>Rhizobium rhizogenes</i>	11325	D12788
<i>Burkholderia cepacia</i>	25416	M22518
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	X06684
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	29837	D16144
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	29897	M58773
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	13253	M58776
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7966	X60404
<i>Alcaligenes faecalis</i>	8750	M22508

The method was also able to differentiate between species of the same genus like *Pseudomonas* where similarity was 70% or less. Species of the genus *Burkholderia* and *Chryseobacterium* seemed to be harder to differentiate with similarities ranging between 70% and 80%.

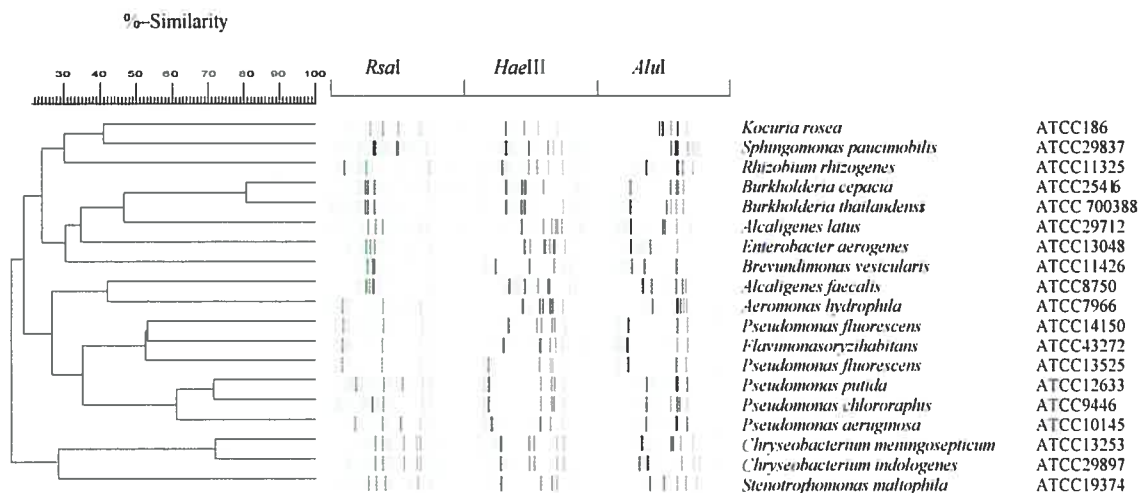


Figure 2. – Agarose gel-generated ARDRA dendrogram illustrating the relationship (similarity %) between different reference bacterial strains obtained from ATCC that were used for the ARDRA method development. ARDRA banding patterns were obtained by independent digestion of the amplified 16S rRNA gene with *RsaI*, *HaeIII* and *AluI* endonucleases. The dendrogram was constructed with the Molecular Analysis Software Fingerprinting Plus and grouped with the unweighted pair group algorithm with arithmetic average (UPGMA).

ARDRA analysis and 16S rRNA gene partial sequencing on maple sap bacterial isolates

As described for the reference strains, 190 maple sap isolates obtained from each of the sampling period of the 2001 and 2002 seasons were subjected to ARDRA analysis by digesting the amplified 16S rRNA gene with *RsaI*, *HaeIII* and *AluI*. Similar banding patterns obtained after combination of the three independent digestions were grouped (Fig. 3) to finally obtain a total of 32 groups. Representatives of each group were selected for cloning and partial 16S rRNA gene sequencing so as to retrieve sequence similarity and bacterial identity from sequence databases (Table 2). As shown in figure 3, each group presented a specific banding pattern and groups further known to be of different genus

(Table 2) were clearly differentiated with a similarity lower than 70%. However, exceptions were found for groups 24, 25 and 31 where the similarity was between 70% and 80% and for groups 21 and 22 where similarity was higher than 90%. These later groups were further known to be of different genus after 16S rRNA gene partial sequencing (Table 2) and nevertheless, gave relatively similar banding patterns.

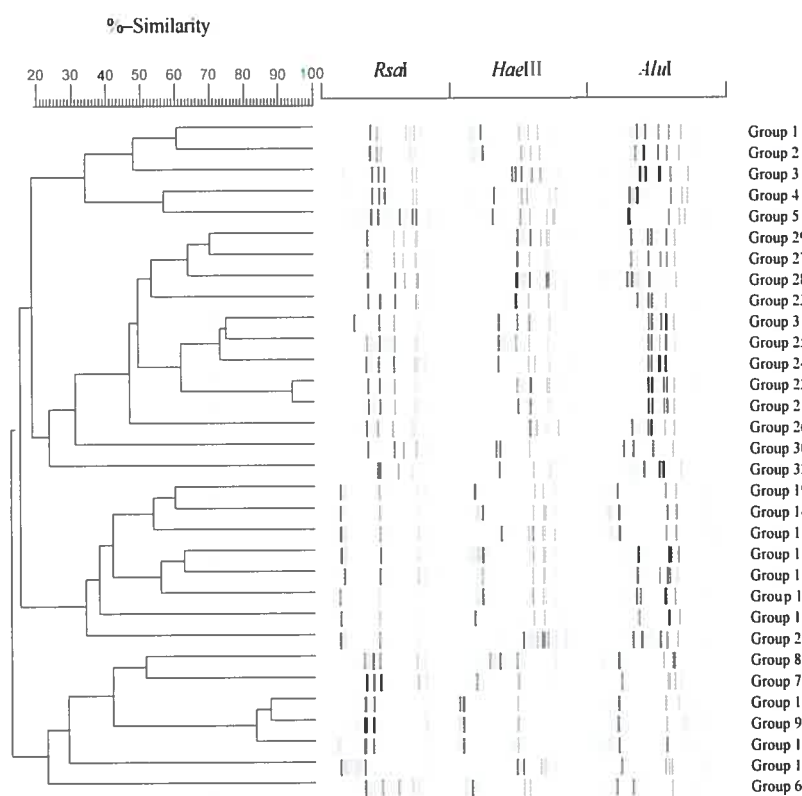


Figure 3. – Dendrogram of maple sap bacterial isolates representing each ARDRA groups. ARDRA banding patterns were obtained after independent restriction digestion of the amplified 16S rRNA gene with three different enzymes (*RsaI*, *HaeIII*, *AluI*). The dendrogram was constructed with the Molecular Analysis Software Fingerprinting Plus and grouped with the unweighted pair group algorithm with arithmetic average (UPGMA).

Some groups formed according to ARDRA analysis were more easily distinguishable and have been differentiated at the species level. For instance, groups among the *Pseudomonas* genus (groups 13 – 19) had a similarity lower than 65% and were clearly differentiated. After partial sequencing of the 16S rRNA gene corresponding to a 525 bp fragment coding for the hypervariable V1, V2 and V6 regions (8) of ARDRA groups representatives, closest identity of isolates were retrieved from sequence databases. Identity results showed a strong similarity with library sequences close to 100% for each isolate (Table 2). Some isolates like those of group 9, were strongly related to library sequences with 100% similarity. Relatedness between maple sap isolates sequences is demonstrated in Figure 4 where isolates were clustered according to the organism class. Isolates were therefore clustered in 6 different classes : *Actinobacteria*, *Bacilli*, beta and gamma *Proteobacteria*, *Flavobacteria* and *Sphingobacteria*. *Actinobacteria* and gamma *Proteobacteria* encountered the most number of different ARDRA groups with 12 and 9 respectively.

Table 2. – List of bacterial isolates obtained in this study representing each ARDRA group and their closest affiliation according to the V1, V2 and V6 hypervariable regions (8) partial sequencing (525 bp) of 16S rRNA gene.

Isolate	ARDRA group	Source ^a	Accession no.	Closest EMBL library strains and accession no.	Similarity (%)
MSB2122	1	75% – 2001	AY275474	<i>Pedobacter cryoconitis</i> AJ438170	97.8
MSB2100	2	75% – 2001	AY275473	<i>Pedobacter cryoconitis</i> AJ438170	97.4
MSB3023	3	50% – 2002	AY275498	<i>Pedobacter</i> sp. AF385531	94.8
MSB3020	4	50% – 2002	AY275497	<i>Chryseobacterium</i> sp. AY043370	97.1
MSB2060	5	50% – 2001	AY275475	<i>Flavobacterium indoltheticum</i> M58774	97.1
MSB3005	6	0% – 2002	AY275496	<i>Paenibacillus borealis</i> AJ011322	98.3
MSB2004	7	0% – 2001	AY275491	<i>Ralstonia eutropha</i> AF027407	97.9
MSB2010	7	0% – 2001	AY275489	<i>Ralstonia</i> sp. AF500587	98.8
MSB2080	7	50% – 2001	AY275490	<i>Ralstonia taiwanensis</i> AF300324	98.5
MSB2054	8	50% – 2001	AY275495	<i>Bacillus cereus</i> AY138278	99.8
MSB2047	8	50% – 2001	AY275493	<i>Bacillus cereus</i> AY138271	99.6
MSB2029	8	25% – 2001	AY275494	<i>Bacillus cereus</i> AY138273	99.8
MSB2042	9	50% – 2001	AY275501	<i>Staphylococcus warneri</i> Z26903	100.0
MSB2065	9	50% – 2001	AY275502	<i>Staphylococcus warneri</i> Z26903	100.0
MSB2016	9	0% – 2001	AY275500	<i>Staphylococcus warneri</i> Z26903	100.0
MSB2005	10	0% – 2001	AY275504	<i>Staphylococcus epidermidis</i> AF269927	99.8
MSB2032	10	25% – 2001	AY275505	<i>Staphylococcus caprae</i> AB009935	99.6
MSB2024	11	25% – 2001	AY275503	<i>Staphylococcus</i> sp. X86640	98.9
MSB2146	12	100% – 2001	AY275492	<i>Brenneria alni</i> AJ223468	96.8
MSB2071	13	50% – 2001	AY275482	<i>Pseudomonas graminis</i> Y11150	99.8
MSB2083	13	75% – 2001	AY275480	<i>Pseudomonas</i> sp. AY131214	99.6
MSB2084	13	75% – 2001	AY275481	<i>Pseudomonas graminis</i> Y11150	99.8
MSB2019	13	25% – 2001	AY275479	<i>Pseudomonas</i> sp. AB013843	99.8
MSB2074	14	50% – 2001	AY275484	<i>Pseudomonas</i> sp. AF177916	99.8
MSB2111	14	75% – 2001	AY275485	<i>Pseudomonas fulgida</i> AJ492830	100.0
MSB2037	15	50% – 2001	AY275476	<i>Pseudomonas syringae</i> AB001446	100.0
MSB2015	15	0% – 2001	AY275477	<i>Pseudomonas syringae</i> AB001450	99.8
MSB2018	15	0% – 2001	AY275478	<i>Pseudomonas syringae</i> AB001445	99.8
MSB2097	16	75% – 2001	AY275483	<i>Pseudomonas</i> sp. AY131221	99.0
MSB2082	17	75% – 2001	AY275488	<i>Pseudomonas</i> sp. AF511509	98.7
MSB2046	18	50% – 2001	AY275486	<i>Pseudomonas</i> sp. AF408942	99.8
MSB2138	19	100% – 2001	AY275487	<i>Pseudomonas</i> sp. AF408867	97.7
MSB3007	20	0% – 2002	AY275499	Uncultured gamma proteobacteria AF424755	99.8
MSB2139	21	100% – 2001	AY275509	<i>Plantibacter flavus</i> AJ310417	100.0
MSB2110	21	75% – 2001	AY275508	<i>Plantibacter flavus</i> AJ310417	99.8
MSB3012	22	50% – 2002	AY275519	<i>Agreia</i> sp. AF513393	97.4
MSB2127	23	75% – 2001	AY275511	<i>Frigoribacterium</i> sp. AF157479	99.8
MSB2131	23	75% – 2001	AY275510	<i>Frigoribacterium</i> sp. AF157479	99.8
MSB2040	24	50% – 2001	AY275514	<i>Arthrobacter rhombi</i> Y15885	96.2
MSB2038	25	50% – 2001	AY275512	<i>Micrococcus luteus</i> AF057289	99.6
MSB3029	25	50% – 2002	AY275513	<i>Micrococcus luteus</i> AF057289	99.8
MSB2098	26	75% – 2001	AY275515	<i>Microbacterium</i> sp. AJ391205	100.0
MSB2114	27	75% – 2001	AY275516	<i>Sanguibacter suarezii</i> X79451	100.0
MSB3037	28	50% – 2002	AY275520	<i>Cellulomonas flavigena</i> AF140036	96.8
MSB3004	29	0% – 2002	AY275506	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> AJ312209	99.8
MSB2033	30	25% – 2001	AY275507	<i>Brevibacterium casei</i> X76564	99.2
MSB3008	31	0% – 2002	AY275518	<i>Rothia dentocariosa</i> AF543276	99.6
MSB3003	32	0% – 2002	AY275517	<i>Rhodococcus erythropolis</i> AY147846	99.8

^a Source, sap flow cumulative percentage and season

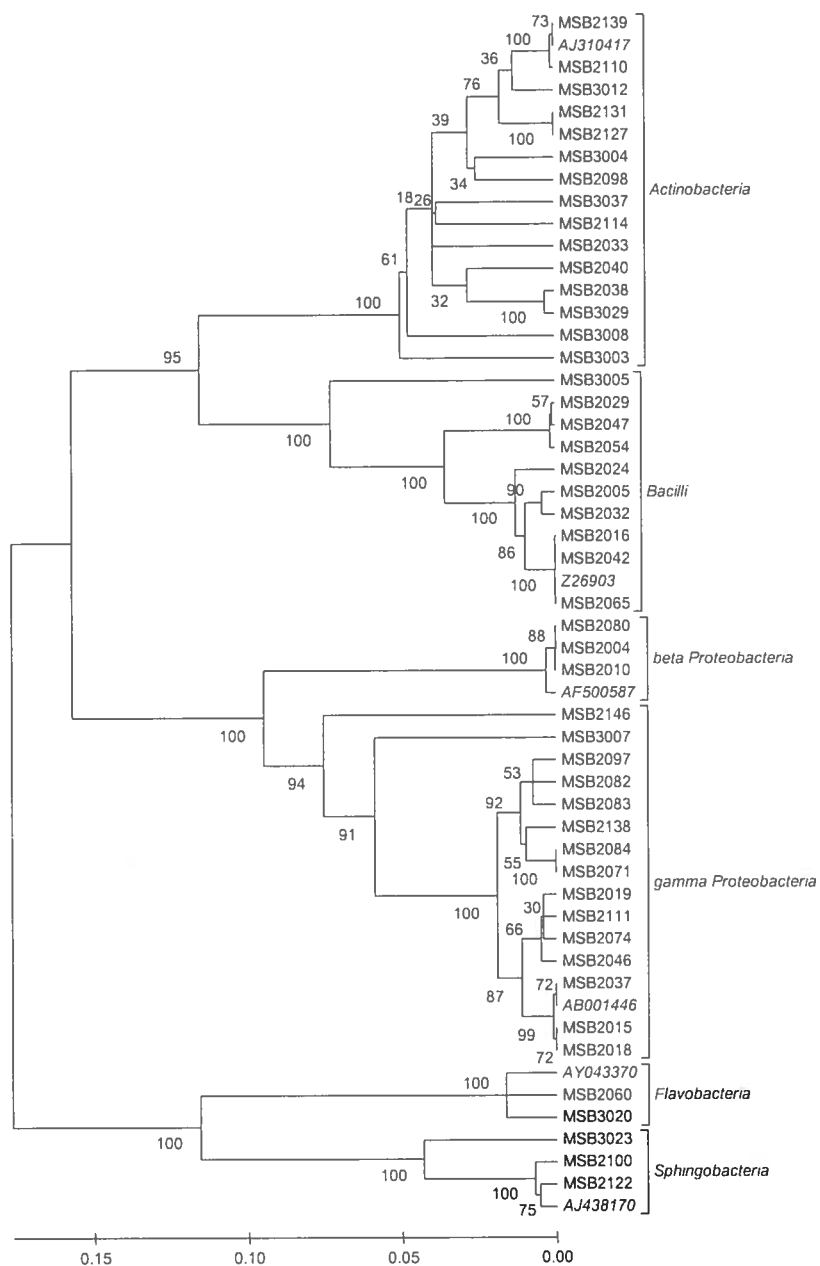


Figure 4. – Phylogenetic tree of 48 maple sap bacterial isolates based on 16S rRNA gene partial sequences. Bootstrap consensus tree (50% cut-off value) was constructed by using the unweighted pair group algorithm with arithmetic average (UPGMA).

Distribution and diversity of maple sap isolates

Results in Table 2 demonstrated a wide variety of organisms with 22 different genera encountered. Gram-negative isolates were more frequently encountered with 140 isolates compared to 50 for Gram-positive. Distribution of maple sap isolates according to groups and the evolution of the sap flow season (Table 3) revealed that groups 7, 13, 14 and 15 had the most numerous amount of isolates and that these groups belonged to Gram-negative organisms corresponding to *Ralstonia* and *Pseudomonas* genera. For Gram-positive, groups 9, 21, 10 and 8 were the most highly represented with less than 7 % total frequency. These later groups corresponded to *Staphylococcus*, *Plantibacter* and *Bacillus* genera. Sampling periods corresponding to 50 and 75 sap flow cumulative % had the highest number of isolates with 59 and 49 respectively.

Table 3. – Maple taphole bacterial isolates distribution according to ARDRA groups, restriction patterns and the evolution of the season as determined by the cumulative sap flow percentage.

Group no.	ARDRA banding patterns according to restriction enzymes used			Number of isolates for each sampling period (cumulative sap flow percentage)					Group total frequency (%)
	<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>AluI</i>	0%	25%	50%	75%	100%	
1	A	A	A				2		1.1
2	B	A	A				1		0.5
3	C	B	B			1			0.5
4	C	D	D			1			0.5
5	D	C	C			1			0.5
6	E	E	E	1					0.5
7	F	F	F	10	3	8	15	1	19.5
8	F	G	G	1	1	3			2.6
9	G	H	H	1	1	4	3	3	6.3
10	G	H	I	1	2	1	1	1	3.2
11	G	H	J		1				0.5
12	H	I	K					4	2.1
13	I	J	L		1	4	6	10	11.1
14	I	J	M		4	17	9	7	19.5
15	I	J	N	4	2	6	4	9	13.2
16	I	J	O				1		0.5
17	I	K	L				1		0.5
18	I	L	M			3	1	2	3.2
19	I	M	M					1	0.5
20	I	N	P	1					0.5
21	J	O	Q			2	1	4	3.7
22	J	P	Q			1			0.5
23	J	Q	R				2		1.1
24	J	S	V			2			1.1
25	J	T	W			2			1.1
26	J	U	U				1		0.5
27	K	O	S			1	1	1	1.6
28	K	O	T			1			0.5
29	K	R	U	2		1			1.6
30	K	V	X		1				0.5
31	L	T	W	1					0.5
32	M	W	Y	1					0.5
Total	–	–	–	23	16	59	49	43	100.0

According to Figure 5, all 6 classes of bacteria were only encountered at mid-season and the gamma *Proteobacteria* class has dominated from 25% of cumulative sap flow to the end of the season. Diversity as indicated by the Shannon diversity index (H), was the

highest at 1.1 at mid-season and was less at the beginning and at the end according to Figure 5.

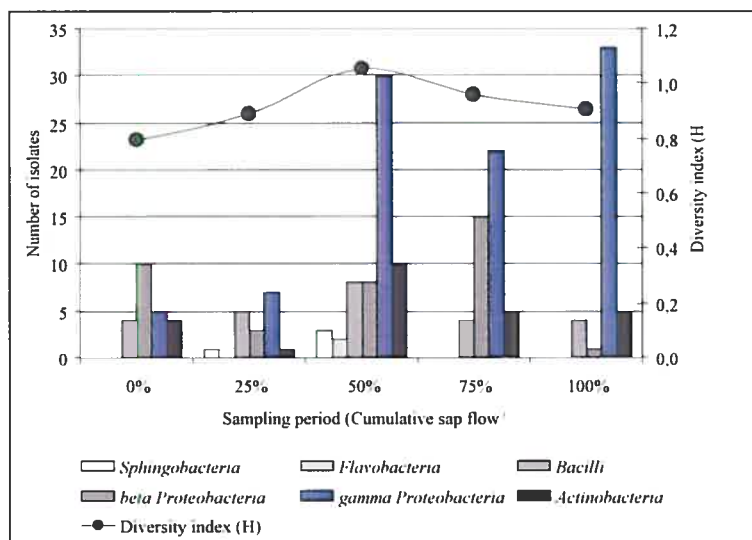


Figure 5. – Change in the maple taphole bacterial composition over the sap flow season. Composition of the taphole bacterial community is described by the different classes of bacteria and the Shannon diversity index (H) for each sampling period (Cumulative sap flow percentage).

DISCUSSION

Bacterial contamination of maple sap obtained from the taphole was assessed in this study. Results obtained emphasize the need to elaborate strategies to control microbial contamination of the taphole, since this contamination will serve as inoculum for the sap collection and holding system. Research in the past has demonstrated that microorganisms can adversely affect the quality of maple syrup (5, 15, 18, 21). This quality is primarily based on the colour, flavour and texture of maple syrup. Microorganisms of maple sap have the ability to break down the sucrose molecule, the main organic component of the sap, into glucose and fructose subunits. These latter sugar molecules will then react during the heat evaporation process to produce darker syrup and intense caramel flavour through nonenzymatic browning reactions (caramelization and Maillard reaction). Microorganisms contaminating the maple tree taphole will also decrease, at least in part, the flow of sap by blocking the wood vessels resulting in a shortage of productivity (26). Better knowledge of taphole contamination would bring interesting insight that could help determine contamination control strategies. For instance, control could be oriented against microorganisms having a negative impact on the quality of maple sap and/or to promote the presence of microorganisms having a positive impact. The data obtained on maple sap microflora will permit to go further into this type of investigation.

In this way, results obtained in this study have demonstrated the great bacterial diversity of the maple taphole. Gram-negative were among the prevailing bacteria and gamma *Proteobacteria* including the *Pseudomonas* genus were most frequently encountered. This observation was also noted by Sheneman and Costilow (25) who have found that *Pseudomonas geniculata*, now known as *Pseudomonas fluorescens* biotype G, was dominant in maple taphole when old techniques of production were applied. The presence of *Pseudomonas geniculata* in maple sap has already been found to enhance the characteristic flavour of maple syrup (20, 29). Our results showed that the ARDRA method was able to differentiate the *Pseudomonas* genera from others and that it was also useful for the discrimination of other genera and species of bacteria. The presence of the genus *Pseudomonas* was expected due to its importance in natural ecosystems in relation notably with the degradation of xenobiotic compounds, its effect as a plant pathogen and its plant growth-promoting activities (9, 12). Our study also reports the important presence at the maple tree taphole of beta *Proteobacteria* from the genus *Ralstonia* (group 7) observed throughout the season. This genus was not reported in previous publications. The only reported genus closed to *Ralstonia* was *Achromobacter* which is also part of the beta *Proteobacteria* class (25).

A total of 32 patterns were identified among the 190 isolates from maple taphole. The 32 ARDRA patterns represented organisms belonging to six bacterial divisions, namely *Actinobacteria*, *Bacilli*, beta and gamma *Proteobacteria*, *Flavobacteria* and

Sphingobacteria, *Actinobacteria* and gamma *Proteobacteria* encountered the most number of ARDRA groups. The community diversity in maple sap was observed by determining phylotype richness, distribution, and similarity for 32 16S rRNA gene clones from each ARDRA group. Our results are in agreement with previous studies using conventional microbiological methods. Looking at our results, some analogies could be made with the bacterial community of maple sap and those observed for the forest soils. For instance, Morselli and Whalen (18) have demonstrated that the wood tissue of a healthy maple tree is sterile or practically sterile suggesting that contamination of the taphole would necessarily come from the surrounding environment of the tree. Thus, microorganisms encountered in the forest soil could possibly contaminate the tree bark and find their way into the taphole and consequently into maple sap. The rhizosphere is a dynamic niche containing complex microbial communities and microbial members may participate in a variety of beneficial and detrimental interactions with plants. Bacterial community members of rhizosphere from British Columbia (Canada) forest soils were characterized by DNA sequence analysis of 16S rRNA gene fragments following direct DNA isolation from soil, polymerase chain reaction amplification and cloning. Phylogenetic analyses revealed that 85% of 709 16S rRNA gene clones were classified as alpha, beta, gamma, and delta *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* group, *Acidobacterium*, and *Verrucomicrobia*. Members of the *Proteobacteria* had an important contribution representing 55% of the clone library (4).

In addition, the predominant presence of *Proteobacteria* and Gram-positives such as *Bacilli* and *Staphylococci* isolated from the maple taphole may be due in part to the use of aerobic-growth media. Kasahara and Ahttori (14) observed that in a study of two soils in Japan, 71% of the isolates that formed visible colonies within 18 h of incubation were members of the Gram-positive species. As the length of incubation period increased, the relative abundance of Gram-positive organisms in the total collection of isolates decreased. This observation might explain in part our results on dominant members of maple sap microflora and on its diversity.

This study examined the cultivable bacterial community of maple sap using the amplified ribosomal DNA restriction analysis method and 16S rRNA gene fragment sequencing. Results showed the great diversity of this bacterial community by the large number of ARDRA patterns observed in relation to the evolution of the sap flow season. After partial 16S rRNA gene sequencing, identity of ARDRA group representatives was revealed. Although sugaring operations have significantly changed since earlier studies on maple taphole microflora, the members of the genus *Pseudomonas* are still dominant in this environment. Dominance of the genus *Ralstonia* was also observed which has not been reported before. Our results are also showing a greater bacterial diversity than previous work. For instance, an analogy was made between the bacterial community profile of the maple taphole and the bacterial community of forest soil rhizosphere. These results are providing interesting insights into maple taphole microflora that will be useful for further

investigations on phenomena related to microbial contamination and quality of maple products, and also on microbial control strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the centre ACER research fund (St-Hyacinthe, Qc., Canada) and Agriculture and Agri-food Canada (Ottawa, On., Canada). We thank Carmen Charron, Mélissa Cournoyer and René Desruisseaux for their technical work on samples collection and microbial counts.

REFERENCES

1. **Anzai, Y., K. Hongik, J. Y. Park, H. Wakabayashi, and H. Oyaizu.** 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1563–1589.
2. **Cambon-Bonavita, M. A., F. Lesongeur, S. Menoux, A. Lebourg, and G. Barbier.** 2001. Microbial diversity in smoked salmon examined by a culture-independent molecular approach – a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* **70**:179–187.
3. **Chèneby, D., L. Philippot, A. Hartmann, C. Hénalut, and J. C. Germon.** 2000. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FEMS Microb. Ecol.* **24**:121–128.
4. **Chow, M. L., C. C. Radomski, J. M. McDermott, J. Davies, and P. E. Axelrood.** 2002. Molecular characterization of bacterial diversity in lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**:347–357.
5. **Fabian, F. W., and Buskirk, H. H.** 1935. *Aerobacter aerogenes* as a cause of ropiness in maple syrup. *Ind. Eng. Chem.* **27**:349–350.
6. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.

7. **Giraffa, G., P. De Vecchi, and L. Rossetti.** 1998. Note: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *J. Appl. Microbiol.* **85**:918–924.
8. **Gray, M. W., D. Sankoff, and R. J. Cedergren.** 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **12**:5837–5852.
9. **Harayama, S., and K. N. Timmis.** 1989. Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*, p. 151–174. *In* D. A. Hopwood and K. F. Chater (ed), *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press, London.
10. **Heiligmann, R. B., M. R. Koelling, R. R. Morrow, L. Staats, L. Myott, G. Cook, G. Buzzell, and S. Williams.** 1996. Maple sap production – Tapping, collection and storage, p. 49–71. *In* M. R. Koelling and R. B. Heiligmann (ed), *North american maple syrup producers manual*, The Ohio State University.
11. **Holmes, D. S., and M. Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193–197.
12. **Johnsen, K., and P. Nielsen.** 1999. Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**:155–162.
13. **Jukes, T. H., and C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules, p. 21–123. *In* H.N. Munro (ed.) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.

14. **Kasahara, Y., and T. Ahttori.** 1991. Analysis of bacterial populations in a grassland soil according to rates of development on solid media. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**:95–102.
15. **Lagacé, L., C. Girouard, J. Dumont, J. Fortin, and D. Roy.** 2002. Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence. *J. Food Sci.* **67**:1851–1854.
16. **Lane, D.J.** 1991. 16S/23S rDNA sequencing, p. 115–176. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley & Sons, New York, N.Y.
17. **Legendre, L., and P. Legendre.** 1984. Les données qualitatives multidimensionnelles, p. 187–203. *In* *Écologie numérique, le traitement multiple des données écologiques*. Masson, Paris and les Presses de l'Université du Québec.
18. **Morselli, M. F., and M. L. Whalen.** 1991. Aseptic tapping of sugar maple (*Acer saccharum*) results in light color grade syrup. *Can. J. For. Res.* **21**:999–1005.
19. **Morselli, M. F., and M. L. Whalen.** 1996. Maple chemistry and quality, p.162–171. *In* M. R. Koelling and R. B. Heiligmann (ed), *North american maple syrup producers manual*, The Ohio State University.
20. **Naghski, J., L. L. Reed, and C. O. Willits.** 1957. Maple sirup. X. Effect of controlled fermentation of maple sap on the color and flavor of maple sirup. *Food Res.* **22**:176-181.

21. **Naghski, J., and C. O. Wilits.** 1957. Maple sirup XI. Relationship between the type and origin of reducing sugars in sap and the color and flavor of maple sirup. *Food Res.* **22**:567–571.
22. **Ross, I.L., Y. Alami, P. R. Harvey, W. Achouak, and M. H. Ryder.** 2000. Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related Pseudomonads isolated from wheat fields soils in south Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1609–1616.
23. **Roy, D., S. Sirois, and D. Vincent.** 2001. Molecular discrimination of Lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Curr. Microbiol.* **42**:282–289.
24. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
25. **Sheneman, J. M., and R. N. Costilow.** 1958. Identification of microorganisms from maple tree tapholes. *Food Res.* **24**:146–151.
26. **Sheneman, J. M., R. N. Costilow, P. W. Robbins, and J. E. Douglas.** 1958. Correlation between microbial populations and sap yields from maple trees. *Food Res.* **24**:152–159.
27. **Vincent, D., D. Roy, F. Mondou, and C. Déry.** 1998. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *Int. J. Food Microbiol.* **43**:185–193.

28. **Wang, G. C. Y., and Y. Wang.** 1996. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology* **142**:1107–1114.
29. **Willits, C. O., H. A. Frank, and R. A. Bell.** 1957. Maple sirup. XIX. Flavor and Color through controlled fermentation of maple sap. *Food Technol.* **15**:473-474.

CHAPITRE II

Compositions of maple sap microflora and collection system biofilms evaluated by scanning electron microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis

Lagacé, L.^{1,2*}, M. Jacques², A. A. Mafu³, and D. Roy⁴

¹Centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole Inc. 3600 boul. Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Qc. J2S 8E3, Canada.

²Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Qc. J2S 7C6, Canada.

³Centre de recherche et de développement sur les aliments, Agriculture et Agro-alimentaire Canada, 3600 boul. Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Qc. J2S 8E3, Canada. ⁴Département des sciences des aliments et nutrition, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec, Qc. G1K 7P4, Canada.

International Journal of Food Microbiology. 2006. 109:9–18

PREFACE AU CHAPITRE II

Ce chapitre rapporte les résultats obtenus d'une étude sur la diversité de la flore microbienne de la sève d'érable circulant dans le système de récolte par tubulure et du biofilm s'y développant, à l'aide de la technique DGGE et du séquençage de segments du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S des principales espèces composant cet écosystème. La technique utilisée a permis d'obtenir un portrait direct des variations spatiales et temporelles de la microflore de la sève et du biofilm du système de récolte sans avoir recours à la culture des micro-organismes en laboratoire. De plus, la microscopie électronique à balayage a permis d'obtenir des images de la surface de la tubulure et d'observer la formation du biofilm à différentes périodes de la récolte. Il s'agit du premier cas où la formation du biofilm dans les systèmes de récolte de la sève d'érable et sa caractérisation sont rapportées scientifiquement.

Je suis responsable de la rédaction complète du manuscrit présenté dans ce chapitre. J'ai procédé à l'élaboration du design expérimental, à la supervision de l'échantillonnage et à la standardisation des techniques. J'ai réalisé une bonne partie des travaux de laboratoire assisté du personnel technique du Centre ACER et effectué l'analyse complète des résultats. Dr M. Jacques et Dr D. Roy ont tout les deux supervisé les travaux et édité le manuscrit qui a été accepté pour publication dans *International Journal of Food Microbiology*. Le Dr A.A. Mafu a aussi participé à l'édition du manuscrit.

ABSTRACT

The bacterial microflora of maple sap and biofilms in collection system tubing were studied through the use of bacterial counts, scanning electron microscopy (SEM) of surfaces and the analysis of 16S rRNA gene by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Samples were taken at five times during the 2002 and 2003 seasons in order to follow the changes in the microflora of this complex ecosystem. Bacterial counts showed the growth of bacterial population of samples as the season advanced. These populations were mainly composed of psychrotrophic bacteria and *Pseudomonas* spp.. SEM results confirmed the suspected presence of biofilms on the inner surfaces of tubing samples. Bacterial colonization and biofilm formation progressively increased during the season for both lateral and main line surfaces, and biofilms were mainly composed of rod shape bacteria. The bacterial microflora profile obtained for sap and corresponding biofilm by DGGE showed up to 12 major bands. The Shannon-Weaver index of diversity (H) calculated from DGGE bands were statistically higher for sap samples compared to biofilm. The diversity index was relatively stable or increasing for lateral line samples (sap and biofilm) during the season while the diversity index for sap and biofilm samples of the main line showed a decreasing profile as the season progressed. Sequence analysis of major DGGE bands revealed the predominance of bacteria from the *Pseudomonas* genus as well as the *Rahnella* genus and other unidentified genus. The results describe the composition of sap collection system microflora as well as the formation of biofilms and will be useful for further studies on parameters contributing to the improvement of maple product quality.

Keywords: maple; sap; biofilm; DGGE; SEM

INTRODUCTION

Modern maple syrup production mainly involves collecting sap from stands of naturally growing maple trees (sugarbush) by drilling a small hole (taphole) in the trunk of each tree, collecting the exuded sap with a plastic tubing system under vacuum, concentrating sap by reverse osmosis and heating the concentrated sap to evaporate water and obtain the desired sugar concentration. Previously, sap was collected with buckets and transported to the sugar house. Use of modern collecting systems has greatly increased productivity by improving the practicability of the operation and increasing the volume of sap collected (18). However, productivity was increased without consideration of the quality of maple syrup. The quality, i.e. the colour, texture and taste of maple syrup, is mainly affected by microbial spoilage of maple sap (24, 29, 33). A recent study of the microflora of sap from tapholes, using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) of bacterial isolates, showed a wide variety of species, with *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Plantibacter* being the predominant genera (23). Since evaporation of water at high temperature is used to convert maple sap to syrup, most sap microorganisms are destroyed during this process. Therefore, microorganisms of maple sap do not affect the shelf life of maple syrup. Their impact on maple syrup is due solely to the degradation of constituents of sap before its transformation into syrup. Such degradation will generally lead to the production of a low quality maple syrup.

Sap collection systems usually remain in the sugarbush throughout the year. To facilitate the exploitation of large areas of sugarbush, tubing systems are relatively complex, often with several branches, numerous junctions and tubing of various sizes. This complexity

makes it difficult for producers to apply frequent and efficient washing and sanitizing procedures that would prevent microbial growth on the inner surfaces of tubing lines, with consequent spoilage of sap. Washing of collection lines is generally carried out at the end of the season, by pumping a disinfectant solution (sodium hypochlorite) under pressure followed by thorough rinsing (18). Preliminary research results (15, 20, 21) and field experience suggest that the inner surfaces of sap collection tubing might be colonized by biofilms.

The formation of biofilms is responsible for persistent microbial contamination in many types of environment (16). In the food industry, biofilms can be detrimental to the safety and quality of food products, and process performance (4, 22, 28). For maple syrup production, biofilm forming on the inner surfaces of the sap collection tubing would serve as a reservoir for microorganisms that could contribute to constant contamination and degradation sap.

Evidence for the presence of biofilm in sap collection systems, and knowledge of its composition would give important insights on microbial contamination of maple sap. Several methods have been used for the study of biofilms. For instance, scanning electron microscopy (SEM) is a well established method for observing bacteria adhering to surfaces (1); and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified fragments of the 16S rRNA gene has been used in several studies as a cultivation independent method of assessing the microbial compositions of biofilms (12, 26, 32) and other ecosystems (5, 6, 10, 17, 25, 27, 35).

This study presents an analysis of the temporal changes during two collecting seasons of the bacterial communities of maple sap collection systems. For this purpose, the organisms

of maple sap and those attached to the surfaces for both lateral and main collecting lines were enumerated and examined by scanning electron microscopy (SEM) and DGGE of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments. The objective was to identify the microbes responsible for biofilm formation and subsequent contamination of maple sap, and the differences between microflora in different parts of the collection system and at different times.

MATERIALS AND METHODS

Sampling method

Samples of maple sap and tubing were obtained from the Centre ACER experimental sugarbush located near in St-Norbert, Québec, Canada. Sampling periods were based on historical sap yield monitoring. Samples were thus collected at different times of the season corresponding to percentages of the total volume of collected sap (0 %, 25 %, 50 %, 75 % and 100 %) for each of the 2002 and 2003 seasons. For sampling, one main line with a diameter of 2.1 cm and a length of 150 m was selected, to which 19 lateral lines 0.71 cm in diameter were attached to collect sap from 152 tapholes (8 tapholes/lateral line). For each sampling period, 5 sections of the main line each 15 cm long and 5 sections each 30 cm long from 5 randomly selected lateral lines were removed for analysis. Samples (500 ml) corresponding to each tubing sample were collected by intercepting sap at each tube sampling location. Since freezing does not significantly reduce the bacterial population (unpublished results), sap samples were kept frozen at -20°C before analysis. Tubing samples were stored at 4°C for less than 24 h before analysis. A data logger (model CR10, Campbell Scientific, Edmonton, Canada) located in the sugarbush was used to record the outside temperature hourly. At the end of each day and for the whole sap flow season, the volume of the sap collected from the group of trees being studied was measured and the sap sugar content was determined using an ABBE Mark II refractometer (Reichert Scientific Instruments, Buffalo, NY, USA).

Bacterial counts

Bacteria in each sap sample were enumerated. Serial ten-fold dilutions of the samples in 0.1% peptone water (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) were prepared. For total aerobic counts, 0.1 ml portions of suitable dilutions were spread plated in duplicate on plate count agar (Difco laboratories) supplemented with 0.5% sucrose, and the plates were incubated at 30°C for 48 h. Anaerobic counts were obtained as were the aerobic counts but with the plates being incubated anaerobically in anaerobic jars (BBL, Sparks, MD, USA). For psychrotrophic counts, plates prepared as for aerobic counts were incubated at 7°C for 10 days. For counts of *Pseudomonas*, plates of *Pseudomonas* agar with CFC (cetrimide, fucidin and cephaloridine) selective supplement (Oxoid, Nepean, On, Canada) were prepared as were plates for other counts, and were incubated at 30°C for 48 h. For tubing samples, the inner surface of each tube was swabbed for 30 s with a 9.4 mm critical foam head swab (VWR International, Montreal, QC, Canada) over an area of 15 cm². The swab was then transferred to a tube containing 15 ml of phosphate buffer (0.1M KH₂PO₄ and Na₂HPO₄, pH 7.0) and sterile glass beads (3 mm diameter), and the tube was thoroughly shaken for 30 s. Bacteria in the fluids from sponges were enumerated as for sap samples. The non parametric Friedman test was used at $\alpha = 0.05$ along with the Bonferroni adjustment comparison test (XLSTAT version 7.1, Addinsoft, Paris, France) to separate mean bacterial counts for tubing lines (lateral vs main), for sap and biofilm, and to separate the mean values for the different types of bacterial count (aerobic, psychotrophic, anaerobic and *Pseudomonas*).

Scanning electron microscopy (SEM) analysis of biofilms

Biofilms were visualized by SEM on pieces of tubes randomly cut from lateral and main line samples obtained for every sampling time during 2002 and 2003 seasons. Pieces of tubes 1 cm long were fixed for 3 h in 100 mM cacodylate buffer, pH 7.2 containing 2.5 % glutaraldehyde. Samples were then rinsed 8 times in 100 mM cacodylate buffer, for 1 h each time, before being dehydrated in serial dilutions of 30, 50, 80, 100 % ethanol for 15 min each concentration. Dehydrated samples were critical-point dried using a critical point dryer (SPI Supplies, West Chester, PA) and were immediately coated with gold using a sputter coater (Kurt J. Lesker Company, Clairton, PA). Fixed specimens of biofilms were visualized using a Hitachi S-3000N scanning electron microscope (Hitachi, Mountain View, CA).

DNA extraction

Nucleic acids were extracted using a modified protocol from a previously described one (23, 38). Pooled sap samples (2.5 L) from the same period were centrifuged at $12,000 \times g$ at 4°C for 50 min. The pellet was washed in a suspension buffer containing 12% sucrose and 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 and was resuspended in 1.6 ml of the same buffer. Lysosyme (16 mg; Boehringer Manheim Canada, Laval, Qc, Canada) was added to the suspension, which was incubated under gentle agitation for 2 h at 37°C . After the addition of 400 μl of 10% sodium dodecyl sulfate, 800 μl of 250 mM EDTA, pH 8.0 and 4 mg of proteinase K (Boehringer Manheim), the solution was incubated under gentle agitation for 1 h at 55°C . After incubation, 800 μl of a solution of 10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide in

0.7 M NaCl (CTAB/NaCl solution) and 960 μ l of 5 M NaCl were also added. The mixture was incubated at 65°C for 20 min. DNA was extracted 3 times with 5.6 ml of chloroform/isoamyl alcohol, 24:1 (v/v). DNA was precipitated from the aqueous supernatant by adding an equal volume of isopropanol, storing at -80°C for 1 h, and centrifugating for 15 min at 13,000 \times g. The DNA pellet was washed in 200 μ l of 70% ethanol and resuspended in 20 μ l of deionized water. The concentration of purified DNA was measured using Hoechst 33258 dye and a fluorometer (Hoefer DyNA Quant 200; Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Tubing was sampled using the same swabbing protocol as for bacterial counts. The dislodged biofilms from tubing replicates of the same sampling period and type of surface (lateral or main line) were combined in a sterile vial. The swab was also thoroughly rinsed with the suspension buffer into the same vial. DNA was then extracted as for sap samples.

PCR amplification

Gene segments of the 16S rDNA were amplified with primers gc-P63f and P518R, which are specific for universally conserved bacterial 16S rRNA gene sequences (9). A 40-bp GC-rich sequence (GC-clamp) was added to the 5' end of primer gc-P63f to allow suitable migration and separation of PCR products in the DGGE gel. PCR amplification was carried out in a GeneAmp PCR system 9600 thermocycler (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA). Reaction mixtures of 50 μ l contained 25 ng (5 μ l) of DNA extract, 1 U of Taq DNA polymerase (Pharmacia Biotech), 1X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 500 mM KCl), 10 mM deoxyribonucleoside triphosphate, and each primer at 20 pmol/ μ l. Samples were amplified using a procedure previously described (34), which

consists of a touchdown thermal cycling program with the following steps: initial denaturing at 94°C for 5 min; 20 cycles of 94°C for 1 min, 1 min at 65°C initially with the temperature sequentially decreasing by 0.5°C each cycle, and 72°C for 1 min; 10 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and final extension at 72°C for 10 min. PCR products were examined by electrophoresis of 4 µl of the amplification product through a 2 % (w/v) agarose gel (Bioshop, Burlington, ON, Canada) in 1 X TAE buffer at 200V for 1 h and visualized by ethidium bromide staining and UV transillumination.

DGGE analysis

PCR products of maple sap and corresponding tube samples obtained for each sampling period (except for 0 % sap flow) for both the 2002 and the 2003 seasons were analyzed by DGGE based on the method cited by Muyzer *et al.* (32), using a D-Code universal mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Polyacrylamide (8 %) gels (16 by 16 cm; 0.75 mm thickness) were run with 1X TAE buffer diluted from 50X TAE buffer (40 mM Tris base, 20 mM glacial acetic acid, and 1 mM EDTA). The polyacrylamide gels (acrylamide/bisacrylamide ratio, 37.5/1) were made with denaturing gradients ranging from 20 to 70 %. Denaturant (100 %) contained 7 M urea and 40 % deionized formamide. The electrophoresis was run at 60°C for 16 h at 100 V. After electrophoresis, the gels were stained for 45 min in aqueous ethidium bromide (0.5 mg/L) solution followed by 5 min destaining in water and visualized by UV transillumination. Amplicons from maple sap bacteria previously isolated (Lagacé *et al.*, 2004) were added as references during DGGE analysis. DGGE profiles were analyzed with the GelCompar software package (Molecular Analyst Software Fingerprinting Plus; Bio-Rad Laboratories). The normalized profiles

obtained were used to construct a dendrogram using the clustering algorithm of Ward and the Dice's coefficient of similarity. A densitometric curve was obtained for each gel lane. The bacterial diversity of each DGGE lane was calculated by the Shannon-Weaver diversity index (H) (36). For diversity calculation, the equation $H = \sum P_i \log P_i$ was used, in which P_i is the importance probability of the bands in a lane. H was calculated on the basis of the bands on the gel lanes that were used in the generation of the dendrogram by taking the intensities of the bands as judged by peak heights in the densitometric curves. The importance probability, P_i , was calculated as $P_i = n_i/N$ where n_i is the height of a peak and N is the sum of all peak heights in the densitometric curve. Diversity indices for sap and biofilm samples were compared using the Kruskal-Wallis non parametric test ($\alpha = 0.05$) in XLSTAT (Addinsoft, Paris, France).

Band extraction and partial 16S rRNA gene sequencing

Selected DGGE bands were cut out of the polyacrylamide gels under UV illumination for the analysis of major resolved DGGE amplicons. The excised bands were incubated at 4°C for 24 h in 20 μ l of sterile deionized water. Portions of 1 μ l of suspended amplicons were used as templates for PCR reamplification using the same conditions before. Amplification products were submitted to electrophoresis on DGGE gels as before, to confirm that the expected products were isolated. PCR products yielding single bands that comigrated with the original sample were reamplified as before, using primer P63f without the GC-clamp. These amplification products were purified using Qiaquick PCR purification kits (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) before being directly sequenced using primers P63f and P518R. Sequences of these gene fragments were obtained using an Applied

Biosystems ABI 310 DNA sequencer (Big Dye Terminator cycle sequencing ready kit; Perkin-Elmer). BLAST searches (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) were performed to obtain information on the 16S rRNA gene sequences with the greatest similarity to database sequences. The CHECK_CHIMERA command (<http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html>) of the Ribosomal Database Project (RDP) was also used to detect chimeric sequences. Sequences determined were compared in a dendrogram with reference sequences from GenBank using a neighbour-joining analysis with bootstrap (500 samples) performed with the Mega 2 software (molecular evolutionary genetics analysis, version 2.1).

RESULTS

Microbial contamination of maple sap collection systems

Generally, the bacterial populations of samples increased as the season progressed (Fig. 1). Mesophilic aerobic counts were not significantly different than psychrotrophic counts and were significantly higher ($P < 0.05$) than anaerobic and *Pseudomonas* counts. Mesophilic aerobic and psychrotrophic counts for main line sap and biofilm samples were significantly higher ($P < 0.05$) and increased more rapidly during the sap flow seasons than the counts for lateral line samples. Conditions for the weather and sap flow of 2002 and 2003 seasons are shown in Table 1.

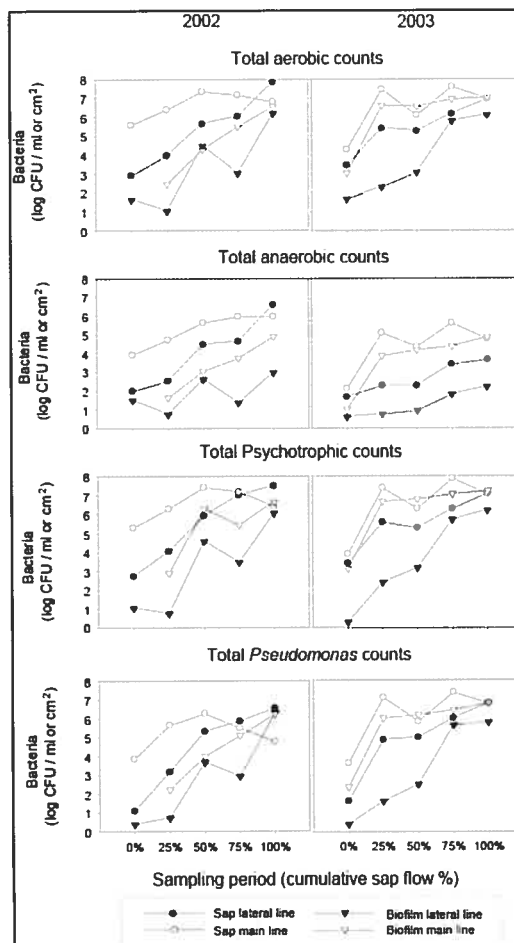


Figure 1. – Growth of total mesophilic aerobic, anaerobic, psychrotrophic and *Pseudomonas* microflora in main (○) or lateral (●) collection lines or in biofilms on the inner surfaces of main (▽) or lateral (▼) line tubing during the 2002 and 2003 seasons.

Table 1. – Characteristics of the 2002 and 2003 sap flow seasons.

	2002	2003
Season length	56 days	38 days
Sap flow period	35 days	31 days
Mean daily air temp.	5.1°C	3.0°C
Mean season sap flow/taphole	83 L	69 L
Mean sap sugar content	2.0°Brix	2.5°Brix

SEM of biofilms

At the beginning of each season, both lateral and main line surfaces appeared cleaner than surfaces at other sampling times (Fig. 2A and 2C). Bacterial colonization and biofilm formation progressively increased during the season, but biofilm formation however appeared earlier and in greater amount on main line than on lateral line surfaces. At the end

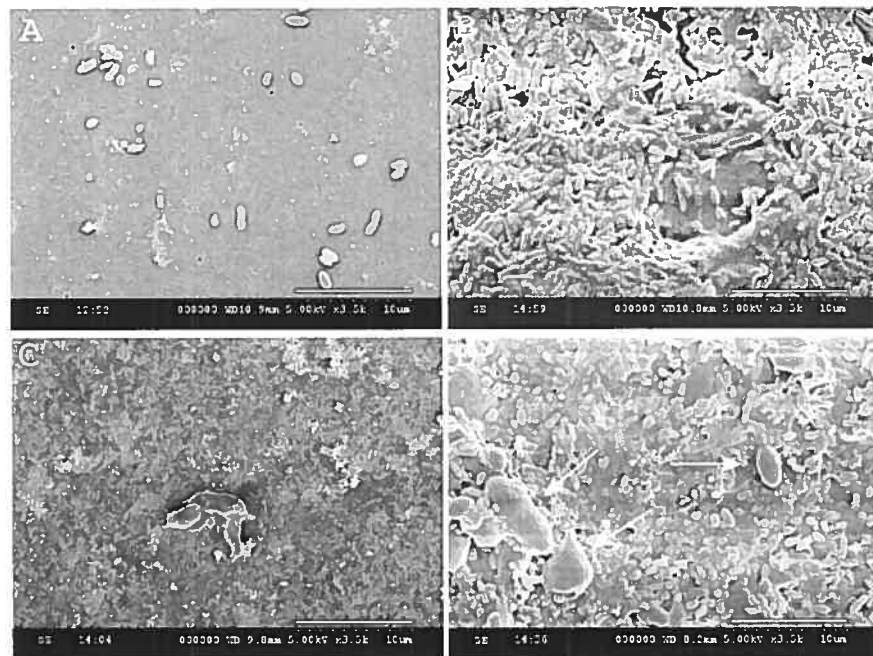


Figure 2. – SEM micrographs of maple sap collection tubing inner surfaces. A and B, lateral line tubing at the beginning and at the end respectively of the 2003 season, C and D, main line tubing at the beginning and at the end respectively of the 2003 season. B and D show rod shaped bacteria in a dense biofilm matrix with occasional yeast cells indicated by arrows. Size of bars are 10 µm

of the season, both lateral and main line surfaces were heavily colonized by biofilm mainly composed of rod shaped bacteria, with the occasional appearance of fungal cells late in the season (Fig. 2B and 2D).

DGGE bacterial community profile

The fingerprints of the bacterial communities of sap and biofilm contained up to 12 major bands (Fig 3, b1 to b12). A decreasing trend in the number of bands was observed during the season, especially for biofilm samples. Band b8 was the most intense found for almost every sampling period (25 to 100 sap flow cumulative %) and for both sap and biofilm samples. This b8 band was found to migrate in the DGGE gel at the same position as reference r2 corresponding to *Pseudomonas* sp. MSB2083. Other bands such as b1 and b12 appeared only occasionally with relatively low intensities. Band b11 was mostly found in lateral line samples of sap and biofilm.

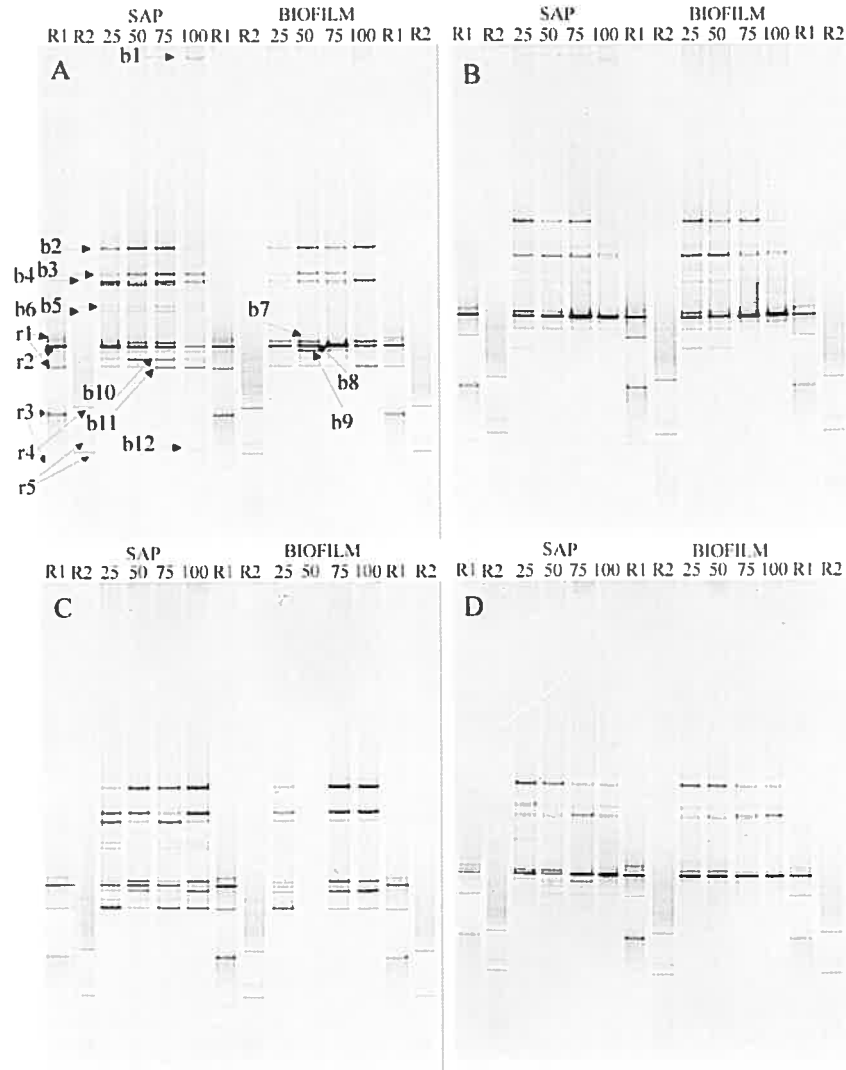


Figure 3. – Negative images of parallel DGGE gels of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments showing fingerprints for biofilm and maple sap microflora obtained during periods of 25, 50, 75 or 100 % sap flow during the 2002 and 2003 seasons. Microflora were from lateral lines, 2002 (A); main lines, 2002 (B); lateral lines, 2003 (C), or main lines, 2003 (D). Lanes R1 and R2 were from organisms previously isolated from maple sap (r1, *Staphylococcus warneri* MSB2065 (AY275502); r2, *Pseudomonas* sp. MSB2083 (AY275480); r3, *Plantibacter flavus* MSB2139 (AY275509); r4, *Bacillus* sp. MSB2054 (AY275495); r5, *Ralstonia* sp. MSB2010 (AY275489)). Bands b1 through b12 and r2 were excised from gel A for 16S rRNA gene fragment sequencing. Results for lateral line biofilm sampled at 50 % cumulative sap flow in 2003 are missing.

DGGE profiles were distributed into four different clusters (Fig. 4). Samples of sap from the lateral line appeared to be very similar, as six out of eight samples were tightly clustered regardless of the season and the sampling period (cluster 3; Fig. 4). Samples of sap and corresponding biofilm from the main line in 2002 and 2003 formed another cluster (cluster 4). Cluster 2 was mainly composed of biofilm samples from lateral lines while cluster 1 has only five samples, mostly coming from sap and biofilm sampled from main lines close to the end of the 2002 season.

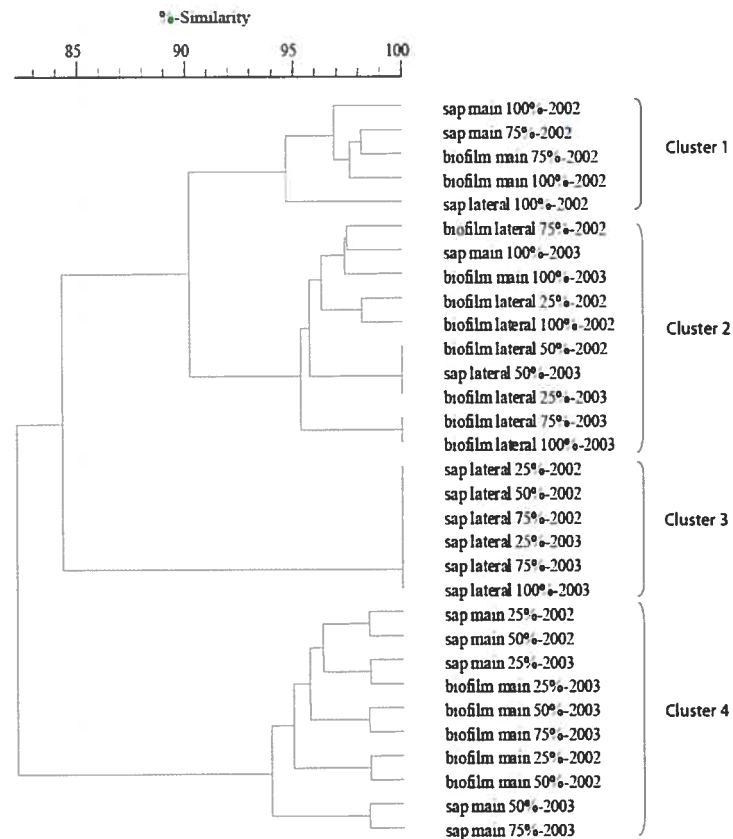


Figure 4. – Dendrogram derived from DGGE analysis of the microflora on the basis of Dice's coefficient of similarity using the clustering algorithm of Ward. Samples are designated by the sample type (sap or biofilm), the location (lateral or main line), the sampling period (sap flow cumulative %) and the season (2002 or 2003).

Overall, the diversity indices was significantly higher ($P < 0.05$) for sap samples than for biofilm (Fig. 5). The diversity indices for lateral line samples were relatively stable or increased during the season while those for main line samples decreased as the season progressed (Fig. 5).

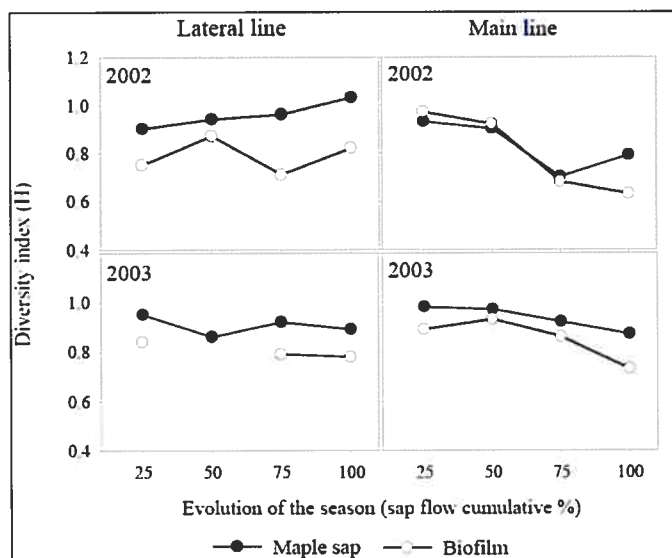


Figure 5. – Shannon-Weaver index of diversity (H) calculated from DGGE analysis of the microflora of maple sap (●) or biofilm (○).

The 16S rRNA gene partial sequences which have been determined in the present study were deposited in the National Center for Biotechnology Information database and are available under the accession numbers shown in Table 2. All of the sequences retrieved from the major bands of the DGGE profiles of sap and biofilm corresponded to portions of the 16S rRNA gene and none of the sequences was found to have a chimeric nature. For most of the DGGE bands, Blast results showed similarity to GenBank database sequences higher than 95%. For some bands, however, the similarity to database sequences was relatively low (< 95 %), especially for band b1.

Table 2. – Identity of major bands obtained from DGGE analysis of the bacterial community of maple sap and biofilm specimens as determined by the closest relative obtained from Blast comparison.

Band ^a	Accession no.	Closest relative and accession no. obtained from GenBank	Similarity
b1	AY791936	Glacial ice bacterium AY378251	88%
b2	AY791937	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AY321588	95%
b3	AY791938	Glacial ice bacterium AY378251	97%
b4	AY791939	<i>Pseudomonas</i> sp. AY043559	98%
b5	AY791940	<i>Pseudomonas syringae</i> AE016875	94%
b6	AY791941	<i>Pseudomonas</i> sp. AY339888	98%
b7	AY791942	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AY321588	98%
b8	AY791943	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AY472116	93%
b9	AY791944	<i>Pseudomonas</i> sp. AJ585222	93%
b10	AY791945	<i>Pseudomonas syringae</i> AY275478	98%
b11	AY791946	<i>Pseudomonas</i> sp. AY366185	96%
b12	AY791947	<i>Rahnella</i> genosp. U90758	97%
r2	–	<i>Pseudomonas</i> sp. AY275480	98%

^a Bands were extracted from the DGGE gel shown in Figure 3.

The first Blast result (98%) for the r2 reference band corresponded to the same sequence of *Pseudomonas* sp. MSB2083 (AY275480) obtained previously (23), confirming the reliability of the method. Bands b2, b4, b6, b7, b10 and b11 were strongly related (similarity > 95 %) to the *Pseudomonas* genus while b5, b8 and b9 were still related to *Pseudomonas* genus but with lower similarity (Table 2). Band b12 was related to the *Rahnella* genus (97%). Bands b1 and b3 sequences are related to an unidentified ice bacterium, however, with a lower sequence similarity result for b1 at 88 %. According to Figure 6, DGGE band sequences did not match closely with sequences of sap Gram-positive bacteria found in the database. Bands r2, b2, b4, b7, b8, b10 and b11 formed a large cluster along with maple sap *Pseudomonas* sequences from the database. Bands b1,

b3, b5, b9 and b12, which have a sequence similarity distinct from the *Pseudomonas* genus or have a relatively low (< 95 %) similarity, were not part of the *Pseudomonas* cluster (Fig. 6). Band b6 was also excluded from the *Pseudomonas* cluster, although sequence similarity corresponded to the *Pseudomonas* genus.

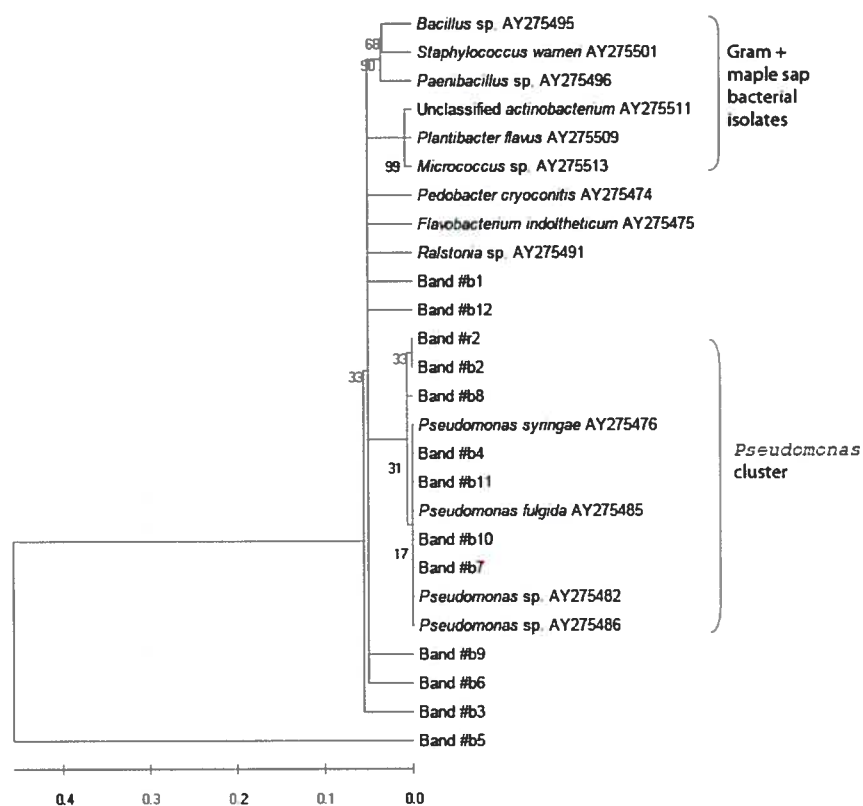


Figure 6. – Relationships of partial 16S rRNA gene sequences derived from predominant DGGE bands of maple sap and biofilm to those of isolated maple sap bacteria obtained in a previous study (23).

DISCUSSION

The Canadian maple syrup industry produces about 85 % of the world's maple syrup, exporting more than 28,685 tonnes valued at \$144.9 million to more than 30 countries in 2002.

Bacterial populations in sap and on tubing began to reach levels $> 5 \log$ CFU/ml or cm^2 from mid-season but lateral line generally harboured smaller bacterial population than main line samples. Bacterial contamination was mainly composed of aerobic psychotrophic bacteria, with large fraction of *Pseudomonas* spp.. The shorter sap flow season and the lower daily air temperature observed in 2003 did not notably affect bacterial contamination. These results indicate that good sanitary maintenance of the sap collection system would be necessary to prevent sap spoilage and maintain syrup quality. Producers will generally apply a sanitation treatment only at the end of the sap flow season (2). When applied during the season, maintenance procedures will mostly target the main line portions of the sap collection system, because spouts are still in place in the tapholes, making it difficult for sanitation solutions to reach the lateral lines. Bacterial growth in the lateral line is not negligible, this would tend to lower the efficacy of the sanitation procedure and allow rapid microbial regrowth in the system. The results suggest that sanitation during the season should be seriously considered of both lateral and main lines to limit microbial growth and biofilm build-up in the sap collection system.

SEM showed the extent of microbial colonization of sap collection system surfaces. The results confirmed the presence of biofilm on the inner surfaces of both lateral and main lines and are in agreement with the bacterial counts. Rod shaped bacteria embedded in a

polymeric matrix predominated in the biofilm microcosm. The collection lines are composed of polyethylene to which bacteria can adhere (14). *Pseudomonas* spp., an important bacterial group found in the maple sap collection system, are strongly associated with biofilm production (37). Biofilm formation is a well recognized phenotype responsible for enhanced resistance to antimicrobial agents and tolerance of environmental stresses (7). This characteristic of adhered bacteria would explain the persistent microbial contamination of maple sap and the low efficiency of sanitation procedures applied to sap collection systems. Detachment of biofilm cells by physical forces or biological features of the community members (8) would also promote sap contamination that so affect its quality during storage.

PCR-DGGE of 16S rRNA gene fragments allows the analysis of very complex microbial communities (31) by providing a profile of the genetic diversity (11). Major bands can be sequenced, revealing the identity of particular bacteria (30). Therefore, it was possible to obtain community profiles showing up to 12 major and distinct bands for each sampling period of both sap flow seasons. From these profiles, one band (b8) was found predominant in intensity and recurrence. This band was related to the genus *Pseudomonas* that was found to be an important bacterial group in maple sap originating from tapholes (23). Although band b5 was related to *Pseudomonas syringae*, the sequence determined for this band was distinct from other sequences. Some bands were also distinct from the *Pseudomonas* genus, notably band b12, the 16 rRNA gene partial sequence of which was associated to the *Rahnella* genus. This bacterial genus is widely distributed in nature (3) and was separated from the *Enterobacter* genus after DNA relatedness studies (19).

Microorganisms from the genus *Aerobacter* renamed *Enterobacter* have previously been identified in maple sap and are associated with the production of low quality syrup (13).

As judged by DGGE profile comparisons, microflora from samples of the main line were more similar to one another than to the microflora from samples of the lateral line. The same observation can be made for sap and biofilm samples. Furthermore, no great shift in microflora composition during the seasons was observed. This supports the hypothesis that some colour and flavour characteristics of maple products are due to members of this stable microflora.

The sap collection system community showed less DGGE band diversity at the end than at the start of the season. Diversity in biofilms was lower than in maple sap samples, which can be associated with the dominance of *Pseudomonas* in the biofilm. This observation is also in agreement with bacterial counts and SEM results. This domination was notably important for the main line of the sap collection system.

The formation of biofilms on the inner surfaces of sap collection systems would explain the difficulties of producing high quality maple syrup throughout the sap flow season. A better understanding of spatial and temporal shifts in microbial community structure of maple sap collection systems, and the factors that govern these shifts, could aid in developing strategies for controlling the characteristics of maple products.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre ACER Research Fund (St-Hyacinthe, Québec, Canada) and Agriculture and Agri-Food Canada (Ottawa, Ontario). We are grateful to C. Charron and R. Desruisseaux for their technical help, P. Ward for advice concerning bacterial identification, and D. Montpetit for help with electron microscopy. We thank Gisèle LaPointe (Laval University) for reading the manuscript and for helpful discussions.

REFERENCES

1. **An, Y.H., and R.J. Friedman.** 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J. Microbiol. Methods* **30**:141–152.
2. **Anonymous.** 1999. Sanitation and cleaning of maple tubing – Maple producers survey report. Ontario maple syrup producers association. 66p.
3. **Brenner, D.J., H.E. Müller, A.G. Steigerwalt, A.M. Whitney, C.M. O’Hara, and P. Kämpfer.** 1998. Two new *Rahnella* genomospecies that cannot be phenotypically differentiated from *Rahnella aquatis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:141–149.
4. **Carpentier, B., and O.Cerf.** 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:499–511.
5. **Cocolin, L., M. Manzano, C. Cantoni, and G. Comi.** 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5113–5121.
6. **Cocolin, L., N. Innocente, M. Biasutti, and G. Comi.** 2004. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *Int. J. Food Microbiol.* **90**:83–91.
7. **Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318–1322.
8. **Donlan, R.M.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Inf. Dis.* **8**:881–890.

9. **El Fantroussi, S., L. Verschuere, W. Verstraete, and E.M. Top.** 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:982–988.
10. **Ercolini, D., P.J. Hill, and C.E.R. Dodd.** 2003. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3540–3548.
11. **Ercolini, D.** 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for the detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* **56**:297–314.
12. **Emtiazi, F., T. Schwartz, S.M. Marten, P. Krolla-Sidenstein, and U. Obst.** 2004. Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Res.* **38**:1197–1206.
13. **Fabian, F.W., and H.H. Buskirk.** 1935. *Aerobacter aerogenes* as a cause of ropiness in maple syrup. *Ind. Eng. Chem.* **27**:349–350.
14. **Fletcher, M., and G.I. Loeb.** 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine Pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:67–72.
15. **Frank, H.A., and C.O. Willits.** 1961. Maple sirup. XVIII. Bacterial growth in maple sap collected with plastic tubing. *Food Technol.* **15**:374–378.
16. **Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, and P. Stoodley.** 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:95–108.
17. **Hedrick, D.B., A. Peacock, J.R. Stephen, , S.J. Macnaughton, J. Brüggemann, and D.C. White.** 2000. Measuring soil microbial community diversity using polar

- lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *J. Microbiol. Methods.* **14**:235–248.
18. **Heiligmann, R. B., M. R. Koelling, R. R. Morrow, L. Staats, L. Myott, G. Cook, G. Buzzell, and S. Williams.** 1996. Maple sap production – Tapping, collection and storage, p. 49–71. *In* M. R. Koelling and R. B. Heiligmann (ed), North american maple syrup producers manual, The Ohio State University.
 19. **Izard, D., F. Gavini, P. A. Trinel, and H. Leclerc.** 1979. *Rahnella aquatilis*, nouveau membre de la famille des Enterobacteriaceae. *Ann. Microbiol.* **130**:163–177.
 20. **King, W. and M. F. Morselli.** 1985. Bacterial adhesion to plastic tubing walls. *Maple syrup digest* **25**:28–31.
 21. **King, W. and M. F. Morselli.** 1983. Microorganisms on plastic tubing walls. *Maple syrup digest* **23**:23–28.
 22. **Kumar, C. G. and S. K. Anand.** 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **42**:9–27.
 23. **Lagacé, L., M. Pitre, M. Jacques, and D. Roy.** 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2052–2060.
 24. **Lagacé, L., C. Girouard, J. Dumont, J. Fortin, and D. Roy.** 2002. Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence. *J. Food Sci.* **67**:1851–1854.

25. **Lee, J.-S., G.-Y. Heo, J.W. Lee, Y.-J. Oh, J.A. Park, Y.-H. Park, Y.-R. Pyun, and J.S. Ahn.** 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **102**:143–150.
26. **McBain, A.J., R.G. Bartolo, C.E. Catrenich, D. Charbonneau, R.G. Ledder, A.H. Rickard, S.A. Simmons and P. Gilbert.** 2003. Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:177–185.
27. **Meroth, C. B., J. Walter, C. Hertel, M. J. Brandt and W. P. Hammes.** 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-Denaturing gradient electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:475–482.
28. **Mittelman, M. W.** 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy Sci.* **81**:2760–2764.
29. **Morselli, M. F., and M. L. Whalen.** 1991. Aseptic tapping of sugar maple (*Acer saccharum*) results in light color grade syrup. *Can. J. For. Res.* **21**:999–1005.
30. **Muyzer, G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. microbiol.* **2**:317–322.
31. **Muyzer, G., and K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **73**:127–141.
32. **Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of

- polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695–700.
33. **Naghski, J., and C.O. Willits.** 1957. Maple sirup XI. Relationship between the type and origin of reducing sugars in sap and the color and flavor of maple sirup. *Food Res.* **22**:567–571.
 34. **Ogino, A., H. Koshikawa, T. Nakahara, and H. Uchiyama.** 2001. Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses. *J. Appl. Microbiol.* **91**:625–635.
 35. **Randazzo, C. L., S. Torriani, A. D. L. Akkermans, W. M. de Vos and E. E. Vaughan.** 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1882–1892.
 36. **Shannon, C. E. and W. Weaver.** 1969. *The mathematical theory of communication.* University of Illinois Press, Urbana.
 37. **Toutain, C. M., N. C. Caiazza, and G. A. O'Toole.** 2004. Molecular basis of biofilm development by Pseudomonads, p. 43–63. *In* M. Ghannoum and G. A. O'Toole (eds), *Microbial Biofilms*, ASM Press, Washington, DC.
 38. **Vincent, D., D. Roy, F. Mondou, and C. Déry.** 1998. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *Int. J. Food Microbiol.* **43**:185–193.

CHAPITRE III

Biofilm formation and biocides sensitivity of *Pseudomonas marginalis* isolated from a maple sap collection system

Lagacé, L.^{1,2*}, M. Jacques², A. A. Mafu,³ and D. Roy⁴

¹Centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole Inc. 3600 boul. Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Qc. J2S 8E3, Canada. ²Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Qc. J2S 7C6, Canada. ³Centre de recherche et de développement sur les aliments, Agriculture et Agro-alimentaire Canada, 3600 boul. Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Qc. J2S 8E3, Canada. ⁴Département des sciences des aliments et nutrition, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec, Qc. G1K 7P4, Canada.

Key words: *Pseudomonas*, biofilm, maple sap, biocide, MBEC

Journal of Food Protection, accepté le 27 avril 2006

PREFACE AU CHAPITRE III

Ce chapitre décrit l'efficacité de 4 principaux produits assainisseurs utilisés en industrie alimentaire vis-à-vis un biofilm modèle produit en laboratoire à l'aide d'une souche de *Pseudomonas marginalis* isolée du système de récolte de la sève d'érable et du système MBEC™. L'importance de la formation du biofilm sur l'efficacité des agents assainisseurs a été démontrée dans ces travaux alors que la concentration minimale inhibitrice des produits était inférieure lorsque mesurée sur des cellules planctoniques de *P. marginalis* contrairement à celle mesurée sur des cellules du biofilm. Une validation du système commercial MBEC™ a aussi été obtenue et montre l'utilité d'un tel système pour la comparaison de plusieurs agents assainisseurs dans différentes conditions de températures et de temps.

Je suis responsable de la rédaction complète du manuscrit présenté dans ce chapitre. J'ai participé, conjointement avec mes superviseurs, à la sélection des techniques et du système pour la production du biofilm modèle en plus d'établir les contacts avec le concepteur du système MBEC™, Dr H. Ceri de l'Université de Calgary, afin de fixer les conditions et la méthode d'analyse des résultats. Par la suite, j'ai procédé à l'élaboration complète du design expérimental et à la réalisation des essais en laboratoire assistés par l'équipe technique du Centre ACER. J'ai finalement effectué l'analyse complète des résultats. Dr M. Jacques et Dr D. Roy ont tout les deux supervisé les travaux et édité le manuscrit qui a été accepté pour publication dans *Journal of Food Protection*. Le Dr A.A. Mafu a aussi contribué à l'édition du manuscrit.

ABSTRACT

The susceptibility of planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas marginalis* towards four commonly used biocides at different temperatures (15 and 30°C) and biofilm growth times (24 and 48 h) was assessed. Using the MBEC™ biofilm device, biofilm production in maple sap was shown to be highly reproducible for each set of conditions tested. Biofilm formation was influenced by both growth temperature and time. A temperature of 15°C and incubation time of 24 h yielded less CFU per peg and showed less adhered cells and typical biofilm structures based on scanning electron microscopy observations compared to other conditions. Minimal biofilm eradication concentration (MBEC) values for *P. marginalis* were significantly ($p < 0.001$) greater than minimal bactericidal concentration (MBC) values for planktonic cells and for every biocide tested with the exception of MBEC for peracetic acid at 15°C and 24 h. Sodium hypochlorite and peracetic acid sanitizers were able to eliminate *P. marginalis* biofilms at lower concentrations than hydrogen peroxide- and quaternary ammonium-based sanitizers ($p < 0.001$). According to the results obtained, sodium hypochlorite and peracetic acid sanitizers would be more appropriate for maple sap collection system sanitation.

INTRODUCTION

The prevention of microbial contamination caused by pathogenic and spoilage microorganisms during the manufacture, processing, and packaging of food products is a major concern for the industry. Therefore, the food industry has adopted cleaning and sanitation practices (cleaning-in-place) to control the microbial contamination of equipment and to improve safety and quality of finished products as well as process performances. However, the effectiveness of these measures is compromised by adherence of microorganisms and biofilm formation at the surface of equipment. Microorganisms adhering to a surface and embedded in a biofilm are more resistant to biocides than when dispersed in a liquid medium (planktonic) (3, 28). The recalcitrance of biofilm bacteria towards biocides leads to cycles of regrowth following system disinfection procedures and eventually bacteria may be transferred to the bulk medium and contaminate food (7, 23, 34).

In the maple syrup industry, maple sap is collected during the spring season from tapholes drilled into maple trees (*Acer saccharum*) with a tubing network made of plastic material and from which, maple syrup and other derived products are produced. Since microorganisms found in maple sap are known to be detrimental to the quality of maple syrup, every effort must be made to avoid microbial contamination of maple sap. Microorganisms found in maple sap will be destroyed during the heat evaporation process used to make maple syrup. But through their metabolic activity on maple sap constituents prior to evaporation they will have a negative impact on the quality and commercial value of maple products (19, 24, 26). The bacterial community of maple sap has recently been

studied (20) and formation of biofilm at the surface of the maple sap collection system has also been recently documented (21). These studies indicated that *Pseudomonas* species were predominant in maple sap and also largely responsible for the formation of biofilms at the surface of the sap collection system. *Pseudomonas* species are also associated with spoilage of a number of food products (15). As it is for the food industry in general, commonly available biocides are used to disinfect the maple sap collection systems. Even though disinfection of the maple sap collection system is regularly performed during sap flow season, no investigation has been made to demonstrate the effectiveness and limitations of this operation and to identify the appropriate chemicals and conditions. Considering that biofilms are present at the surface of the sap collection system, it would be essential to determine efficient procedures of sanitation suitable to eliminate both bacteria associated to biofilm formation and biofilms themselves.

Many methods have already been proposed to evaluate the effectiveness of biocides against biofilm bacteria (17). The Calgary biofilm device (MBEC™) belongs to a category of instruments that are particularly well-adapted to easily test simultaneously many concentrations of biocides at the same time against planktonic bacteria and reproducible biofilms (2, 4, 5, 29, 32). It consists of a 96-well microtiter plate with a lid mounted with 96 pegs on which similar biofilms can be produced. In our study, we used the MBEC™ device to test commonly used biocides against planktonic- and biofilm-contained *Pseudomonas marginalis* isolated from a maple sap collection system. The aim was to obtain relevant information that could provide guidelines on the maintenance of the maple sap collection system and to improve the overall quality of maple products.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial culture and growth media. *Pseudomonas marginalis* PTB2093 was isolated during the 2002 season from the inner surface of the sap collection system tubing located at the Centre ACER experimental sugarbush (St-Norbert, QC, Canada) and identified using the Biolog system (Biolog Inc., Hayward, CA, USA). This strain was selected because of its predominance and its particular ability to produce a biofilm on the surface of plastic material (data not shown). Maple sap was used to grow *P. marginalis* and to produce biofilms. Maple sap was obtained during the early season of 2001 (Centre ACER, St-Norbert, QC, Canada) and sterilized in the autoclave at 121°C for 20 min. The sap was in the range of an average maple sap with a total solids composition of 2.3°Brix and a pH of 7.7 (25). *P. marginalis* was reactivated from frozen stock cultures by 2 consecutive transfers of 0.2 ml of culture in 10 ml of maple sap and incubated in static conditions for 18 h at 30°C. The biofilm inoculum was prepared from a 18 h culture in maple sap and standardized by centrifugation at 8000 rpm ($6797 \times g$) and suspension of the pellet in the same medium for a final concentration of approximately 1×10^7 CFU/ml validated by dilution plating on tryptic soy agar (TSA; BBL/Difco, Sparks, MD) incubated at 30°C for 48 h.

Biofilm formation. Biofilms of *P. marginalis* were produced using the MBEC™ assay system (MBEC™ Biofilm Technologies Ltd., Calgary, AB, Canada) as previously described with slight modifications (4). A 200- μ l volume of *P. marginalis* inoculum

prepared in maple sap was added in the wells of the MBEC™ microtiter plate and the 96-peg lid was deposited on top of the plate. The plate was then incubated for 24 h or 48 h at 15°C (temperature representative of cold sap collection system conditions) or 30°C (temperature representative of warm sap collection system conditions) in a gyratory shaker at 150 rpm for biofilm growth. The biofilm growth was determined by following bacterial counts at the surface of pegs after 24 and 48 hours of growth in maple sap at 15 or 30°C. Each peg lid containing the biofilms was rinsed twice by placing for 1 min the lid on a microtiter plate containing 200 µl of saline in each well to remove planktonic cells. After rinsing, the peg lid was transferred to another microtiter plate containing 200 µl of maple sap in each well and sonicated for 5 min (model 5510, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA) to remove biofilms. Viable counts were then performed on removed biofilms on TSA plates as described above. The same procedure was used to control for the numbers of CFU per peg in all biocide susceptibility-tests, prior to exposure to biocide.

Biocides. Sodium hypochlorite, a commercial mixture of quaternary ammonium compounds (Bardac 2050), hydrogen peroxide and peracetic acid were selected for this study. Details on the origin and composition of these biocides are shown in Table 1.

Biocide susceptibility testing. Biofilms used for biocide susceptibility testing were prepared in maple sap as described above after incubation periods of 24 h and 48 h. After incubation, the peg lid was removed and rinsed by deposition on a microtiter plate containing 225 µl of saline per well for 1 min. Each test biocide was serially two-fold diluted with sterile purified water and was placed in one lane of another 96-well microtiter

plate. After rinsing, the peg lid containing biofilms was secured over a 96-well plate, containing the biocides to be tested, and challenged for 30 min at the same temperature (15 or 30°C) as used for the generation of the biofilms. Saline was used to replace biocide solutions for control biofilms. Following the challenge incubation, the peg lid was rinsed twice with 225 µl of saline for 1 min to remove any residual biocide from the pegs. The peg lid was transferred to another 96-well plate containing 200 µl of maple sap per well, sonicated and plated on TSA as previously described above to determine viable counts. To establish the susceptibility of biofilms to biocides, the minimal biofilm eradication concentration (MBEC) was determined and corresponded to the lowest concentration of biocide at which no bacterial could be detected. The susceptibility of planktonic populations of *P. marginalis* was determined by the minimum bactericidal concentration (MBC) of biocide. For the MBC testing, identical serial two-fold dilutions of biocides used to challenge biofilms were prepared in a 96-well plate to which inoculum of *P. marginalis* was added to a final concentration of approximately 1×10^7 CFU/ml. After the 30 min challenge at 15 or 30°C, dilution plating was performed as described above to detect any residual population of viable bacteria for each biocide dilution.

Scanning electron microscopy (SEM). Pegs were broken from the lid of the MBEC™ system after biofilm growth of *P. marginalis* in maple sap. After fixation for 2 – 3 h in 100 mM cacodylate buffer at pH 7.2 containing 2.5 % glutaraldehyde, the pegs were rinsed (6 – 8 times) in 100 mM cacodylate buffer, and then sequentially dehydrated in graded series of ethanol (30, 50, 80 and 100 %) for 15 min each. Pegs were then critical-point dried (SPI Supplies, West Chester, PA) and were immediately sputter coated with gold (Kurt J. Lesker

Company, Clairton, PA). Visualization of the biofilms on the pegs was performed by using a Hitachi S-3000N scanning electron microscope (Hitachi, Mountain View, CA) at 5.0 kv.

Data analysis. MBC and MBEC values were obtained from five independent replicates of planktonic or biofilm growth and biocide challenge. Values were normalized by neperian logarithm transformation before being compared by analysis of variance (ANOVA) and the Tukey multiple-comparisons test ($\alpha = 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Biofilm production on the MBEC™ device

In this work, we have tested the susceptibility of *P. marginalis* isolated from the surface of a maple sap collection system to four different biocides commonly used in the food industry. First, the MBEC™ system was selected to rigorously control biofilm production and to reproduce, as much as possible, identical conditions between biocide susceptibility tests. The results for biofilm formation at different growth temperatures and times are presented in Figure 1. These results representing the data from separate experiments show that the final biofilm concentration of *P. marginalis* averaged between 6.8 and 7.4 log CFU per peg under the conditions tested.

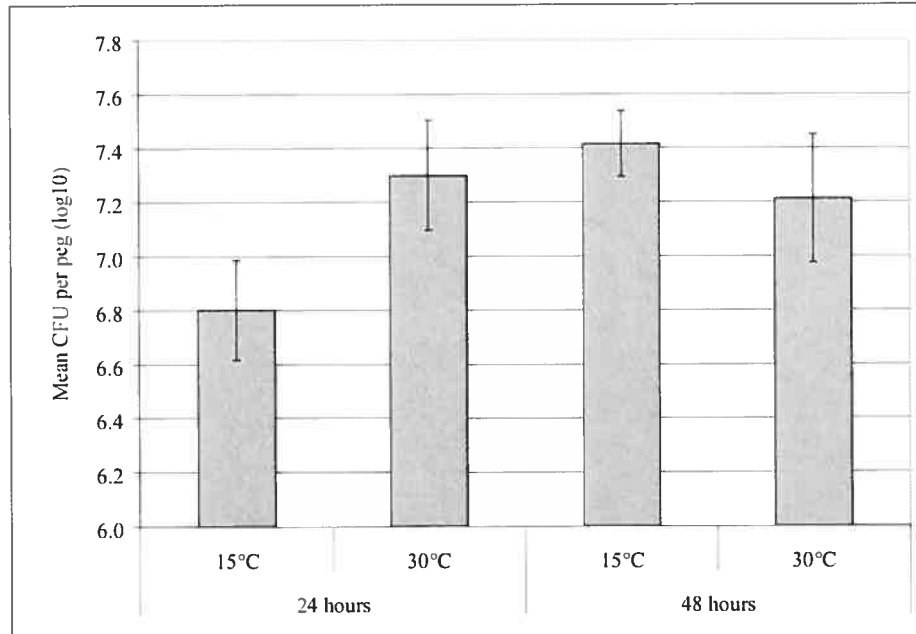


Figure 1. –Biofilm formation of *P. marginalis* PTB2093 on the pegs of the MBEC™ system in maple sap after 24 and 48 h at 15°C and 30°C. Error bars are standard deviations of five independent determinations.

According to the standard deviations presented, biofilm growth was highly reproducible for each set of conditions tested (temperature and time) and equivalent biofilms were produced in terms of biofilm cell counts (log CFU per peg). Ceri et al. (4) also demonstrated that MBEC™ system produced equivalent biofilms of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* grown in TSB for 24 h. The time and temperature influenced biofilm growth as those produced after 24 h at 15°C had significantly lower ($p < 0.05$) cell counts (log CFU per peg) compared to other growth conditions where cell counts did not significantly differ (Fig. 1). Temperature is known as an important factor for biofilm formation. Chavant et al. (6) showed that biofilm formation was affected by a low temperature in combination with the nature of the surface for the psychotrophic bacterium *Listeria monocytogenes*.

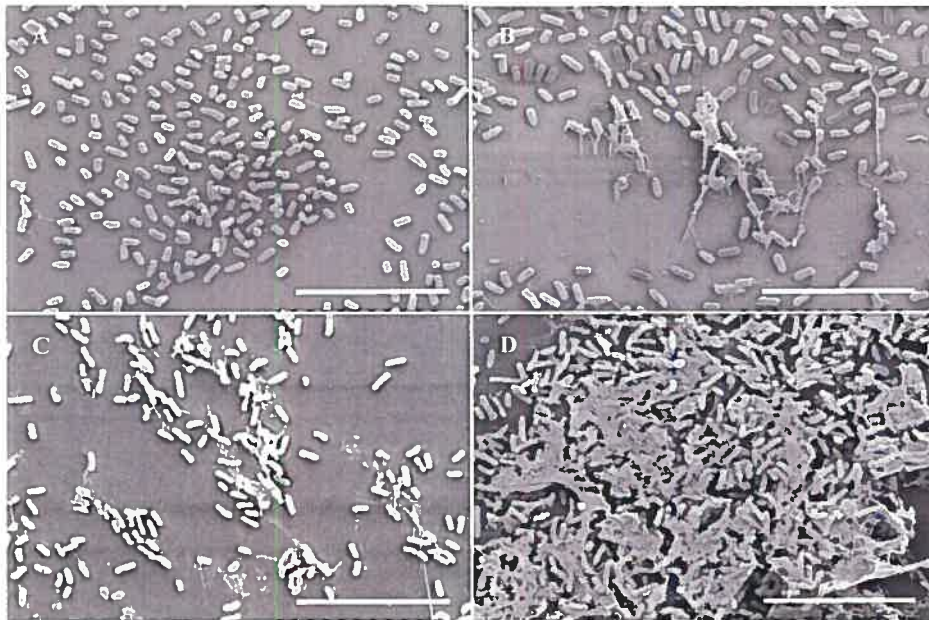


Figure 2. – Scanning electron micrographs of biofilms formed by *P. marginalis* PTB2093 on the pegs of the MBEC™ system in maple sap after incubation for 24 h at 15°C (A), 48 h at 15°C (B), 24 h at 30°C (C), and 48 h at 30°C (D). Bars correspond to 10 μm

According to these authors, a low temperature will affect bacterial growth as well as physicochemical properties of the cells (hydrophobicity) leading to lower bacterial adhesion.

In addition to biofilm cell counts, scanning electron micrographs of the biofilm formed by *P. marginalis* on the MBEC™ system were obtained (Fig. 2). SEM observations show adherent *P. marginalis* and the high density biofilm produced at the surface of pegs. These results demonstrate that it is possible to reproduce under laboratory conditions biofilm formation by a bacterial strain isolated and grown in natural maple sap. From our observations of the biofilm production, it was of note that the biofilm did not develop uniformly at the surface of the peg but as dispersed aggregates. Larger numbers of adherent cells were found in areas of the peg closer to the interface with liquid compared to the tip of the peg. The extent of biofilm formation according to bacterial cell density and thickness of the structure appeared to be enhanced after 48 h of biofilm growth (Fig. 2B and D) and especially at 30°C (Fig. 2D). After 24 h of growth however, cells adhered to the surface of the peg but biofilm formation and EPS production were not as evident (Fig 2A and C). Under prolonged incubation time (48 h), *P. marginalis* developed a dense biofilm composed of bacterial cells surrounded by extracellular polymeric material (EPS). However, this typical biofilm structure was only observed at very dispersed locations of the peg surfaces. This may explain why it had no influence on cell counts and that no difference in cell counts (Fig. 1) was found between biofilms formed after 24 h at 30°C and 48 h at 15 and 30°C.

Susceptibility of *P. marginalis* to biocides

In this study, the susceptibility of *P. marginalis* to biocides was investigated according to the mode of growth (planktonic or biofilm), time of biofilm growth and type and concentration of biocides. Overall, the mode of growth has a significant influence on the susceptibility of *P. marginalis* to biocides (Table 2). MBC values (concentration obtained on planktonic cells) were significantly lower ($p < 0.001$) than MBEC values (concentration obtained on biofilm cells) for most of the biocides and conditions tested. However, MBEC results obtained from biofilm (24 h) exposed to peracetic acid were similar to MBC values for both temperatures (15 and 30°C). *Pseudomonas* spp. are well recognized as food spoilage microorganisms (15, 16, 27) This bacterial genus was found the most abundant in maple sap (20) and was also closely related to the formation of biofilms in maple sap collection system tubing (21).

Table 1. – List of biocides and range of concentration tested

Biocides	Range of active ingredient concentrations tested (mg/liter)	Active ingredients and concentrations in commercial solution
Sodium hypochlorite (Atomes, QC, Canada)	10 to 5120	Sodium hypochlorite, 12%
Bardac 2050 (Lonza Inc., NJ, USA)	10 to 5120	Octyl decyl dimethyl ammonium chloride, 25% Dioctyl dimethyl ammonium chloride, 10% Didecyl dimethyl ammonium chloride, 15%
Hydrogen peroxide (Sigma Chemical Co., MO, USA)	10 to 5120	Hydrogen peroxide, 31.3%
Peracetic acid (American Chemicals Ltd., QC, Canada)	25 to 11900	Peracetic acid, 35,5% Acetic acid, 39,5% Hydrogen peroxide, 6,8% Sulfuric acid, 1%

Biofilm formation is associated with the persistence of microbial contamination and spoilage of maple sap. The efficacy of biocides against *Pseudomonas* biofilm associated to maple sap production is therefore necessary to identify appropriate products that would maintain collection system sanitation. The extent of the bacterial inactivation by biocides is generally governed by five principal factors: concentration of biocide, nature of bacterial cells and density, time of contact, temperature of medium, pH and presence of foreign matter (18, 30, 31). In addition, biofilms may exhibit high level of resistance to biocidal treatments (12, 13). Recalcitrance of *P. marginalis* biofilm grown in maple sap against four commonly used biocides (sodium hypochlorite, quaternary ammonium compounds, hydrogen peroxide and peracetic acid) was also demonstrated in our study (Table 2). The increase in susceptibility according to the difference between MBC to MBEC values ranged from none (peracetic acid at 24 h) to nearly 50× (hydrogen peroxide). This resistance may, in part, be explained by the production of EPS (Figure 2A and C) which may react with chemical biocides and act as a diffusion barrier, or by the physiological status of the biofilm cells (14). Whilst the effectiveness of all biocides was affected to a certain extent by the presence of *P. marginalis* biofilm, hydrogen peroxide was the one mostly affected (Table 2). Time of biofilm growth also had an overall effect on biocide susceptibility of *P. marginalis* (Table 2). Biofilms grown for 24 h were more susceptible to biocides than biofilms grown for 48 h ($p < 0.001$, Table 2). This result is in accordance with the development of biofilm (Fig. 1) and SEM observations (Fig. 2). Previous studies have also suggested that the resistance of microorganisms to sanitizers is affected by the age of the

biofilm (11, 22). Temperature however did not show any significant effect on biocide susceptibility of *P. marginalis*. Biofilms obtained and challenged at 15°C tended to be more susceptible than those obtained and challenged at 30°C but the difference was not statistically significant ($p=0.261$).

Table 2. – Biocide susceptibility (30 min challenge) of *P. marginalis* PTB2093 as a planktonic population (MBC) and a biofilm population (MBEC) evaluated by the MBEC™ system with 24 and 48 hours of incubation at 15 and 30°C in maple sap as growth medium

Biocides	MBC (mg/liter)		MBEC (mg/liter)			
			24 hours		48 hours	
	15°C	30°C	15°C	30°C	15°C	30°C
Sodium hypochlorite	10 ^c	10 ^c	30 ^b	92 ^{bc}	34 ^b	135 ^b
Bardac 2050	52 ^b	34 ^b	88 ^b	200 ^b	226 ^b	320 ^b
Hydrogen peroxide	218 ^a	125 ^a	3875 ^a	5113 ^a	4299 ^a	4096 ^a
Peracetic acid	25 ^{bc}	25 ^{bc}	25 ^b	30 ^c	63 ^b	121 ^b

Values in a column not followed by the same letter are significantly different, $p<0.05$

MBC values were significantly lower ($p<0.001$) than MBEC values for all biocides except for the MBEC of peracetic acid after 24 h

Concentrations of biocides used ranged from 10 to 5120 mg/liter for sodium hypochlorite, Bardac 2050 and hydrogen peroxide, and from 25 to 11900 mg/liter for peracetic acid

When biocides are compared for their ability to eliminate *P. marginalis*, hydrogen peroxide was shown to be significantly less efficient ($p<0.001$) amongst all the conditions tested with MBC and MBEC values ranging from 125 to 5113 mg/liter (Table 2). The protective role of catalase has already been related to the resistance of *Pseudomonas*

aeruginosa biofilm to hydrogen peroxide (9, 33). Peracetic acid and sodium hypochlorite however were generally more effective than other biocides with relatively low MBC and MBEC values ranging from 10 to 135 mg/liter. Quaternary ammonium compounds (Bardac 2050) had intermediate MBC and MBEC values of 34 to 320 mg/liter.

Sodium hypochlorite is the most widely used biocide for sanitation of maple sap collection systems. A concentration of 50 to 100 ppm available chlorine is usually recommended for sanitizing food equipment and utensils (8). For sanitation of maple sap collection systems, a concentration of 600 ppm is generally recommended (1). This treatment is normally applied at the end of the sap flow season by injecting a 600 ppm hypochlorite solution with a pressure pump in the sap collection lines followed by thorough-rinsing with water. According to the MBEC values obtained in this study for sodium hypochlorite against *P. marginalis* biofilms, the 600 ppm concentration used in the field would be high enough to sanitize the sap collection system. However, the use of higher than necessary concentration of biocides increases the risk for biocide residues to be concentrated by the maple syrup process (reverse osmosis concentration and evaporation) especially for sanitation treatments applied during the season. Furthermore, high concentrations of biocides increase the potential for personal safety and environmental hazards especially when manipulated in the field. To minimize these risks, a concentration of sodium hypochlorite lower than 600 ppm could be used. Moreover, since peracetic acid, that is chlorine-free, was found in this study to be as effective as sodium hypochlorite to eliminate *P. marginalis* biofilms, a relatively low concentration (150 – 200 mg/liter) of this

biocide could replace sodium hypochlorite and minimize potential environmental hazards. According to Fatemi and Frank (10), peracid sanitizers are more effective than chlorine for inactivating biofilm of *Pseudomonas* spp. and *Listeria monocytogenes* in the presence of organic residues. This observation is supported by our findings that peracetic acid is highly effective against *Pseudomonas* biofilms produced in maple sap.

Field conditions are difficult to reproduce and for this reason, a model system was used in this study to produce as much as possible, equivalent biofilms for each experiment and to compare biocide products. However, conditions used in the model system to produce biofilms only partially represent the conditions observed in the field. For this reason, some discrepancy may arise with highly variable field conditions (system age, sap flow duration, temperature, shear forces, etc.). Nevertheless, this study indicates that higher concentrations of biocides were necessary to eliminate biofilms of *P. marginalis* than free cells. According to the results obtained using the MBEC™ system, sodium hypochlorite and peracetic acid sanitizers would be more appropriate to maintain sap collection system sanitation. Since sanitizer residues and environmental hazards are important issues for the production of maple syrup, lower concentrations of sodium hypochlorite than currently recommended or the use of peracetic acid should be considered. This however would have to be validated with field experiments where mixed species biofilms are able to grow in maple sap collection systems.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the centre ACER research fund (St-Hyacinthe, QC, Canada). We thank M. Cournoyer and C. Charron for their collaboration with biocide susceptibility testing, E. Rasolofo for providing the test strain, D. Montpetit for advice on SEM and Dr. H. Ceri for advise on the use of the MBEC™ system.

REFERENCES

1. Allard, G. B., and M. Belzile. 2004. Lavage, assainissement et rinçage du matériel acéricole, Chapter 11. *In* Cahier de Transfert Technologique en Acériculture. Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec, Bibliothèque Nationale du Québec, Sainte Foy, QC, Canada.
2. Bardouniotis, E., W. Huddleston, H. Ceri, and M. E. Olson. 2001. Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC assay system. *FEMS Microbiol. Let.* 203:263–267
3. Bower, C.K., and Daeschel, M.A. 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.* 50:33–44.
4. Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. W. Morck, and A. G. Buret. 1999. The Calgary biofilm device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 37:1771–1776
5. Ceri, H., M. E. Olson, D. W. Morck, D. Storey, R. R. Read, A. G. Buret, and B. Olson. 2001. The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Methods Enzymol.* 337:377–384.
6. Chavant, P., B. Martinie, T. Meylheuc, M.-N. Bellon-Fontaine, and M. Hebrauld. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability

to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:728–737.

7. den Aantrekker, E. D., W. W. Vernooij, M. W. Reij, M. H. Zwietering, R. R. Beumer, M. van Schothorst, and R. M. Boom. 2003. A biofilm model for flowing systems in the food industry. *J. Food Prot.* 66:1432–1438.
8. Dychdala, G. R. 2001. Chlorine and chlorine compounds, p. 135–157. In S. S. Block (ed), *Disinfection, sterilization, and preservation*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
9. Elkins, J. G., D. J. Hassett, P. S. Stewart, H. P. Schweizer, and T. R. McDermott. 1999. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4594–4600.
10. Fatemi, P., and J. F. Frank. 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracetic sanitizers. *J. Food Prot.* 62:761–765.
11. Frank, J. F., and R. A. Koffi. 1990. Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with the increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53:550–554.
12. Gilbert, P., A. H. Rickard, T. Maira-Litran, A. J. McBain, and F. Whyte. 2002. Physiology and recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv. Microb. Physiol.* 46:203–256.

13. Gilbert, P., A. J. McBain, and A. H. Rickard. 2003. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 51:245–248.
14. Gilbert, P., A. H. Rickard, and A. J. McBain. 2004. Biofilms and antimicrobial resistance, p.128–138. In A. P. Fraise, P. A. Lambert, J.-Y. Maillard (eds), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 4th ed., Balckwell Publishing Ltd, Malden, MA. USA.
15. Gram, L., L. Ravn, M. Rasch, J. B. Bruhn, A. B. Christensen, and M. Givskov. 2002. Food spoilage – interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 78:79–97.
16. Gunasekera, T. S., M. R. Dorsch, M. B. Slade, and D. A. Veal. 2003. Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence in situ hybridization using ribosomal RNA direct probes. *J. Appl. Microbiol.* 94:936–945.
17. Hamilton, M. A. 2002. Testing antimicrobials against biofilm bacteria. *J. AOAC Int.* 85:479–485.
18. Holah, J. T. 1995. Disinfection of food production areas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 14:343–363.
19. Lagacé, L., C. Girouard, J. Dumont, J. Fortin, and D. Roy. 2002. Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence. *J. Food Sci.* 67:1851–1854.

20. Lagacé, L., M. Pitre, M. Jacques, and D. Roy. 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2052–2060.
21. Lagacé, L., M. Pitre, M. Jacques, and D. Roy. 2006. Compositions of maple sap microflora and collection system biofilms evaluated by scanning electron microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* In press.
22. Leriche, V., and B. Carpentier. 1995. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single- and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. *J. Food Prot.* 58:1186–1191.
23. Midelet, G., and B. Carpentier. 2004. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *J. Appl. Microbiol.* 97:262–270
24. Morselli, M. F., and L. Whalen. 1991. Aseptic tapping of sugar maple (*Acer saccharum*) results in light color grade syrup. *Can. J. For. Res.* 21:999–1005.
25. Morselli, M. F., and L. Whalen. 1996. Maple chemistry and quality. p. 162–171. In M. R. Koelling and R. B. Heiligmann (ed), North american maple syrup producers manual, The Ohio State University.
26. Naghski, J., and C. O. Willits. 1957. Maple sirup. XI. Relationship between the type and origin of reducing sugars in sap and the color and flavour of maple sirup. *Food Res.* 22:567–571.

27. Nguyen-The, C., and J. P. Prunier. 1989. Involvement of pseudomonads in deterioration of 'ready-to-use salads'. *Int. J. Food Sci. Technol.* 24:47–58.
28. Ntsama-Essomba, C., S. Bouttier, M. Ramaldes, F. Dubois-Brissonet, and J. Fourniat. 1997. Resistance of *Escherichia coli* growing as biofilms to disinfectants. *Vet. Res.* 28:353–363.
29. Olson, M. E., H. Ceri, D. W. Morck, A. G. Buret, and R. R. Read. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66:86–92.
30. Russell, A. D. 2001. Principles of antimicrobial activity and resistance, p. 31–55. In S. S. Block (ed), *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5th ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. USA.
31. Russell, A. D. 2004. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents, p. 98–127. In A. P. Fraiese, P. A. Lambert, J.-Y. Maillard (eds), *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, 4th ed., Balckwell Publishing Ltd, Malden, MA. USA.
32. Sepandj, F., H. Ceri, A. Gibb, R. Read, and M. Olson. 2004. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. *Perit. Dial. Int.* 24:65–67

33. Stewart, P. S., F. Roe, J. Rayner, J. Elkins, Z. Lewandowski, U. A. Ochsner, and D. J. Hassett. 2000. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:836–838.
34. Stoodley, P., S. Wilson, L. Hall-Stoodley, J. D. Boyle, H. M. Lappin-Scott, and J. W. Costerton. 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5608–5613.

DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

La qualité et la conformité des produits acéricoles aux différents critères de valorisation, sont des éléments essentiels au développement de cette industrie. L'importance de la contamination microbienne de la sève d'érable sur la qualité est connue depuis longtemps (Edson 1912, Fabian and Buskirk 1935, Morselli et Whalen 1991, Naghski et Willits 1957) et a été renforcée par nos travaux présentés à l'Annexe I. Ces travaux ont notamment démontré à partir d'un large échantillonnage de produits acéricoles qu'une contamination microbienne intense et non contrôlée de la sève influence la couleur et la saveur du sirop d'érable. Selon ces résultats, cette contamination microbienne, entre autres par le biais de son activité métabolique sur le saccharose (hydrolyse), favorise l'intensification de la couleur du sirop d'érable et l'apparition de goûts indésirables. Ceci met donc l'emphase sur la nécessité de contrôler le développement microbien dans la sève. Dans cette optique, les travaux présentés à l'Annexe I offrent un outil simple et rapide de mesure de l'intensité de la contamination microbienne de la sève pour ainsi prédire la qualité physico-chimique et sensorielle du sirop d'érable. Cet outil de mesure par ATP bioluminescence pourra être utilisé par les producteurs acéricoles et les conseillers techniques afin d'appliquer un meilleur contrôle de la qualité de la sève en cours de production et ainsi améliorer la qualité et la valeur commerciale du sirop.

Les connaissances sur la composition de la communauté microbienne de la sève d'érable sont à la base de la compréhension des phénomènes reliés à la dégradation microbienne et à

la diminution de la qualité des produits acéricoles. Avant la réalisation des travaux présentés au Chapitre I, les seules données relatives à la contamination microbienne de la sève provenaient d'études réalisées il y a plusieurs années en utilisant les techniques traditionnelles d'identification (Edson 1912, Sheneman et Costilow 1958). Les résultats du Chapitre I fournissent un portrait actualisé de la communauté microbienne de la sève à l'aide de techniques moléculaires modernes telles que l'ARDRA et le séquençage de l'ADNr 16S. Il a été ainsi possible d'observer la grande diversité de la communauté microbienne de la sève représentée par 22 genres bactériens différents ainsi que la dominance des bactéries à Gram négatif représentées par le genre *Pseudomonas*. Ce genre bactérien est notamment reconnu pour sa capacité à former un biofilm sur divers types de surfaces biotiques et abiotiques. Ajouté à ce profil de la communauté bactérienne, il y a celui de la contamination en levures de la sève présentée à l'Annexe II. Ces travaux présentent une revue de la composition microbienne de la sève et de la formation du biofilm en plus de présenter des résultats d'identification de levures par le séquençage du gène codant pour le domaine D1/D2 de l'ARN ribosomal selon le protocole de Kurtzman et Robnett (1998). Le niveau de contamination fongique de la sève est généralement moins élevé que celui des bactéries (Annexe I, Tableau 1). Néanmoins, ce type de contamination est souvent non négligeable et a tendance à être plus important à la fin de la saison de coulée. Selon la Figure 5 de l'Annexe II, 15 genres levuriens différents ont été retrouvés avec une prédominance pour les genres *Cryptococcus*, *Trichosporon* et *Sporobolomyces*. Ces résultats sont conformes à ceux de Sheneman et Costilow (1958) à la différence que

l'espèce *Cryptococcus victoriae* s'est avérée dominante dans l'étude présentée à l'Annexe II. Quant à la présence de moisissures dans la sève d'érable, celles-ci sont généralement en moins grand nombre que les levures (Annexe I, Tableau 1). Nos travaux ne se sont pas attardés à l'identification des moisissures de la sève d'érable. Nos premières observations indiqueraient cependant la présence des genres *Penicillium* et *Aspergillus* tout comme Shenenman et Costilow (1959) les avaient répertoriés. D'autres travaux seraient donc souhaitables afin de mettre en lumière les divers espèces de moisissures pouvant se retrouver dans la sève d'érable.

Par ailleurs, le profil de la communauté microbienne de la sève dressé lors de notre étude, bien qu'il soit valable et conforme aux études antérieures, se limite à un site d'exploitation soit l'érablière expérimentale de St-Norbert (Centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole inc.). Pour avoir un portrait exhaustif de la communauté microbienne de la sève et connaître sa variabilité selon différents facteurs observées à travers l'ensemble des exploitations acéricoles, un échantillonnage stratifié sur l'ensemble des régions acéricoles serait à considérer. Combiné à l'utilisation de la technique T-RFLP consistant à établir le profil de la communauté microbienne sans culture des micro-organismes en laboratoire (Marsh 1999), cet échantillonnage offrirait une vue complète et plus exacte de la contamination microbienne de la sève et des conditions qui l'influencent. Le profil obtenu de notre étude donne tout de même des indications intéressantes sur la composition de cette communauté microbienne, nécessaires à la

compréhension de phénomènes reliés à la récolte et à la qualité des produits acéricoles tels que la formation du biofilm.

La communauté microbienne de la sève est composée comme on l'a vu, d'une grande variété d'espèces mais aussi d'espèces prédominantes vraisemblablement issues d'un certain état d'équilibre qui se manifeste à l'intérieur du système de récolte. Certains micro-organismes plus opportunistes et mieux adaptés aux conditions de récolte vont avoir la possibilité de persister à l'intérieur de cet écosystème et dominer les autres espèces. La formation de biofilm fait partie des caractéristiques des micro-organismes qui vont contribuer à la persistance de certaines espèces notamment dans des écosystèmes naturels. Certaines indications telles que la faible performance des traitements d'assainissement et des résultats de recherche préliminaires (King et Morselli, 1983, 1985) laissaient entrevoir la possibilité qu'un biofilm se développe à l'intérieur de la tubulure servant à la collecte de la sève. Les résultats de notre étude présentés au Chapitre II illustrent clairement la formation du biofilm à la surface interne du système de récolte de la sève sur des échantillons prélevés en érablière. Il s'agit ici du premier cas rapporté scientifiquement de la formation du biofilm en érablière, ajoutant ainsi un nouvel écosystème à la longue liste des écosystèmes où la formation de biofilm a été rapportée. En plus de fournir une appréciation visuelle de la formation du biofilm, le chapitre II révèle également certaines caractéristiques de composition de la communauté microbienne du biofilm en parallèle

avec la communauté planctonique. Cette caractérisation a été effectuée à deux niveaux soit par la culture des micro-organismes en laboratoire et par la technique PCR-DGGE appliquée sur l'ADN ribosomal 16S de l'ensemble de la communauté microbienne des échantillons. À la lumière des résultats présentés au Chapitre II, il apparaît évident que les bactéries du genre *Pseudomonas* colonisent de façon prédominante et sous la forme d'un biofilm, la surface interne de la tubulure servant à la récolte de la sève. La présence de plusieurs bandes sur les gels DGGE et en particulier de bandes difficilement identifiables, témoigne tout de même de la diversité microbienne de cet écosystème. Il n'en reste pas moins cependant que le genre *Pseudomonas* domine largement dans le système notamment par la présence de la bande b8 sur les gels DGGE (Chapitre II, Figure 3), apportant ainsi un certain niveau d'équilibre dans la communauté microbienne de la sève et du biofilm.

À partir de ces observations, une hypothèse peut donc être émise à l'effet qu'une certaine flore microbienne typique de la sève d'érable existerait et que cette microflore pourrait contribuer positivement aux caractéristiques des produits acéricoles. Une telle hypothèse ne pourrait être émise si une grande variabilité dans la communauté microbienne avait été observée sans aucune stabilité dans sa composition. À ce titre, certaines recherches effectuées dans le passé laissent entrevoir la possibilité que les micro-organismes de la sève peuvent contribuer à l'intensification de la saveur caractéristique du sirop d'érable sans pour autant augmenter les défauts de couleur et de goût (Naghski *et al.* 1957, Willits *et al.* 1961). Dans ces études, *Pseudomonas geniculata* avait été identifié de façon prédominante

dans des sèves avec lesquelles des sirops d'érable avaient été fabriqués et qui possédaient des caractéristiques sensorielles intéressantes et un goût typique d'érable intense. Ces études cependant n'indiquent pas avec certitude les espèces microbiennes impliquées ni comment ces caractéristiques désirables sont formées et quels composés sont en cause. À partir de nos travaux, il pourrait être intéressant d'étudier plus en profondeur le métabolisme des micro-organismes de la sève afin d'évaluer son influence sur la composition et les propriétés sensorielles du sirop d'érable. Une telle étude assisterait l'industrie acéricole dans son développement en favorisant l'émergence de produits à valeur ajoutée associée à la présence de micro-organismes d'intérêt. La roue des saveurs de l'érable pourrait à cet égard être utilisée dans la caractérisation sensorielle des produits. De plus, une approche étudiant la fonctionnalité des gènes exprimés par les micro-organismes de la sève au cours de la saison sans avoir recours à la culture des micro-organismes pourrait être intéressante. Certaines techniques sont maintenant disponibles afin d'obtenir un portrait des gènes exprimés d'une communauté microbienne et qui surmontent le besoin d'isoler des souches. Entre autres, la technique de l'affichage différentiel (*differential display*) qui utilise des amorces de nucléotides arbitraires pour initier la réaction de transcription renversée (RT) à des sites arbitraires permet de caractériser les gènes exprimés d'une communauté (Fislagé *et al.* 1997, Liang *et al.* 1992). Cette technique ne se fonde pas sur la connaissance antérieure des gènes visés car elle implique l'amplification de la population de gènes exprimés (transcrits ARNm) à des sites au hasard par la transcription renversée (RT) de l'ARN en cADN suivie par la PCR (RT-PCR). La technique de

l'affichage différentiel a notamment été utilisée pour caractériser l'expression de gènes de communautés microbiennes marines (Poretsky *et al.* 2005) et du sol (Fleming *et al.* 1998). L'utilisation de puces à ADN pourrait également assister dans la caractérisation des différents gènes exprimés.

Ultimement, lorsque certaines espèces auront démontré des propriétés d'intérêt, ces micro-organismes pourraient être retracés dans les systèmes de récolte par l'utilisation de la technique FISH en utilisant des sondes spécifiques à ces espèces. Le ciblage de ces espèces par la technique FISH pourrait alors permettre d'identifier et d'appliquer des conditions d'exploitation favorisant la présence de ces micro-organismes d'intérêt dans les systèmes et ainsi participer à l'enrichissement de la qualité et de la valeur commerciale des produits.

Le chapitre III démontre l'importance relative de la formation du biofilm par *Pseudomonas marginalis* PTB2093 en système modèle sur la résistance à différents produits biocides. Cette bactérie a été sélectionnée parmi plusieurs souches isolées du système de récolte de la sève pour sa grande capacité à former un biofilm (Annexe III) et pour son importance dans la contamination microbienne de la sève. Il a notamment été montré au chapitre III que l'efficacité de l'hypochlorite de sodium et l'acide peracétique était moins influencée par la présence du biofilm que le peroxyde d'hydrogène et les ammoniums quaternaires. Ceci donne des indications préliminaires sur les produits à employer pour le maintien de la salubrité des systèmes de récolte de la sève. Cependant,

étant donné la grande diversité de la communauté microbienne des systèmes ainsi que la grande variabilité des conditions de récolte et des installations utilisées, une analyse plus approfondie de l'assainissement et une validation en conditions de terrain devraient être effectuées. Une telle validation devrait notamment évaluer l'influence de la matière organique susceptible de réduire l'efficacité entre autre de l'hypochlorite de sodium et également confirmer l'efficacité du traitement sur les levures et moisissures. Les résultats du chapitre III indiquaient également un écart appréciable entre la concentration d'hypochlorite de sodium (< 135 ppm) nécessaire à l'élimination du biofilm en laboratoire (MBEC) et la concentration d'utilisation recommandée sur le terrain (600 ppm). L'utilisation d'une concentration inutilement trop importante en produit assainissant augmente le potentiel de risque environnemental ainsi que le risque de la présence de résidus dans le sirop. Une étude de terrain devrait alors être effectuée afin de voir la possibilité de soit diminuer la concentration en hypochlorite de sodium recommandée ou remplacer ce produit par un produit tout aussi efficace mais potentiellement moins à risque pour l'environnement et la présence de résidus. Une telle étude favoriserait une plus grande qualité des produits acéricoles mais aussi de bonnes pratiques de fabrication soucieuses de l'environnement.

CONCLUSION

La production acéricole joue un rôle important dans l'économie agricole du Québec. L'accroissement du niveau de la production des dernières années doit maintenant être assistée par le contrôle de la qualité et le développement de produits acéricoles à valeur ajoutée afin d'assurer la croissance de cette industrie. À ce titre, la contamination microbienne de la sève constitue un des plus importants facteurs responsables de la dégradation de la qualité et de la valeur commerciale des produits acéricoles. Les travaux présentés ont permis de documenter par des techniques modernes, la composition de la communauté microbienne de la sève, la formation du biofilm dans les systèmes de récolte et l'influence du biofilm sur les produits biocides potentiellement utilisables en acériculture. La communauté microbienne de la sève a notamment été caractérisée par sa grande diversité d'espèces mais aussi par la dominance des bactéries du genre *Pseudomonas* qui sont majoritairement responsables de la formation du biofilm dans les systèmes de récolte de la sève et aussi de la résistance à la désinfection par différents biocides. Ces connaissances acquises sont à la base du développement de nouvelles pratiques visant l'optimisation de la qualité et de la conformité des produits acéricoles. De plus, ces connaissances ouvrent la voie sur le développement de projets portant sur l'étude du métabolisme microbien et de son impact positif potentiel sur la composition et les propriétés physico-chimiques et sensorielles des produits acéricoles.

RÉFÉRENCES

1. **Adair, C. G. S. P. Gorman, L. B. Byers, D. S. Jones et T. A. Gardiner.** 2000. Confocal laser scanning microscopy for examination of microbial biofilms, p. 249–257. *In* Y. H. An et R. J. Friedman (eds) Handbook of bacterial adhesion, principles, methods, and applications. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
2. **Alkorta, I., I. Amezaga, I. Albizu, A. Aizpurua, M. Onaindia, V. Buchner, et C. Garbisu.** 2003. Molecular microbial biodiversity assessment: a biological indicator of soil health. *Rev. Environ. Health.* **18**:131–151.
3. **Allison, D. G., B. Ruiz, C. Sanjose, A. Jaspe, et P. Gilbert.** 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**:179–184.
4. **Amann, R. I., W. Ludwig, et K.-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143–169.
5. **Amann, R. I., J. Snaidr, M. Wagner, W. Ludwig, et K. H. Schleifer.** 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* **178**:3496–3500.
6. **An, Y.H., and R.J. Friedman.** 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J. Microbiol. Methods* **30**:141–152.
7. **Andrighetto, C., P. de Dea, A. Lombardi, E. Neviani, L. Rossetti, et G. Giraffa.** 1998. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Res. Microbiol.* **149**:631–643.

8. **Anonyme.** 1998. Produits de l'érable et leurs succédanés, p 86–91, *In* Règlement sur les aliments, P-29, r.1, Ministère des Pêcheries de l'Agriculture et de l'Alimentation du Québec, Bibliothèque Nationale du Québec.
9. **Anonyme.** 2002. Monographie de l'industrie acéricole au Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Bibliothèque Nationale du Québec.
10. **Anonyme.** 2005. Les produits canadiens de l'érable – Situations et tendances (2004-2005). Agriculture et Agroalimentaire Canada.
11. **Arnold, J. W., et G. W. Bailey.** 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poult. Sci.* **79**:1839–1845.
12. **Bardouniotis, E., W. Huddleston, H. Ceri, et M. E. Olson.** 2001. Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBECT[™] assay system. *FEMS Microbiol. Let.* **203**:263–267.
13. **Boyd, A., et A. M. Chakrabarty.** 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Role of the alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol.* **15**:162–168.
14. **Branda, S. S., A. Vik, L. Friedman, et R. Kolter.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**:20–26.
15. **Brown, M. R., et J. Barker.** 1999. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends Microbiol.* **7**:46–50.

16. **Burne, R.A., Y-Y. M. Chen, et J. E. C Penders.** 1997. Analysis of gene expression in *Streptococcus mutans* in biofilms in vitro. *Adv. Dent. Res.* **11**:100–109.
17. **Busalmen, J. P., et S. R. de Sanchez.** 2001. Influence of pH and ionic strength on adhesion of a wild strain of *Pseudomonas sp.* to titanium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**:303–308.
18. **Busscher, H. J., A. H. Weerkamp, H. C. van der Mei, A. W. J. van Pelt, H. P. Jong, et J. Arends.** 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:980–983.
19. **Ceri, H., D. W. Morck, et M. E. Olson.** 2001. Biocide susceptibility testing of biofilms, p. 1429–1437 *In* S. S. Block (ed) *Disinfection, Sterilization, and preservation*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
20. **Ceri, H. M. E. Olson, C. Streick, R. R. Read, D. Morck, et A. Buret.** 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* **37** :1771–1776.
21. **Conseil des productions végétales du Québec.** 1994. Érablière : Système de collecte sous vide de la sève d'érable. Agdex 300/756. Bibliothèque nationale du Québec.
22. **Costerton, J. W., K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, et T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:435–464.
23. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, et H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**:711–745.

24. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, et E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science*. **284** :1318–1322.
25. **Costilow, R. N., P. W. Robbins, et R. J. Simmons.** 1962. The efficiency and practicability of different types of paraformaldehyde pellets for controlling microbial growth in maple tree tapholes. *Quarterly Bulletin of the Michigan Agricultural Experiment Station, Michigan State University*. **44**:559–579.
26. **Dalton, H. M., A. E. Goodman, et K. C. Marshall.** 1996. Diversity in surface colonization alignment in marine bacteria. *J. Ind. Microbiol.* **17**:228–234.
27. **Danehy, J. P.** 1986. Maillard reactions: non enzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavour. *Adv. Food Res.* **30**:77–137.
28. **Danese, P. N., L. A. Pratt, et R. Kolter.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **182**:3593–96.
29. **Davey, M. E., N. C. Caiazza, et G. A. O’Toole.** 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **185**:1027–1036.
30. **Davies, D. G., et G. G. Geesey.** 1995. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:860–867.

31. **Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, et E. P. Greenberg.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. **280**:295–298.
32. **Dominique, G., B. Ellis, M. Dasgupta, et J. W. Costerton.** 1994. Testing antimicrobial susceptibilities of adherent bacteria by a method that incorporates guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2564–2568.
33. **Drake, M. A., C. L. Small, K. D. Spence, et B. G. Swanson.** 1996. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. In dairy products by using the polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* **59**:1031–1036.
34. **Dumont, J.** 1994. L'eau d'érable. Centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole Inc. Publication no. 300-NTR-1094.
35. **Dumont, J. et J. Beaupré.** 1994. Caractéristiques chimiques et nutritives du sirop d'érable. Les acides amines de la sève et du sirop d'érable. Centre de Recherche, de développement et de transfert technologique acéricole Inc. Publication no. 300-FIN-0394.
36. **Dunne, W. M. Jr.** 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:155–166.
37. **Edson.** 1912. Microorganisms of maple sap. *Vermont Agr. Exp. Sta. Bull.* 167.
38. **Elder, M. J., F. Stapleton, E. Evans, et J. K. G. Dart.** 1995. Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye.* **9**:102–109.

39. **Fabian, F. W., et H. H. Buskirk.** 1935. *Aerobacter aerogenes* as a cause of ropiness in maple sirup. *Ind. Eng. Chem.* **27** :349–350.
40. **Fédération des producteurs acéricoles du Québec.** 2005. Dossier économique 2005. www.siropperable.ca.
41. **Filière acéricole du Québec.** 2005. Guide d'acceptation et d'homologation des produits et matériaux destinés à l'acériculture, 2^{ème} édition. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.
42. **Fislage, R., M. Berceanu, Y. Humboldt, M. Wendt, et H. Oberender.** 1997. Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic acids Res.* **25**:1830–1835.
43. **Fleming, J. T., W.-H. Yao, et G. S. Saylor.** 1998. Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3698–3706.
44. **Flemming, H.-C., J. Wingender, C. Mayer, V. Korstgens, et W. Borchard.** 2000. Cohesiveness in biofilm matrix polymers, p. 87–105. *In* D. G. Allison, P. Gilbert, H. M. Lappin-Scott, et M. Wilson (eds), *Community structure and co-operation in biofilms*. Cambridge University Press.
45. **Fletcher, M.** 1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J. Bacteriol.* **170**:2027–2030.

46. **Fletcher, M., et G. I. Loeb.** 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:184–192.
47. **Frank, J. F., et R. A. Kofi.** 1990. Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* **53**:550–554.
48. **Fux, C. A., J. W. Costerton, P. S. Stewart, et P. Stoodley.** 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**:34–40.
49. **Gardner, L.R., et P. S. Stewart.** 2002. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**:354–360.
50. **Gilbert, P. A. H. Rickard, et A. J. McBain.** 2004. Biofilms and antimicrobial resistance, p. 128–138. *In* A. P. Fraise, P.A. Lambert, et J.-Y. Maillard (eds) *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, Blackwell Science Ltd, Malden, MA, USA.
51. **Gilbert, P. A. Rickard, T. Maira-Litran, A. J. McBain, et F. Whyte.** 2002. Physiology and recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv. Microb. Physiol.* **46**:203–256.
52. **Gilbert, P. P. J. Collier, et M. R. W. Brown.** 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents : Biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1865–1868.

53. **Giraffa, G. et E. Neviani.** 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **67**:19–34.
54. **Giraffa, G., P. De Vecchi, et L. Rossetti.** 1998. Note : Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *J. Appl. Microbiol.* **85**:918–924.
55. **Giwerzman, B. E. T. Jensen, N. Hoiby, A. Kharazmi, J. W. Costerton.** 1991. Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1008–1010.
56. **Gordon, C. A., N. A. Hodges, et C. Marriot.** 1988. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **22**:667–674.
57. **Goulet, J., F. Lagacé, A. Lebrun, G. Pouliot, et L. Villeneuve.** 1985. Caractérisation des constituants mineurs de la sève d'érable. Rapport d'étape, Département de Sciences et Technologie des Aliments, Faculté de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Québec, Canada.
58. **Gouvernement de l'Ontario.** 2004. Pratiques de salubrité alimentaire pour la production du sirop d'érable. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation de l'Ontario.
59. **Gürtler, V. et V. A. Stanisich.** 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* **142**:3–16.

60. **Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, et P. Stoodley.** 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:95–108.
61. **Hassett, D. J., J.-F. Ma, J. G. Elkins, T. R. McDermott, U. A. Ochsner, S. E. H. West, C.-T. Huang, J. Fredericks, S. Burnett, P. S. Stewart, G. McFeters, L. Passador, et B. H. Iglewski.** 1999. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* **34**:1082–1093.
62. **Heckels, J. E., B. Blackett, J. S. Everson, et M. E. Ward.** 1976. The influence of surface charge on the attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to human cells. *J. Gen. Microbiol.* **96**:359–364.
63. **Heiligmann, R. B., et F. E. Winch.** 1996. The maple resource, p. 9–19. *In* M. R. Koelling et R. B. Heiligmann (eds), North American maple syrup producers manual. The Ohio State University, Columbus, Ohio.
64. **Heiligmann, R. B., M. R. Koelling, R. R. Morrow, L. Straats, L. Myotts, G. Cook, G. Buzzell, M. Morselli, et S. Williams.** 1996. Maple sap production – Tapping, collection and storage, p. 49–71. *In* M. R. Koelling et R. B. Heiligmann (eds), North American maple syrup producers manual. The Ohio State University, Columbus, Ohio.
65. **Henrici, A. T.** 1933. Studies of fresh water bacteria. 1. A direct microscopic technique. *J. Bacteriol.* **25**:277–286.

66. **Hentzer, M., M. Givskov, et L. Eberl.** 2004. Quorum sensing in biofilms: gossip in slime city, p. 188–140. *In* M. Ghannoum et G. A O'Toole (eds), *Microbial Biofilms*, ASM Press, Washington, DC.
67. **Hentzer, M., G. M. Teitzel, G. J. Balzer, A. Heydorn, S. Molin, M. Givskov, et M. R. Parsek.** 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* **183**:5395–5401.
68. **Hicks, S. J., et R. J. Rowbury.** 1987. Bacteriophage resistance of attached organisms as a factor in the survival of plasmid-bearing strains of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **4**:129–132.
69. **Holah, J. T.** 1995. Disinfection of food production areas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **14**:343–363.
70. **Hunter-Cevera, J. C.** 1998. The value of microbial diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:278–185.
71. **Jones, C. R., M. R. Adams, P. A. Zhdan, et A. H. L. Chamberlain.** 1999. The role of surface physicochemical properties in determining the distribution of the autochthonous microflora in mineral water bottles. *J. Appl. Microbiol.* **86** :917–927.
72. **Juhas, M., L. Eberl, et B. Tümmler.** 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* **7**:459–471.
73. **Kermasha, S., M. Goetghebeur, et J. Dumont.** 1994. Determination of phenolic compound profiles in maple products by HPLC. *J. Agri. Food Chem.* **43**:708–716.

74. **King, W., et M. F. Morselli.** 1983. Microorganisms on plastic tubing walls. *Maple Syrup Digest* **23**:23–28.
75. **King, W., et M. F. Morselli.** 1985. Bacterial adhesion to plastic tubing walls. *Maple Syrup Digest* **25**:28–30.
76. **Kissinger, J. C.** 1973. Yeasts, fat jugs and hot maple sirup. *National Maple Syrup Digest.* **12**:13–15.
77. **Kitts, C. L.** 2001. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2**:17–25.
78. **Kurtzman, C. P. et C. J. Robnett.** 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**:331–371.
79. **Lagacé, L., C. Girouard, J. Dumont, J. Fortin, et D. Roy.** 2002. Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence. *J. Food Sci.* **67**:1851–1854.
80. **Lagacé, L., J. Dumont, G. Brazeau, A. Soucy, J. Haché, et V. Marquis.** 2002. Spectrofluorimetric determination of formaldehyde in maple syrup. *J. AOAC Int.* **85**:1144–1147.
81. **Lagacé, L., S. Guay, et N. Martin.** 2003. Level of endogenous formaldehyde in maple syrup as determined by spectrofluorimetry. *J. AOAC Int.* **86**:598–601.

82. **Lambert, P. A.** 2004. Mechanisms of action of biocides, p. 139–153. *In* A. P. Fraise, P. A. Lambert, J.-Y. Maillard (eds) Principles and practices of disinfection, preservation, and sterilization, 4th ed., Blackwell Publishing Ltd, Malden, MA, USA.
83. **Lawrence, J. R., G. D. W. Swerhone, et T. R. Neu.** 2000. A simple rotating annular reactor for replicated biofilm studies. *J. Microbiol. Methods* **42**:215–224.
84. **Liang, P., et A. B. Pardee.** 1992. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. **257**:967–971.
85. **Mah, T.-F. C., et G. A. O’Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**:34–39.
86. **Manz, W. R. Amann, R. Szewzyk, U. Szewzyk, T. A. Stenstrom, P. Hutzler, K. H. Schleifer.** 1995. In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiol.* **141**:29–39.
87. **Marsh, T. L.** 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:323–327.
88. **McLean, R. J. C., C. L. Bates, M. B. Barnes, C. L. McGowin, et G. M. Aron.** 2004. Methods of studying biofilms, p. 379–413. *In* M. Ghannoum and G. A O’Toole (eds), *Microbial Biofilms*, ASM Press, Washington, DC.
89. **Merz, J. A., M. So, et M. P. Sheetz.** 2000. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*. **407**:98–102.

90. **Miller, M. B., et B. L. Bassler.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:165–199.
91. **Morgan, T. D., et M. Wilson.** 2001. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *J. Appl. Microbiol.* **91**:47–53.
92. **Morselli, M. F., et M. L. Whalen.** 1979. Temperature effect on sap storage. *Maple Syrup Digest.* **19**:22–23.
93. **Morselli, M. F., et M. L. Whalen.** 1991. Aseptic tapping of sugar maple (*Acer saccharum*) results in light color grade syrup. *Can. J. For. Res.* **21**:999–1005.
94. **Morselli, M. F., et M. L. Whalen.** 1996. Maple chemistry and quality, p. 162–177. *In* M. R. Koelling and R. B. Heiligmann (ed), North American maple syrup producers manual. The Ohio State University, Columbus, Ohio.
95. **Morselli, M. F., M. L. Whalen, F. M. Laing, P. E. Sendak, et D. B. Howard.** 1985. Changes in maple syrup from prolonged warm sap storage. *Vt. Agr. Exp. Sta., RR 43*, University of Vermont, Burlington.
96. **Muyzer, G. A.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:317–322.
97. **Muyzer, G., et K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **73**:127–141.

98. **Muyzer, G. A., E. C. de Waal, et A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695–700.
99. **Naghski, J., et C. O. Willits.** 1955. Maple sirup. IX. Microorganisms as a cause of premature stoppage of sap flow from maple tap holes. *Appl. Microbiol.* **3**:149–151.
100. **Naghski, J., et C. O. Willits.** 1957. Maple sirup. XI. Relationship between the type and origin of reducing sugars in sap and the color and flavour of maple sirup. *Food Res.* **22**:567–571.
101. **Naghski, J., L. L. Reed, et C. O. Willits.** 1957. Maple sirup. X. Effect of controlled fermentation of maple sap on the color and flavour of maple sirup. *Food Res.* **22**:176–181.
102. **Nichols, W. W., M. J. Evans, M. P. E. Slack, et H. L. Walmsley.** 1989. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **135**:1291–1303.
103. **Nivens, D. E., D. E. Ohman, J. Williams, et M. J. Franklin.** 2001. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol.* **183**:1047–1057.
104. **Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovanni, N. R. Pace, et D. A. Stahl.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:337–365.

105. Olson, M. E., H. Ceri, D. W. Morck, A. Buret, et R. R. Read. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* **66**:86–92.
106. O'Toole, G. A., K. A. Gibbs, P. W. Hager, P. V. Phibbs jr., et R. Kolter. 2000a. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**:425–431.
107. O'Toole, G. A., H. B. Kaplan, et R. Kolter. 2000b. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49–79.
108. O'Toole, G. A., et R. Kolter. 1998a. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**:295–304.
109. O'toole, G. A., et Kolter. 1998b. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**:449–461.
110. Paulsen, I. T., M. H. Brown, et R. A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**:575–608.
111. Picioreanu, C., M. C. van Loosdrecht, et J. J. Heijnen. 2001. Two-dimensional model in biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnol. Bioeng.* **72**:205–218.

112. **Pitts, B. M. A. Hamilton, N. Zilver, et P. S. Stewart.** 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Methods.* **54**: 269–276.
113. **Pitts, B., A. Willse, G. A. McFeters, M. A. Hamilton, N. Zilver, et P. S. Stewart.** 2001. A repeatable laboratory method for testing the efficacy of biocides against toilet bowl biofilm. *J. Appl. Microbiol.* **91**:110–117.
114. **Poretsky, R. S., N. Bano, A. Buchan, G. Leclair, J. Kleikemper, M. Pickering, W. M. Pate, M. A. Moran, et J. T. Hollibaugh.** 2005. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4121–4126.
115. **Pozos, N., K. Scow, S. Wuertz, et J. Darby.** 2004. UV disinfection in a model distribution system:; biofilm growth and microbial community. *Water Res.* **38**:3083–3091.
116. **Rademaker, J. L. W., F. J. Louws, et F. J. de Bruijn.** 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR fingerprinting, p. 1–26. *In* A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*, suppl. 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
117. **Roy, D., et S. Sirois.** 2001. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**:17–24.

118. **Roy, D., S. Sirois, et D. Vincent.** 2001. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Curr. Microbiol.* **42**:282–289.
119. **Russell, A. D.** 2001. Principles of antimicrobial activity and resistance, p. 31–55. *In* S. S. Block (ed), *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5th ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. USA.
120. **Saito, T., T. Takatsuka, T. Kato, K. Ishihara, et K. Okuda.** 1997. Adherence of oral streptococci to an immobilized antimicrobial agent. *Arch. Oral. Biol.* **42**:539–545.
121. **Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, et D. G. Davies.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**:1140–1154.
122. **Sauer, K., et A. K. Camper.** 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* **183**:6579–6589.
123. **Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, et T. S. Whitam.** 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:873–884.
124. **Shapiro, J. A.** 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organism. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:81–104.
125. **Sheneman, J. M., et R. N. Costilow.** 1958. Identification of microorganisms from maple tree tapholes. *Food Res.* **24**:146–151.

126. **Sheneman, J. M., R. N. Costilow, P. W. Robbins, et J. E. Douglas.** 1958. Correlation between microbial populations and sap yields from maple trees. *Food Res.* **24**:152–159.
127. **Shigo, A. L., et F. M. Laing.** 1970. Some effects of paraformaldehyde on wood surrounding tapholes in sugar maple trees. USDA Forest Service Research Paper NE-161.
128. **Sipple, L., J. C. Kissinger, et C. O. Willits.** 1970. A survey of microbial contamination of maple sap in field collection systems. USDA, ARS 73–68. Philadelphia, PA.
129. **Slack, M. P. E., et W. W. Nichols.** 1982. Antibiotic penetration through bacterial capsules and exopolysaccharides. *J. Antimicrob. Chemother.* **10**:268–372.
130. **Smida, J., S. Leibhard, A. M. Nickel, F. Eckardt-Schupp, et L. Lieber.** 1996. Application of repetitive sequence-based PCR (inter-LINE PCR) for the analysis of genomic rearrangements and for the genome characterization on different taxonomic levels. *Genet. Anal.* **13**:95–98.
131. **Stinson, E. E., C. J. Dooley, J. M. Purcell, et J. S. Ard.** 1967. Quebrachitol. A new component of maple sap and syrup. *J. Agr. Food Chem.* **15**:394–397.
132. **Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, et J. W. Costerton.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:187–209.

133. **Stoodley, P., S. Wilson, L. Hall-Stoodley, J. D. Boyle, H. M. Lappin-Scott, and J. W. Costerton.** 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5608–5613.
134. **Stretton S., S. Techkarnjanaruk, A. M. McLennan, et A. E. Goodman.** 1998 Use of green fluorescent protein to tag and investigate gene expression in marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2554–2559.
135. **Stuckel, J. G., et N. H. Low.** 1996. The chemical composition of 80 pure maple syrup samples produced in North America. *Food Res. Int.* **29**:373–379.
136. **Sutherland, I. W.** 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **9**:222–227.
137. **Taylor, R. L., J. Verran, G. C. Lees, et A. J. P. Ward.** 1998. The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethymethacrylate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **9**:17–22.
138. **Thurheer, T., R. Gmur, et B. Guggenheim.** 2004. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J. Microbiol. Methods.* **56**:37–47.
139. **Toutain, C. M., N. C. Caiazza, et G. A. O'Toole.** 2004. Molecular basis of biofilm development by Pseudomonads, p. 43–63. *In* M. Ghannoum et G. A O'Toole (eds), *Microbial Biofilms*, ASM Press, Washington, DC.
140. **van der Mei, H. C., R. Bos, et H. J. Busscher.** 1998. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **11**:213–221.

141. **van der Mei, H. C. , et H. J. Busscher.** 2001. Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:491–494.
142. **van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde, et A. J. B. Zehnder.** 1989. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microb. Ecol.* **17**:1–15.
143. **Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, et J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407–438.
144. **Vaneechoutte, M.** 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. *Mol. Biotechnol.* **6**:115–142.
145. **Ventura, M., I. A. Casas, L. Morelli, et M. L. Callegari.** 2000. Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus* spp. Isolated from fecal and vaginal samples. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:504–509.
146. **Ventura, M., M. Elli, R. Reniero, et R. Zink.** 2001. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**:185–193.
147. **Walters, R. S., et A. L. Shigo.** 1978. Discolouration and decay associated with paraformaldehyde-treated tapholes in sugar maple. *Can. J. For. Res.* **8**:54–60.
148. **Walters, R. S., et H. W. Yawney.** 1978. Plastic tubing and maple syrup quality. USFS Research paper NE-409.
149. **Webb, J. S., M. Givskov, et S. Kjelleberg.** 2003. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:578–585.

150. **Whalen, M. L., et M. F. Morselli.** 1984. Fungi associated with pure maple syrup packed at the minimum recommended reheating temperature. *J. Food Prot.* **47**:688–689.
151. **Willits, C. O., H. A. Frank, et R. A. Bell.** 1961. Maple sirup. XIX. Flavor and color through controlled fermentation of maple sap. *Food Res.* **15**:473–474.
152. **ZoBell, C. E., et E. C. Allen.** 1935. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *J. Bacteriol.* **29**:239–251.
153. **ZoBell, C. E.** 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* **46**:39–56.

ANNEXE I

Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence

Luc Lagacé^{1*}, Carolle Girouard¹, Johanne Dumont¹, Jacinthe Fortin², Denis Roy²

Authors' affiliation:

¹Centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole inc., 3600 Casavant Blvd West, St-Hyacinthe, Que, Canada. J2S 8E3. ²Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600 Casavant Blvd West, St-Hyacinthe, Que., Canada J2S 8E3.

Journal of Food Science, vol 67, p. 1851–1854, 2002

Abstract

ATP bioluminescence was evaluated as a method for assessing the level of microbial contamination in sap and predicting maple syrup characteristics. This approach provided results that were strongly correlated with the standard plate count and took less time than the modified resazurin technique. ATP bioluminescence measurement of sap proved to be reliable for predicting physicochemical and sensory characteristics as indicated by the colour and flavour of maple syrup. Most of the syrups made from saps with higher ATP bioluminescence values were darker in colour and presented off-flavours. Based on these results, ATP bioluminescence could be used to improve sanitary practices associated with collecting and storing maple sap.

Key words

Bioluminescence, contamination, maple, syrup, quality

Introduction

Maple syrup is obtained by using heat to evaporate maple sap collected from maple trees during the spring season. Research in this field has already demonstrated that the sanitary quality of maple sap has an effect on the physicochemical and sensory quality of maple syrup (Edson 1912). Some of these effects are undesirable and result in syrups that are dark in colour (Morselli and Whalen 1991), present off-flavours or have a "ropy" texture (Fabian and Buskirk 1935; Holgate 1950). The microorganisms in maple sap play a role in the enzymatic hydrolysis of sucrose-producing reducing sugars (glucose and fructose), and these sugars are responsible for the dark colour and the intense caramel flavour that arise during evaporation and mask the characteristic maple flavour of syrup (Naghski and Willits 1957). These effects tend to reduce the commercial value of maple syrup. To improve the sanitary quality of maple sap, maple syrup producers seek to apply good sanitary practices for collecting and storing sap. However, producers still need tools to permit simple and rapid estimation of the microbial quality of the maple sap collected in their operations and to optimize their sanitation procedures. Evaporator plant operators are similarly interested in being able to determine whether the sap is suitable for storage and processing into syrup with acceptable characteristics.

A method based on the resazurin reduction test has already been proposed for the rapid estimation of the sanitary quality of maple sap (Kissinger 1969; 1974; AOAC 1984). This method has been shown to give faster results than the standard plate count. However, it takes too long to permit a decision within a short time period, and some of the results were

of questionable validity and not very sensitive. Furthermore, the sequence of manipulations involved in carrying out the method are fairly complex.

In recent decades, the food industry has seen the development of a simple and rapid method for estimating microbial load, which is based on measuring the adenosine triphosphate (ATP) content of the contaminating microorganisms by bioluminescence. This method involves an enzymatic reaction between luciferase and ATP, which produces an amount of light proportional to the amount of ATP, the latter being directly related to the number of microbial cells. The ATP bioluminescence assay has been studied in foods such as meat carcasses (Siragusa and Cutter 1995; Siragusa and others 1995; Bautista and others 1997), milk (Phillips and Griffiths 1985; Griffiths 1993; Sutherland and others 1994; Branger and others 1995; Reybroeck and Schram 1995; Murphy and others 1998) and beverages (Graumlich 1985; Littel and LaRocco 1985) and found to be simple, rapid and sensitive. This method provides results in a matter of minutes rather than hours or days.

To our knowledge, no data have yet been published on ATP measurement of maple sap and prediction of maple syrup characteristics. Since physicochemical and sensory properties are important in relation to the commercial value of maple syrup, ATP bioluminescence measurement would appear to be a rapid and simple way to estimate the microbial contamination of sap and predict maple syrup quality. Accordingly, the aim of the present study was to verify the use of ATP bioluminescence for predicting the microbial quality of maple sap and estimating the physicochemical and sensory attributes of maple syrup.

Materials and methods

Maple sap and syrup samples

Samples of maple sap that had been concentrated by reverse osmosis (R.O.) and were considered representative of the sap processed into syrup were obtained from 17 maple producers in six different regions of Quebec (Canada). The samples were collected before entering into the evaporator at different times of the season from the beginning to the end. Since the sap samples had not been concentrated by R.O. to exactly the same sugar content (6 to 8°Brix), the results related to microbial counts, bioluminescence and invert sugar percentage were standardized for a sap density of 2°Brix. The producers also provided samples of syrup corresponding to the sap samples. The samples of sap and corresponding syrup were frozen at the sugarhouse before being sent to the laboratory for analysis.

Plate counts

Samples of sap were diluted in peptone water and plated on plate count agar (Difco laboratories, Detroit, MI USA.) to determine the total aerobic counts (T.A.C.) and on acidified potato dextrose agar (Difco) to determine the yeast and mould counts. The plates were incubated for 10 days at 7°C for T.A.C. and for 5 days at 25°C for yeast and mould counts. Microbial counts were expressed in colony forming units per millilitre (CFU/mL).

ATP bioluminescence measurement

Bioluminescence of the sap samples was measured with a LUM-T™ luminator (Charm Sciences Inc., Malden, MA USA) and with a PocketSwab® Plus (Charm Sciences Inc.). For the measurements, the reaction tube was removed from the PocketSwab, the first membrane was punctured and 100µL of sap were introduced into the first section of the tube. The tube was reinserted on the PocketSwab and the swab was introduced into the first section of the reaction tube and held for 20 seconds to permit the extraction of ATP, after which it was pushed down to the bottom of the tube for the reaction between ATP and luciferase. Then, the tube was immediately put into the luminator to obtain the bioluminescence reading. Bioluminescence emitted from the reaction was expressed in relative light units per millilitre (RLU/mL).

Physicochemical analysis

Samples of sap were analysed for density and invert sugar percentage (glucose and fructose), while maple syrups were analysed for colour and acetic acid percentage. Density of sap in °Brix was measured using an ABBE Mark II refractometer (Reichert Scientific Instruments, Buffalo, NY USA). The percentage of invert sugar was determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC) using a differential refractometer detector (Waters 410, Waters, Millipore Corporation, Milford, MA USA). An autosampler (Wisp 712, Waters, Millipore Corporation, Milford, MA USA) was used to inject 10 µL of diluted samples into the column (Waters Sugar-Pak-I, Waters, Millipore Corporation, Milford, MA

USA), which was maintained at 90°C. Calcium di-sodium EDTA (Sigma, St-Louis, MO USA) solution (0.05g/L) was used as the mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min.

Colour intensity was measured by reading the percentage of light transmittance of syrup at 560 nm in a UV/VIS spectrophotometer (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA) using pure glycerol (Fisher, A.C.S. certified) as a 100% transmittance reference. The samples were centrifuged for 10 minutes at 9000 RPM (International Equipment Company, Needham Hts, MA, USA) prior to transmittance reading. The transmittance value was then used for colour grading in accordance with the provincial regulations on colour grading of maple syrup (Gouvernement du Québec, 1998). The colour attributes for syrup are as follows: extra light, light, medium, amber and dark. The percentage of acetic acid in the syrups was determined by HPLC with a programmable multiwavelength detector (Waters 490E, Waters, Millipore Corporation, Milford, MA, USA). An autosampler (Waters 717, Waters, Millipore Corporation, Milford, MA, USA) was used to inject 10 µL of diluted samples into the column (ION 300, Interaction Chromatography, Inc., San Jose, CA. USA), which was maintained at 30°C. Sulphuric acid (0.11g/L) was used as the mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min.

Sensory analysis

Samples of syrup were submitted to five trained taste panelists for organoleptic evaluation. The tasters were trained to detect foreign flavours and characteristic maple flavours in maple syrup. Each taster had to grade the intensity of both foreign and maple flavours on a scale from 1 to 4, and averages were calculated from the scores of the five

tasters. Organoleptic attributes were given to the syrup samples according to the assigned scores, as follows: superior (score greater than 3.5), standard (score between 2.5 and 3.5), slight off-flavour (score between 1.5 and 2.5), strong off-flavour (score lower than 1.5).

Statistical analysis

General regression procedures (PROCREG) were computed (SAS/STAT, version 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC. USA) on the ATP and T.A.C. measurements. The regression equation and the coefficient of determination (r^2) were calculated from the linear regression between ATP and T.A.C.

Results and discussion

ATP versus microbial counts

Results of the microbial enumeration of sap samples indicate that bacteria are predominant in relation to yeasts and moulds. Table 1 shows the evolution during the tapping season of the respective types of microbial contamination.

Table 1 – Average levels of total aerobic counts (T.A.C.) and yeast and mould populations during the tapping season

Time of season	T.A.C. (log CFU/mL)	Yeasts (log CFU/mL)	Moulds (log CFU/mL)
Early (n = 35)	5.62 (± 1.19)	3.64 (± 1.07)	3.27 (± 0.75)
Middle (n = 37)	6.12 (± 0.62)	4.37 (± 0.78)	3.83 (± 0.75)
Late (n = 29)	6.98 (± 0.67)	5.12 (± 0.62)	4.30 (± 0.72)

Since maple sap is sterile in the xylem of maple trees (Morselli and Whalen 1991), it follows that these microorganisms must be introduced into the sap after tapping through unsanitary tapping procedures and/or the contaminated surfaces of collection tubes, reverse osmosis systems and storage tanks. This contamination depends on time and weather conditions. This finding is in accordance with previous research, in which *Pseudomonas* spp. were found to be predominant in maple sap (Sheneman and Costilow 1958). Following measurement of the ATP content of sap, a good correlation ($p < 0.0001$) was found between RLU/mL and CFU/mL values as shown in Figure 1 in the range of normal sap contamination, with a coefficient of determination (r^2) of 0.7288. This result shows that ATP measurement of sap is a reliable means of estimating sap contamination. This estimation is comparable to other estimations obtained from other fluid samples such as

raw milk (Phillips and Griffiths 1985; Reybroeck and Schram 1995) and orange juice (Graumlich 1985). The ATP method also offers the advantage of giving an estimate of total contamination regardless of the type of microorganisms present. This method was performed rapidly (in minutes) and easily, unlike the modified resazurin method, and no ATP of nonmicrobial origin was found in the sap after aseptic filtration.

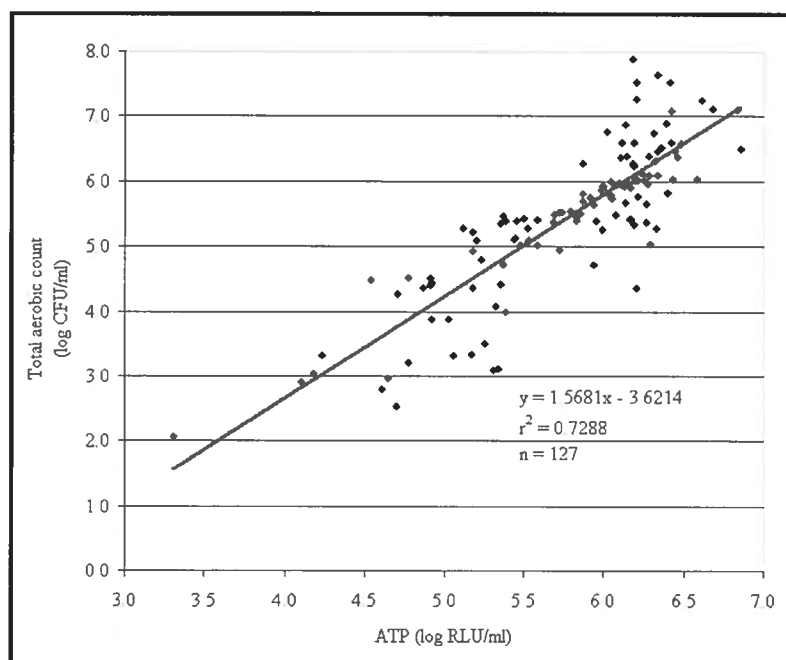


Figure 1 – Correlation between ATP content of sap obtained by bioluminescence and total aerobic count

ATP versus syrup colour

The syrups obtained from the corresponding sap samples were analysed for their colour grade and grouped into different sap contamination classes after the bioluminescence analysis (Figure 2). As shown in Figure 2, syrups of lighter colour grades were derived primarily from saps with a low contamination level, whereas syrups of darker colour grades corresponded mainly to saps with a high contamination level. These results reflect the

activity of microorganisms in the sap, which has the effect of impairing the colour grade of syrup. This activity consists mainly in the hydrolysis of sucrose into glucose and fructose, hexoses that are more likely to react and form dark pigments when heated (Naghski and Willits 1957). Consequently, a high sap contamination level would cause hydrolysis of sap sucrose and result in syrup of darker colour. Figure 3 reports the invert sugar results for saps grouped into different contamination classes. Here, the saps with low contamination show zero or very low invert sugar concentrations, whereas saps with a high contamination level contain higher concentrations. In situations of high sap contamination, the activity of microorganisms contributes to the production of invert sugar, which affects the resulting maple syrup grade. However, a few sap samples grouped in the high sap contamination classes showed zero or very low concentrations of invert sugar, resulting in syrups of extra-light or light colour. This can be explained in part by the fact that sap with a high contamination level was collected and processed so rapidly that sucrose hydrolysis could not take place. This type of situation is likely to occur mid-season, when the weather is favourable for both microbial growth and high sap flow and the storage period is not long.

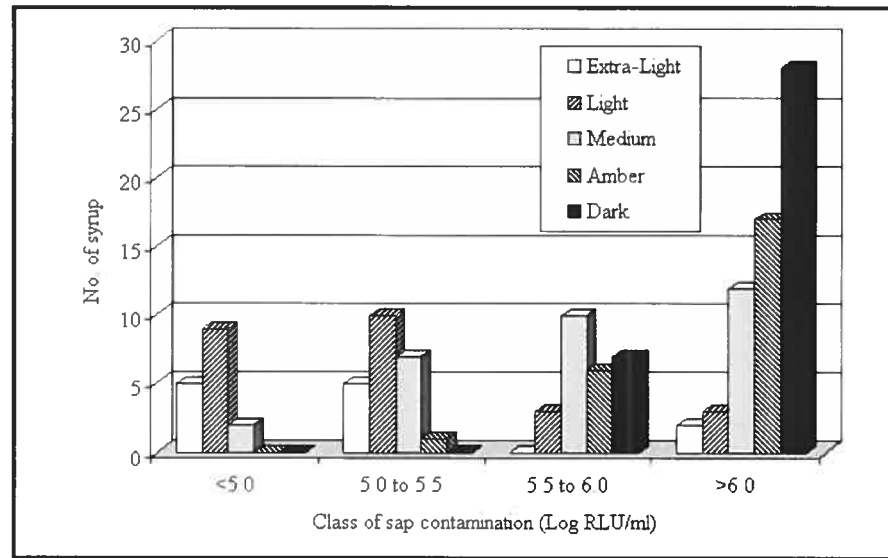


Figure 2 – Distribution of syrups according to colour grade into different classes of sap contamination obtained by bioluminescence

ATP versus syrup flavour

Sap contamination also has an impact on the organoleptic characteristics of syrup, as shown in Figure 4. In this figure, most of the syrups in the low sap contamination classes were found to be superior or standard in taste in sensory evaluation, while most of the syrups grouped in the higher sap contamination classes exhibited off-flavours. These results show that sap microorganisms contribute to the degradation of syrup organoleptic characteristics to some extent. The off-flavour attributes of maple syrup comprised characteristics such as intense caramel flavour or foreign flavour. Figure 5 also reveals the effect of sap contamination on maple syrup flavour by showing the presence of acetic acid in syrups made from sap with a higher level of microbial contamination. Acetic acid is not normally present in syrup made from sap with a lower level of microbial contamination,

and this can be seen in Figure 5. The presence of acetic acid gives maple syrup an undesirable taste, which contributes to the off-flavour attribute.

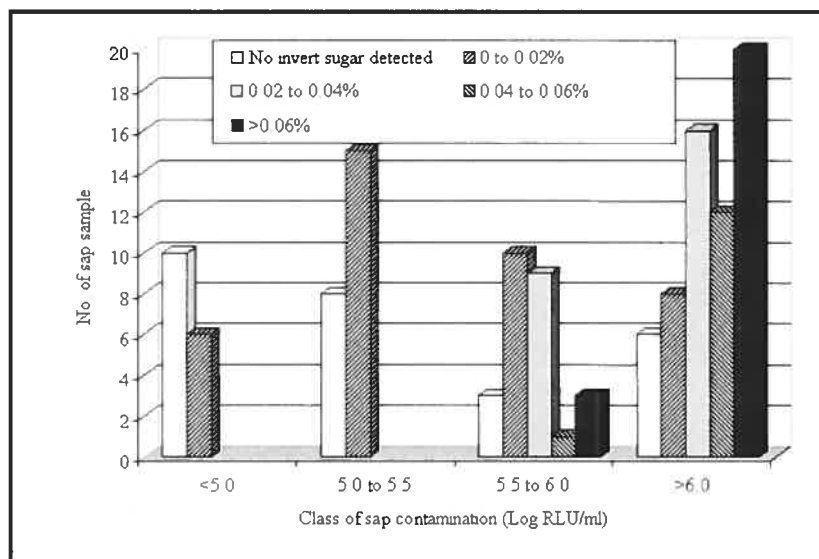


Figure 3 – Number of sap samples found for each sap contamination class according to the invert sugar content

In general, microbial contamination of maple sap giving bioluminescence levels (log RLU/mL) lower than 5.5 will yield a syrup with acceptable colour and flavour characteristics, whereas sap with levels higher than 5.5 will predominantly result in syrups with lower colour and flavour grades. These results indicate that the commercial value of maple syrup is highly dependent on the extent of microbial contamination of maple sap. Hence, this factor deserves considerable attention.

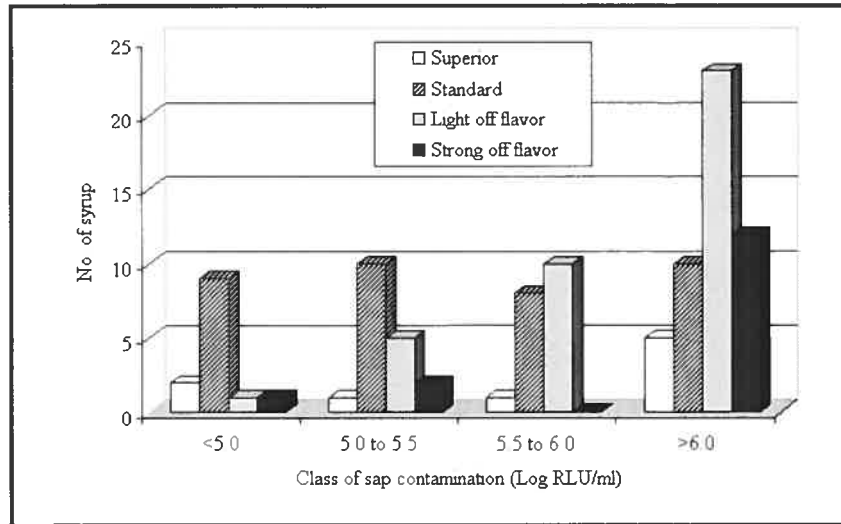


Figure 4 – Distribution of syrups according to organoleptic attributes into different sap contamination classes obtained by bioluminescence

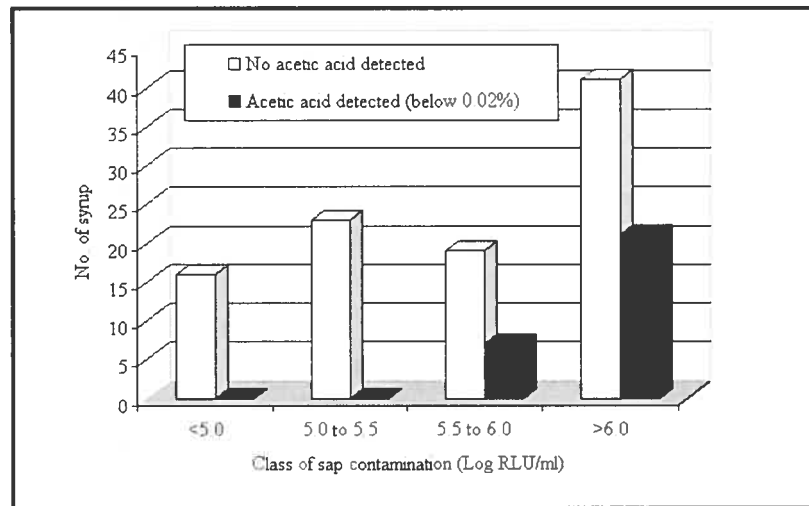


Figure 5 – Distribution of syrups according to the absence or presence of acetic acid into different sap contamination classes obtained by bioluminescence

Conclusions

In the present study, which involved the application of ATP bioluminescence as a method of measuring maple sap microbial contamination, the values obtained were found to correlate with total aerobic count. This method is easier and gives quicker results than both the standard plate count method and the modified resazurin method. In view of this, ATP bioluminescence represents a useful method for improving sanitation procedures and predicting maple syrup characteristics. According to our findings, ATP bioluminescence of sap gave an adequate assessment of maple syrup colour and flavour, keeping in mind that other factors besides the microbial contamination level of sap can affect the characteristics of maple syrup, one such factor being the control of the evaporation process. In most cases, maple sap with ATP bioluminescence values greater than 5.5 log RLU/mL resulted in maple syrup with a lower grade colour and flavour. This situation has serious implications for the commercial value of maple syrup and hence for the maple industry at large.

Acknowledgements

The authors are grateful to the maple producers who participated in the project by supplying the samples of sap and syrup needed for the experiments and to the regional maple advisor with the Quebec Department of Agriculture, who supervised the sampling. Thanks go also to J. Lefebvre of Biocontrôle (supplier of the Charms Sciences Inc. products) for technical advice and to M. Cournoyer, C. Charron and R. Gaudy for their technical work.

References

- AOAC.** 1984. Bacterial population of maple sap. In: Williams S, editor. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. p 600.
- Bautista DA, Sprung DW, Barbut S, Griffiths MW.** 1997. A sampling regime based on an ATP bioluminescence assay to assess the quality of poultry carcasses at critical control points during processing. *Food Res Int* **30**: 803-809.
- Branger A, Cuvillier I, Rabhi L.** 1995. Dosage de l'ATP microbien pour l'estimation de la flore totale du lait cru. *Lait* **75**: 295-299.
- Edson HA.** 1912. Micro-organisms occurring in maple sap and their influence on the color, flavor and chemical composition of sirup. In: Micro-organisms of maple sap. Hills JL, editor. Univ. Vt. Agric. Exp. Stn. Bull. 167: 333-418.
- Fabian FW, Buskirk HH.** 1935. *Aerobacter aerogenes* as a cause of ropiness in maple sirup. *J Ind Engin Chem* **27**: 349-350.
- Gouvernement du Québec.** 1998. Les produits de l'érable et leur succédanés. In: Règlement sur les aliments. Ch. 8.
- Graumlich TR.** 1985. Estimation of microbial populations in orange juice by bioluminescence. *J Food Sci* **50**: 116-117.
- Griffiths MW.** 1993. Applications of bioluminescence in the dairy industry. *J Dairy Sci* **76**: 3118-3125.
- Holgate KC.** 1950. Changes in the composition of maple sap during the tapping season. N.Y. State Agr. Exp. Sta. Bull. 742: 1-14.

- Kissinger JC.** 1969. Modified resazurin test for estimating bacterial population in maple sap. *JAOAC* **52**: 714-716.
- Kissinger JC.** 1974. Collaborative study of a modified resazurin test for estimating bacterial count in raw maple sap. *JAOAC* **57**: 544-547.
- Littel KJ, LaRocco KA.** 1985. Bioluminescent standard curves for quantitative determination of yeast contaminants in carbonated beverages. *J Food Prot* **48**: 1022-1024.
- Morselli MF, Whalen ML.** 1991. Aseptic tapping of sugar maple (*Acer saccharum*) results in light color grade syrup. *Can J For Res* **21**: 999 – 1005.
- Murphy SC, Kozlowski SM, Bandler DK, Boor KJ.** 1998. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. *J Dairy Sci* **81**: 817-820.
- Naghski J, Willits CO.** 1957. Maple sirup. XI. Relationship between the type and origin of reducing sugars in sap and the color and flavor of maple sirup. *Food Res* **22**: 567 – 571.
- Phillips JD, Griffiths MW.** 1985. Bioluminescence and impedimetric methods for assessing shelf-life of pasteurized milk and cream. *Food Microbiol* **2**: 39-51.
- Reybroeck W, Schram E.** 1995. Improved filtration method to assess bacteriological quality of raw milk based on bioluminescence of adenosine triphosphate. *Netherlands Milk & Dairy J* **49**: 1-14.
- Sheneman JM, Costilow RN.** 1958. Identification of micro-organisms from maple tree tapholes. *Food Res* **24**: 146-151.
- Siragusa GR, Cutter CN.** 1995. Microbial ATP bioluminescence as a means to detect contamination on artificially contaminated beef carcass tissue. *J Food Prot* **58**: 764-769.

Siragusa GR, Cutter CN, Dorsa WJ, Koohmaraie M. 1995. Use of a rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect contamination on beef and pork carcasses. *J Food Prot* **58**: 770-775.

Sutherland AD, Bell C, Limond A, Deakin J, Hunter EA. 1994. The biotrace method for estimating bacterial numbers in milk by bioluminescence. *J Soc Dairy Technol* **47**: 117-120.

ANNEXE II

Microbiology of maple sap and biofilm formation in maple sap collection systems

Lagacé, L.^{1,2*}, M. Jacques², M. Pitre³, A. A. Mafu³, and D. Roy⁴

¹Centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole Inc. 3600 boul. Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Qc. J2S 8E3, Canada.

²Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Qc. J2S 7C6, Canada.

³Centre de recherche et de développement sur les aliments, Agriculture et Agro-alimentaire Canada, 3600 boul. Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Qc. J2S 8E3, Canada.

⁴Département des sciences des aliments et nutrition, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec, Qc. G1K 7P4, Canada.

Tree Sap. 3rd edition. Proceedings of the 3rd International Symposium on Sap Utilization (ISSU), Bifuka, Japan, 2005. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan.

Sous presse.

Abstract

Maple sap is the sweet exudate collected from maple trees during the spring season to produce maple syrup. It is a rich medium composed mainly of organic compounds and minerals that can support the growth of many species of microorganisms. These microorganisms are bacteria, yeasts and moulds that can develop in the taphole of maple trees as well as in the sap collection system in the form of a biofilm. The biofilm can be thought of as a reservoir of microorganisms that will continuously inoculate the sap and consequently modify its chemical composition. Microbial growth in maple sap has been known for a long time to be detrimental for maple syrup quality with regards to its colour, texture and taste. The microbial community of maple sap and biofilm was recently studied using molecular tools such as the amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and scanning electron microscopy. These methods have permitted the observation of the biofilm formation on the interior surface of tubing of the sap collection system and the characterization of maple sap microbiota by the identification of many species of bacteria in which, *Pseudomonas* species occupied an important place. A review of the results obtained with these techniques will therefore be presented here along with a comprehensive discussion on the relevant impact of these findings.

Introduction

In Canada, the maple syrup industry occupies an important place (second in single commodity exports), representing about 85 percent of the world's maple syrup production (2). There are more than 10,300 maple syrup producers in Canada exploiting over 33,680,000 taps, the majority in the province of Quebec, with the remainder in Ontario, New Brunswick and Nova Scotia. The success of this industry notably relies on the quality of its maple products. This quality is basically characterized by the colour, viscosity and flavour of the maple syrup. Maple syrup with a light colour, a low viscosity and a characteristic maple flavour exempt of any off flavours, will be considered as a high quality syrup. The quality of maple syrup is considered to be highly influenced by the microbial spoilage of maple sap (24, 27, 28). Since maple sap is a rich medium composed mainly of sugar (sucrose, glucose and fructose) and other organic compounds (organic acids, nitrogenous and phenolic compounds) as well as minerals (calcium and potassium) (26), it can support the growth of many species of microorganisms. Today, modern systems to collect maple sap are used by the great majority of maple producers. This has intensively increased the productivity of the sugaring operations and by the same way, provided maple syrup producers with new challenges. One of them is to control the biofilm formation on the interior surface of tubing used in maple sap collection systems. Thus, the characterization of maple sap microbial community and biofilm are important to understand the causes of sap spoilage and to improve the overall quality and commercial value of

maple products. This paper will review the process of sap microbial contamination and the results of our latest studies on maple sap microflora and biofilm.

Process of maple sap collection

During the last 30 years, the Canadian maple syrup industry has introduced some of the most innovative systems in maple technology to improve production efficiency. For instance, maple sap collection tubing system using vacuum pumps are intensively used by maple syrup producers. Instead of collecting sap in buckets, a modern system consists of a tubing network to collect sap from every taphole of the sugarbush. This practice avoids the necessity to walk from tree to tree to gather sap runs and is especially useful for larger productions. Typically, maple sap collection systems are designed to allow maple sap to flow through the spout inserted in a taphole and into a small diameter tube (lateral line) connected to a larger one (main line) to finally reach the sap tank (transitory storage) normally found in a pumping station located in the sugarbush (Fig 1). This is generally accomplished with vacuum applied to the tubing system. From the first tank, maple sap is then pumped into a second sap tank (final storage) located at the sugarhouse. Maple sap will accumulate in this last sap tank before being partially concentrated by reverse osmosis (8 to 10°Brix). Concentrated sap will then be transformed to maple syrup by heating in an evaporator to reach the desired legal 66°Brix concentration (16). The maple syrup will then be filtered on a filter press before being packed. The description of the process typically used to collect sap in modern installations clearly illustrates the high amount of surfaces

coming in contact with maple sap and the high risk of contamination of these surfaces by microorganisms.

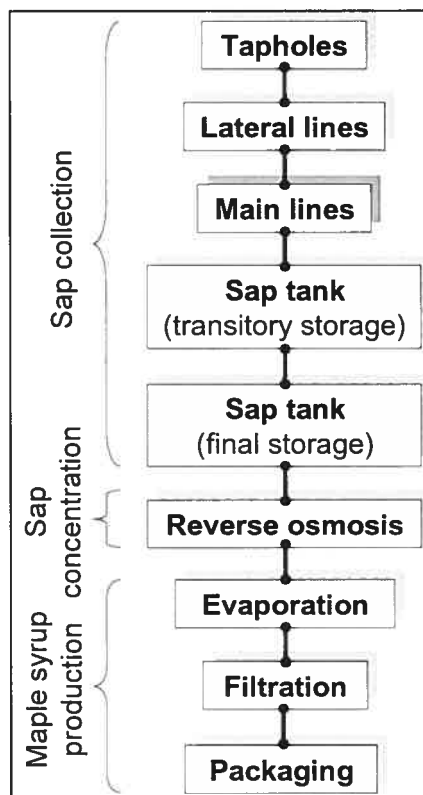


FIG. 1. Diagram of modern maple syrup production. Maple sap flows from the tapholes into the tubing collection system followed by reverse osmosis concentration and maple syrup processing.

Sources of maple sap microbial contamination and impact on maple syrup quality

It was previously reported that the wood tissue of a healthy maple tree is sterile or practically sterile before tapping (27). Therefore, microorganisms found in maple sap at the early stage of contamination have to come from an external source. The taphole constitutes for microorganisms the first point of entry in maple sap. Microorganisms can notably be introduced in maple sap during the tapping procedures. Microorganisms found in the

surrounding environment of the taphole (taping instruments, air, bark, etc.) can contaminate the taphole and grow in this micro-environment during the sap flow season. High levels of microbial counts have already been measured in maple sap directly coming out of the taphole (23, 27). Intense microbial contamination of the taphole has been associated in the past to a decrease, at least in part, of the sap flow by blocking the wood vessels causing a shortage of productivity (34). Microorganisms introduced in the tapholes will be transported by the sap flow and have the chance to circulate in the tubing system, adhere to its inner surface and proliferate all along the sap flow season. Furthermore, microorganisms may also find their way into the sap collection system through leaks sometimes appearing at the junctions of the tubing network. Of course, microorganisms already present on the inner surface of the tubing network prior to sap flow season will participate to the overall sap microbial contamination. In addition to the tubing system, the surface of sap tanks may also be the site of microbial contamination, especially if the sap is sitting for long periods at a moderate temperature (35). The reverse osmosis system will also accumulate microorganisms at the surface of the materials composing this equipment if sanitary maintenance is not properly done. A high level of sap microbial contamination may also eventually affect the performance of reverse osmosis equipment and the overall process at the same time. Considering all these aspects of the sap collection system, it is imperative to take appropriate measures in the installation and maintenance of the system to avoid intense microbial contamination. It is therefore recommended to maintain a proper slope and appropriate tubing size to avoid sap to remain in dead points of the system and to limit the amount of unnecessary surfaces available for microbial growth. Furthermore, as a

preventive practice to control microbial growth, it is also recommended that the collection system be rinsed and/or disinfected followed by abundant rinsing with water as needed (1, 17). These considerations are particularly important in order to avoid microbial spoilage of maple sap which will affect the quality of maple syrup especially its colour, texture and taste. Intense microbial growth will notably lead to the production of dark colour and high viscosity syrup and will also affect maple syrup taste by masking its fine and characteristic maple flavour (10, 24, 27, 29). Figure 2 shows how microorganisms can grow in maple sap during the sap flow season.

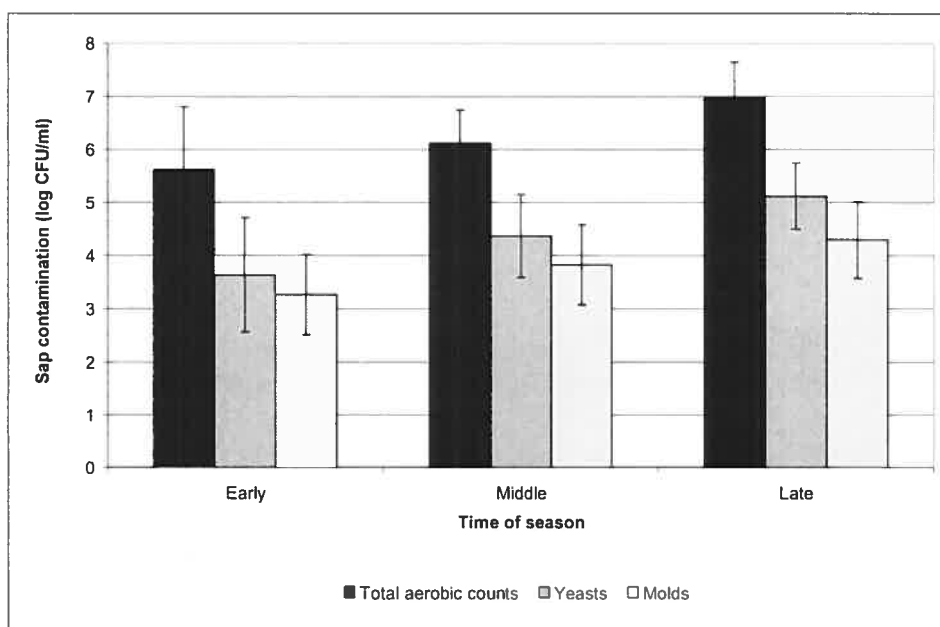


FIG. 2. Microbial growth in maple sap during the sap flow season (24). Microbial populations increase with time. Bacteria are predominant in number compared to yeasts and moulds.

As it is generally observed, bacterial counts in maple sap are higher than fungi counts (yeasts and moulds). This is similar to what was also previously observed with traditional methods to collect maple sap (35). Microorganisms of maple sap have the ability to degrade

the sucrose molecule, the main organic component of maple sap, into glucose and fructose (invert sugar). The formation of invert sugar in maple sap will consequently produce syrup with dark colour and strong caramel flavour through non enzymatic browning reactions after heat evaporation (28). This will decrease the quality and commercial value of maple syrup. It was recently demonstrated that the ATP-bioluminescence method may be used to monitor the microbial contamination of maple sap (24). This simple and rapid method can be used to identify highly contaminated sap that can reduce the quality of maple syrup. Microbial contamination measured by ATP-bioluminescence correlated well with standard plate count methods and was useful to predict, to a certain extent, the colour and flavour of maple syrup.

Identification of maple sap microorganisms by Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and large subunit (LSU) rRNA gene sequencing

Microorganisms of maple sap started to gain interest from scientists in the early 1900's. In 1912, Edson studied the microbiology of maple sap with the isolation and characterization of many species of bacteria, yeasts and moulds, and by the demonstration of their detrimental effect on the quality of maple syrup (9). Later, Sheneman and Costilow (33) studied microorganism populations growing in maple tree tapholes. They observed that over two-thirds of the bacterial isolates obtained were Gram-negative bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Achromobacter* and *Flavobacterium*. *Trichosporon pullulans* and *Rhodotorula glutinis* were the yeast species most frequently encountered, while *Candida*, *Cryptococcus* and *Torulopsis* were less commonly observed. For their part, *Penicillium* and

Phoma were among the mould genera most frequently recognized. These interesting studies on maple sap microflora were however conducted before modern sap collection systems were introduced. Since this modernization, no comprehensive studies were carried out to characterize the maple sap microflora. In parallel to the evolution of the sugarbush operations, the microbiological identification methods have also considerably evolved over the years. For instance, methods using the 16S rRNA gene to identify microorganisms are now intensively used in phylogeny studies. The amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) is one of these molecular methods. It has notably been used to analyse the bacterial community of many types of environments such as food (4, 15, 32). An update of the bacterial community composition was recently made (23). In our study, cultivable bacterial isolates have been obtained from maple sap at different periods of the 2001 and 2002 sap flow seasons and have been analysed by the ARDRA method described in Figure 3. Bacterial isolates showing the same restriction pattern after ARDRA analysis were regrouped and the 16S rDNA gene of representative isolates for each group was sequenced. Regrouping of isolates with the same restriction pattern minimizes the need of sequencing since isolates found in a same group are highly similar. Sequence results of the partial 16S rRNA gene for each group representatives were then compared to database sequences to determine the similarity to previously published sequences. The results of ARDRA analysis on maple sap isolates are summarized in Figure 4. From this study, it was found that the maple sap microflora is composed of many species of bacteria grouped into 32 different groups. Gram-negative bacteria were more frequently encountered than Gram-positive

bacteria, representing more than 70% of the total isolates. There were also a total of 22 different genera found, from which, the *Pseudomonas* genus was largely

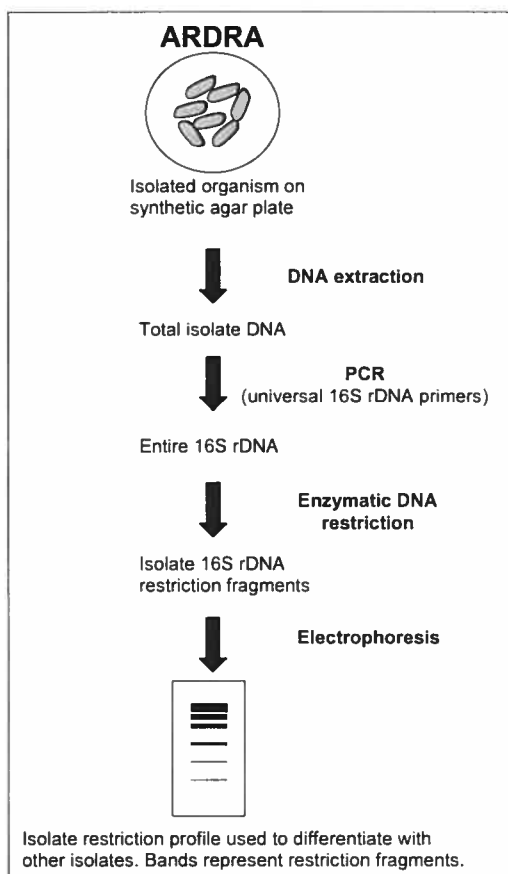


FIG. 3. Diagram describing the Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) used for the characterization of the bacterial community of maple sap.

predominant (total frequency %) followed by the *Ralstonia* genus. *Staphylococcus*, *Plantibacter* and *Bacillus* were the most highly represented genera for Gram-positive bacteria. These results are providing an interesting profile of the bacterial community of the maple sap. The results obtained in our study are in agreement with previous works using traditional identification methods and does not differ greatly with the results of Sheneman and Costilow (33) in the predominant genera observed. It became evident in our study that the bacterial community of maple sap is composed of genera that have already been found

in other natural environments such as forest soils, for which, members of the proteobacteria occupy an important place (6). This suggests that most part of the microbial contamination is introduced into maple sap from the surrounding environment of the tapholes and the sap collection system.

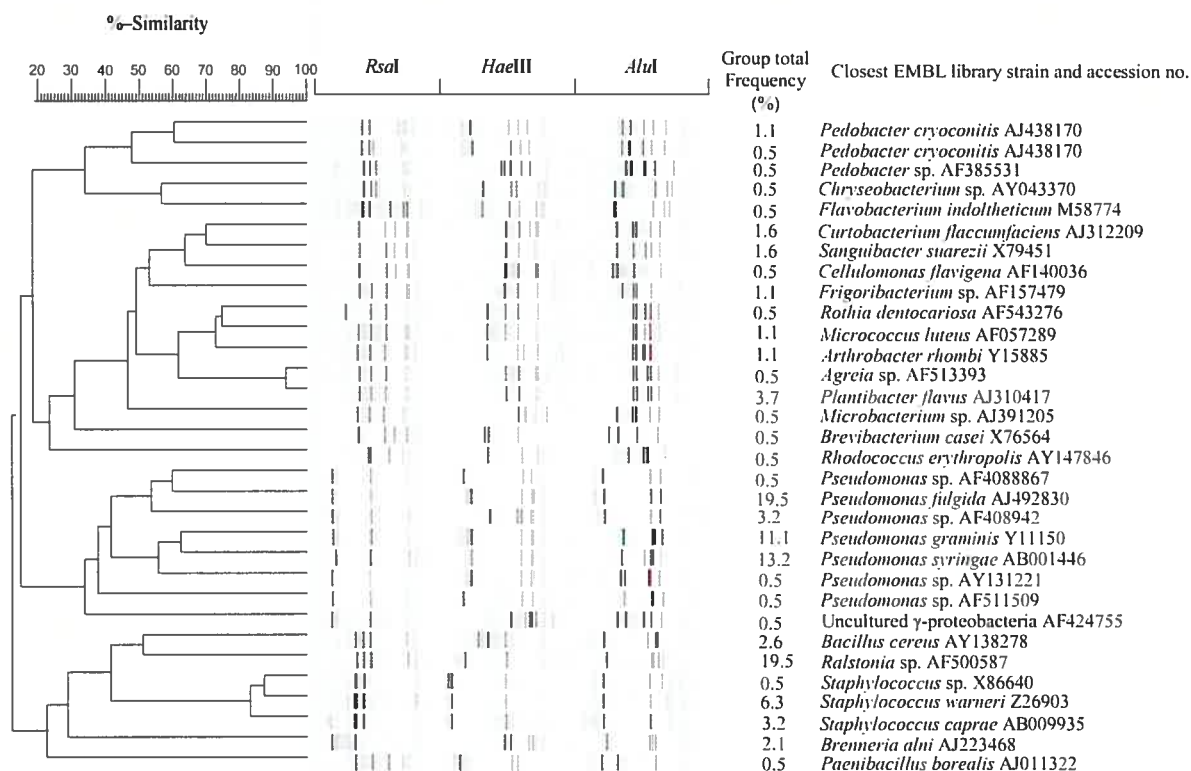


FIG. 4. Dendrogram using the UPGMA clustering procedure showing each ARDRA group of maple sap bacterial isolates obtained after independent restriction digestion of the amplified 16S rRNA gene with three different enzymes (*RsaI*, *HaeIII*, and *AluI*). Total frequency (%) of the group and the closest library strains with accession no. after sequence similarity analysis are shown for each ARDRA group (23).

In addition to the study of maple sap bacterial community, identification of yeasts was also performed on isolates from maple sap obtained during the 2001 and 2002 seasons. All isolates were obtained on synthetic medium (potato dextrose agar acidified with tartaric

acid) after five days of incubation at 25°C. Instead of cultural methods to identify yeasts, molecular methods are becoming more and more frequently used (11, 22, 13, 37). The identification method used in this case was based on sequence analysis of the large-subunit rDNA D1/D2 domain according to the protocol of Kurtzman and Robnett (22). Results are presented in Figure 5 in a dendrogram showing the relationship between yeasts isolates of maple sap based on their sequence similarity. According to Fig. 5, the majority (96%) of yeasts obtained from maple sap belonged to the Basidiomycota phylum and were regrouped under the Hemenomycetes (Heterobasidiomycetes) and Urediniomycetes classes (3). There were 15 different genera encountered, the most frequent were *Cryptococcus* (49%), *Trichosporon* (16%) and *Sporobolomyces* (15%). Based on similarity to GenBank sequences, *Cryptococcus victoriae* was found to be the most highly represented species from the genus *Cryptococcus* with 30 isolates. This result differs slightly from a previous study (33) using traditional identification methods where the *Cryptococcus* genus was less frequently encountered. Nevertheless, many of the yeasts species found in maple sap have already been known to cause food spoilage in numerous amounts of different food items (13). The results obtained are also in agreement with previous studies on the occurrence of yeasts in the forest soils and where similar genera were predominant (36). Again, this suggests that the environment (soil) is the origin of predominant yeast contamination of maple sap.

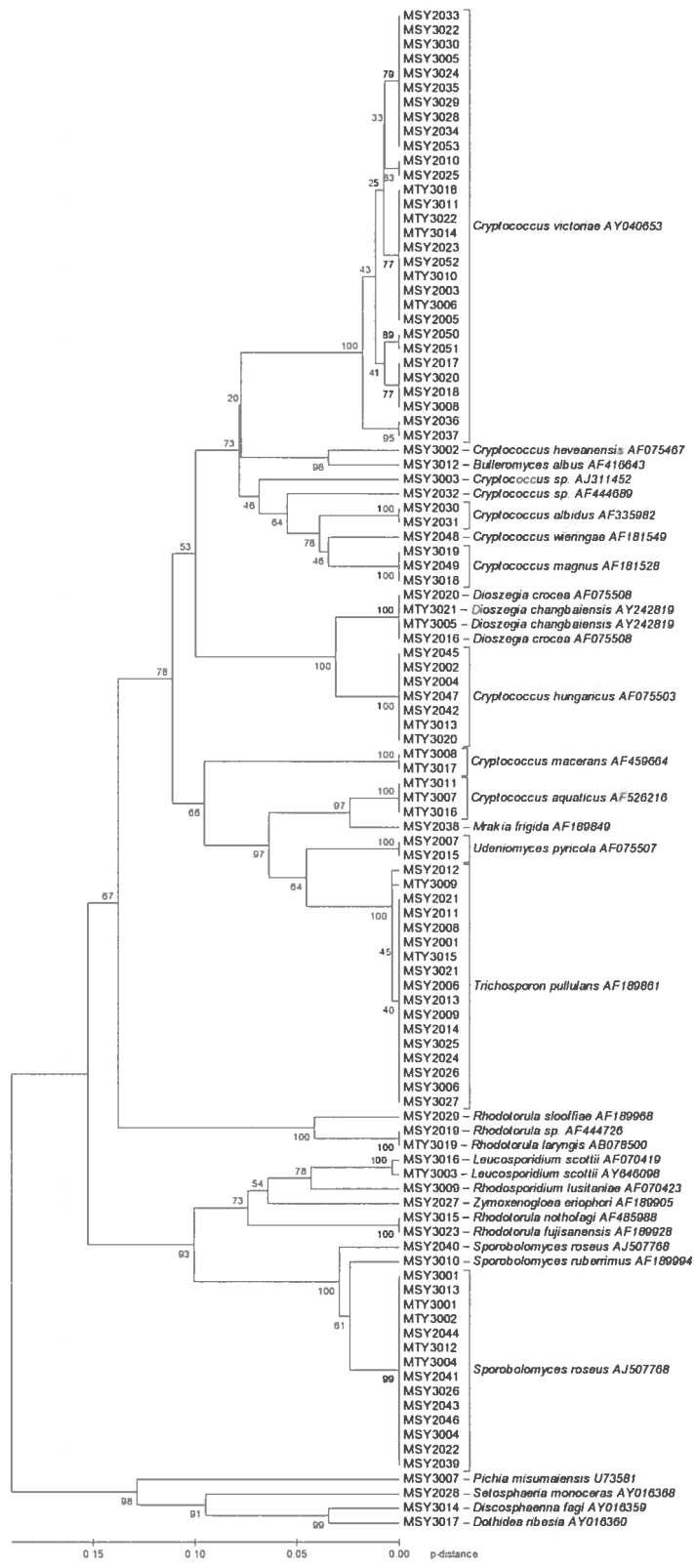


FIG. 5. Dendrogram of yeast maple sap isolates derived from UPGMA clustering procedure of LSU domain D1/D2 of rRNA gene. DNA extraction, PCR and sequencing methods were based on Kurtzman and Robnett (22). Isolates are designated by their strain no. and clusters are designated by organism names and accession no. after sequences comparison of isolates with sequences from GenBank database.

Biofilm formation in maple sap collection systems

The formation of biofilm on hard surfaces is ubiquitous in nature. Many species of bacteria and fungi have the ability to produce a biofilm under different conditions. *Pseudomonas* spp. figures among the bacteria that have demonstrated their ability to produce a biofilm on biotic and abiotic surfaces with different specific impacts notably on human (8) and plant (31) diseases as well as on food hygiene (18, 21). The biofilm can be defined as a consortium of microorganisms adhering to a surface and embedded in an extracellular polymeric substance (EPS) produced by the microorganisms (7). The formation of biofilm will eventually offer a protection against external stress (pH, drought, temperature, etc.) to microorganisms contained in the structure. In recent years, it has been recognized that biofilm formation is a highly regulated process in which, many genes are involved (30). Biofilm formation is known to proceed through multiple steps (Fig. 6). Briefly, planktonic cells attach to the surface first reversibly, then irreversibly, and start to develop microcolonies (colonization). These microcolonies then proliferate and mature into a biofilm with different shapes depending on environmental conditions and type of microorganisms (38). Biofilm formation has been intensively studied over the last few

decades and the impact on the food industry has also been reviewed (5, 21, 25). For the maple syrup industry, the biofilm forming on the inner surface of sap collection systems

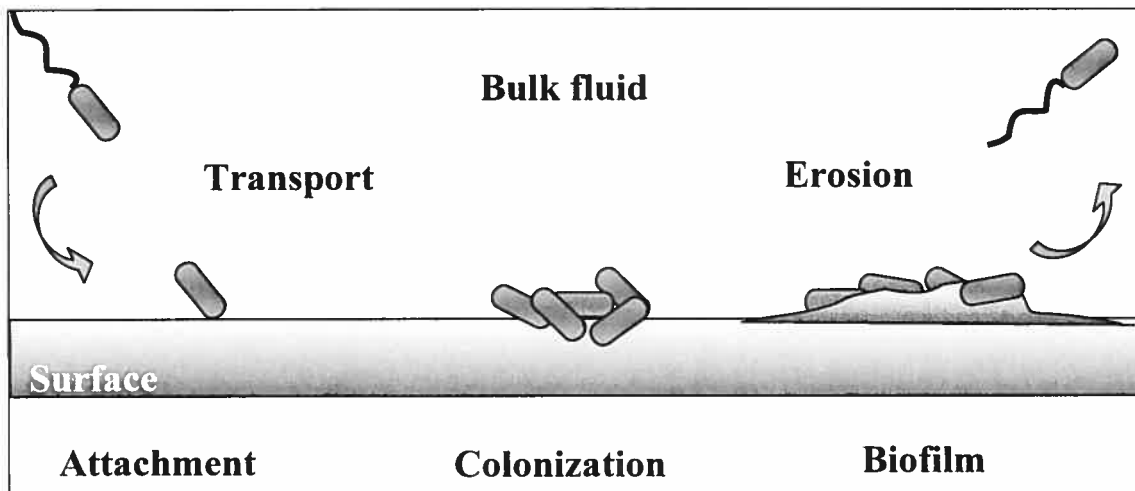


FIG. 6. Schematic representation of the steps involved in biofilm formation.

can be thought of as a reservoir of microorganisms that will continuously inoculate the sap and consequently modify its chemical composition. Before our study on the biofilm formation, preliminary studies (19, 20, 14) and field experience suggested that the maple sap collection systems were colonized by microorganisms. From our work, it was demonstrated that microorganisms not only adhered to but also produced mixed species biofilms on the surface of the sap collection system. Examples of microbial adherence and biofilm formation at the surface of the maple sap collection system are presented in Figure 7, showing scanning electron micrographs of the surface taken at different periods of the sap flow season. At the beginning of the season (March 27th), the surface appears clean with a few microbial cells observed sporadically. As the season progresses, the

contamination starts to take place and the number of adhered cells increases (April 8th). After a longer period (April 13th), microbial contamination of the surface is well established and the coverage of the surface by microbial cells is significant. The structure of the biofilm

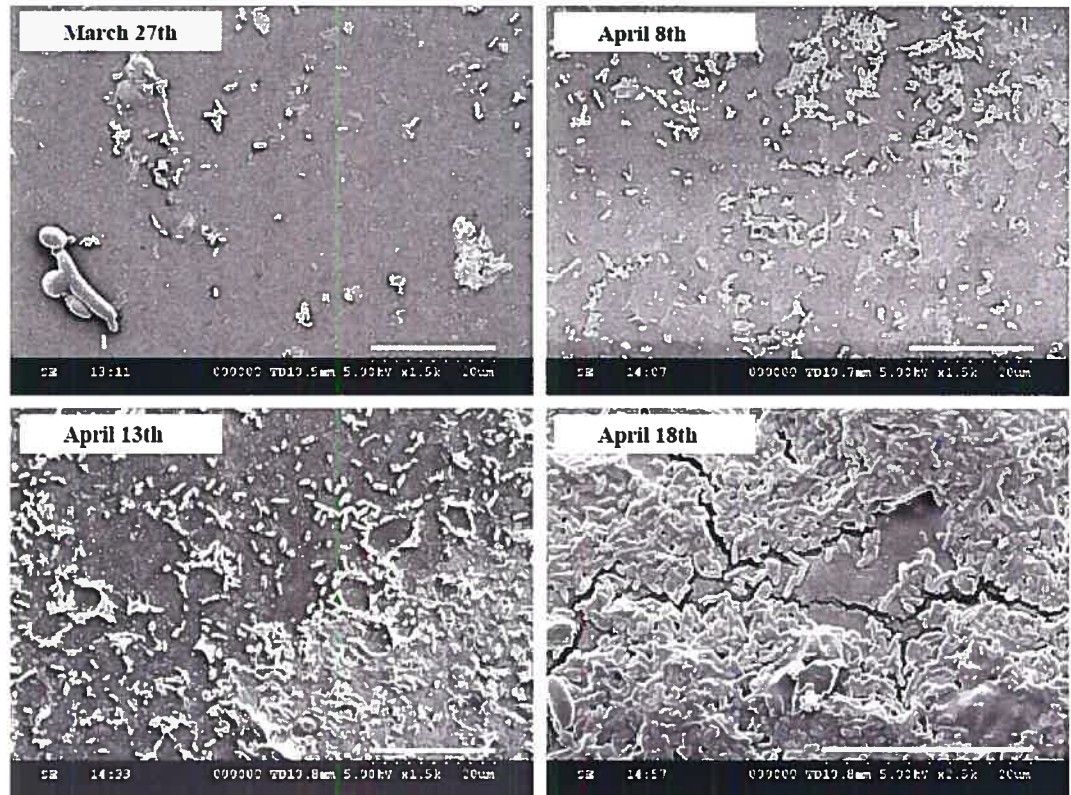


FIG. 7. SEM micrographs of maple sap collection system surfaces at different time during the sap flow season. Surfaces bacterial populations were respectively for panel 1 (March 27th) : 2.3 log cfu/cm²; panel 2 (April 8th) : 3.1 log cfu/cm²; panel 3 (April 13th) : 5.8 log cfu/cm² and panel 4 (April 18th) : 6.2 log cfu/cm². Bars correspond to 20 μ m.

is visible and quite important at certain places on the surface. During the last part of the sap flow season, biofilm formation is marked. It can be seen on Figure 7 (April 18th) that the structure of the biofilm is well developed and that microbial cells are sheltered by a layer of

EPS. According to Figure 7, most of the microbial cells observed on the surface of the sap collection system correspond to rod shape bacterial cells. Some fungi cells (yeasts) are present but only sporadically (March 27th and April 18th). Looking at Figure 7, it's easy to imagine that the biofilm can offer a protecting structure to adhered microbial cells against environmental stresses as well as cleaning and disinfection treatments. It is therefore important to adopt measures that will control the formation of biofilm in order to avoid microbial spoilage of maple sap. Future development of new materials and maintenance procedures will from now on have to consider biofilm formation and how to control this phenomenon.

Conclusions

Food product quality is highly influenced by microbial contamination. Maple syrup production is no exception to this fact. Microorganisms introduced in maple sap from their environment will contribute by their metabolism, to the decrease in quality of maple products. Biofilm formation in modern maple sap collection systems will be associated to this phenomenon by providing a persistent source of spoilage microorganisms. This paper has brought an overview of the current methods used by producers to collect maple sap and has presented the latest results obtained on maple sap microbiota. Bacteria and yeasts represented by a great variety of species most likely composing microbial community of the sugarbush ecosystem, were outlined. The biofilm concept was also presented with clear evidence of biofilm formation on the inner surface of the sap collection system. These

findings will undoubtedly be useful for further research to improve the overall quality and commercial value of maple products.

References

1. **Allard, G.B., and M. Belzyle.** 2004. Cahier de transfert technologique en acériculture. Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec.
2. **Anonymous** 2003. Canada's agriculture, food and beverage industry. Canada's maple syrup industry. http://ats-sea.agr.ca/supply/3310_e.htm
3. **Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow.** 2000. Yeasts: Characteristics and identification. 3rd Edition. Cambridge University Press.
4. **Cambon-Bonavita, M. A., F. Lesongeur, S. Menoux, A. Lebourg, and G. Barbier.** 2001. Microbial diversity in smoked salmon examined by a culture-independent molecular approach – a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* **70**:179–187.
5. **Carpentier, B. and O. Cerf.** 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:499–511.
6. **Chow, M. L., C. C. Radomski, J. M. McDermott, J. Davies, and P. E. Axelrood.** 2002. Molecular characterization of bacterial diversity in lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**:347–357.
7. **Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:435–464.
8. **Donlan, R. M., and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiol. Reviews.* **15**:167–193.

9. **Edson, H. A.** 1912. Micro-organisms of maple sap. Bulletin no. 167. Vermont Agricultural Experimentation Station, University of Vermont.
10. **Fabian, F. W., and H. H. Buskirk.** 1935. *Aerobacter aerogenes* as a cause of ropiness in maple syrup. *Ind. Eng. Chem.* **27**:349–350.
11. **Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti, and A. Statzell-Tallman.** 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1351–1371.
12. **Fleet, G.** Spoilage yeasts. *Crit. Rev. Biotechnol.* **12**:1–44.
13. **Foschino, R., S. Gallina, C. Andrighetto, L. Rossetti, and A. Galli.** 2004. Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Res.* **4**:609–618.
14. **Frank, H. A. and C. O. Willits.** 1961. Maple sirup. XVIII. Bacterial growth in maple sap collected with plastic tubing. *Food Technol.* **15**:374–378.
15. **Giraffa, G., P. De Vecchi, and L. Rossetti.** 1998. Note: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *J. Appl. Microbiol.* **85**:918–924.
16. **Gouvernement du Québec.** 1998. Les produits de l'érable et leurs succédanés. In. Règlements sur les aliments. Ch. 8.
17. **Heiligmann, R. B., M. R. Koelling, R. R. Morrow, L. Staats, L. Myott, G. Cook, G. Buzzell, M.F. Morselli and S. Williams.** 1996. Maple sap production – Tapping,

- collection and storage, p. 49–71. *In* M. R. Koelling and R. B. Heiligmann (ed), North American maple syrup producers manual, The Ohio State University.
18. **Hood, S. K., and E. A. Zottola.** 1995. Biofilms in food processing. *Food Control.* **6**:9–18.
 19. **King, W. and M. F. Morselli.** 1985. Bacterial adhesion to plastic tubing walls. *Maple syrup digest* **25**:28–31.
 20. **King, W. and M. F. Morselli.** 1983. Microorganisms on plastic tubing walls. *Maple syrup digest* **23**:23–28.
 21. **Kumar, C. G. and S. K. Anand.** 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **42**:9–27.
 22. **Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett.** 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**:331–371.
 23. **Lagacé, L., M. Pitre, M. Jacques, and D. Roy.** 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2052–2060.
 24. **Lagacé, L., C. Girouard, J. Dumont, J. Fortin, and D. Roy.** 2002. Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence. *J. Food Sci.* **67**:1851–1854.
 25. **Mittelman, M. W.** 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy Sci.* **81**:2760–2764.

26. **Morselli, M. F., and M. L. Whalen.** 1996. Maple chemistry and quality, p.162–171. *In* M. R. Koelling and R. B. Heiligmann (ed), North American maple syrup producers manual, The Ohio State University.
27. **Morselli, M. F., and M. L. Whalen.** 1991. Aseptic tapping of sugar maple (*Acer saccharum*) results in light color grade syrup. *Can. J. For. Res.* **21**:999–1005.
28. **Naghski, J., L. L. Reed, and C. O. Willits.** 1957. Maple sirup. X. Effect of controlled fermentation of maple sap on the color and flavor of maple sirup. *Food Res.* **22**:176-181.
29. **Naghski, J., and C.O. Willits.** 1957. Maple sirup XI. Relationship between the type and origin of reducing sugars in sap and the color and flavor of maple sirup. *Food Res.* **22**:567–571.
30. **O’Toole, G., H. B. Kaplan, and R. Kolter.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49–79.
31. **Ramey, B. E., M. Koutsoudis, S. B. von Bodman, and C. Fuqua.** 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:602–609.
32. **Roy, D., S. Sirois, and D. Vincent.** 2001. Molecular discrimination of Lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Curr. Microbiol.* **42**:282–289.
33. **Sheneman, J. M., and R. N. Costilow.** 1958. Identification of microorganisms from maple tree tapholes. *Food Res.* **24**:146–151.

34. **Sheneman, J. M., R. N. Costilow, P. W. Robbins, and J. E. Douglas.** 1958. Correlation between microbial populations and sap yields from maple trees. *Food Res.* **24**:152–159.
35. **Sipple, L., J. C. Kissinger, and C. O. Willits.** 1970. A survey of microbial contamination of maple sap in field collection systems. ARS 73–68. Agricultural Research Service. U. S. Department of Agriculture, Philadelphia Pennsylvania.
36. **Sláviková, E., and R. Vadkertiová.** 2000. The occurrence of yeasts in the forest soils. *J. Basic. Microbiol.* **40**:182–187.
37. **Tominaga, T.** 2004. Rapid identification of pickle yeasts by fluorescent PCR and microtemperature-gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**:43–48.
38. **Toutain, C. M., N. C. Caiazza, and G. A. O'Toole.** 2004. Molecular basis of biofilm development by Pseudomonads, p. 43–63. *In* M. Ghannoum and G. A O'Toole (eds), *Microbial Biofilms*, ASM Press, Washington, DC.

ANNEXE III

Évaluation en laboratoire à l'aide d'une méthode en micro-plaques de 96 puits, du potentiel de formation d'un biofilm d'une série de souches bactériennes isolées du système de récolte de la sève d'érable

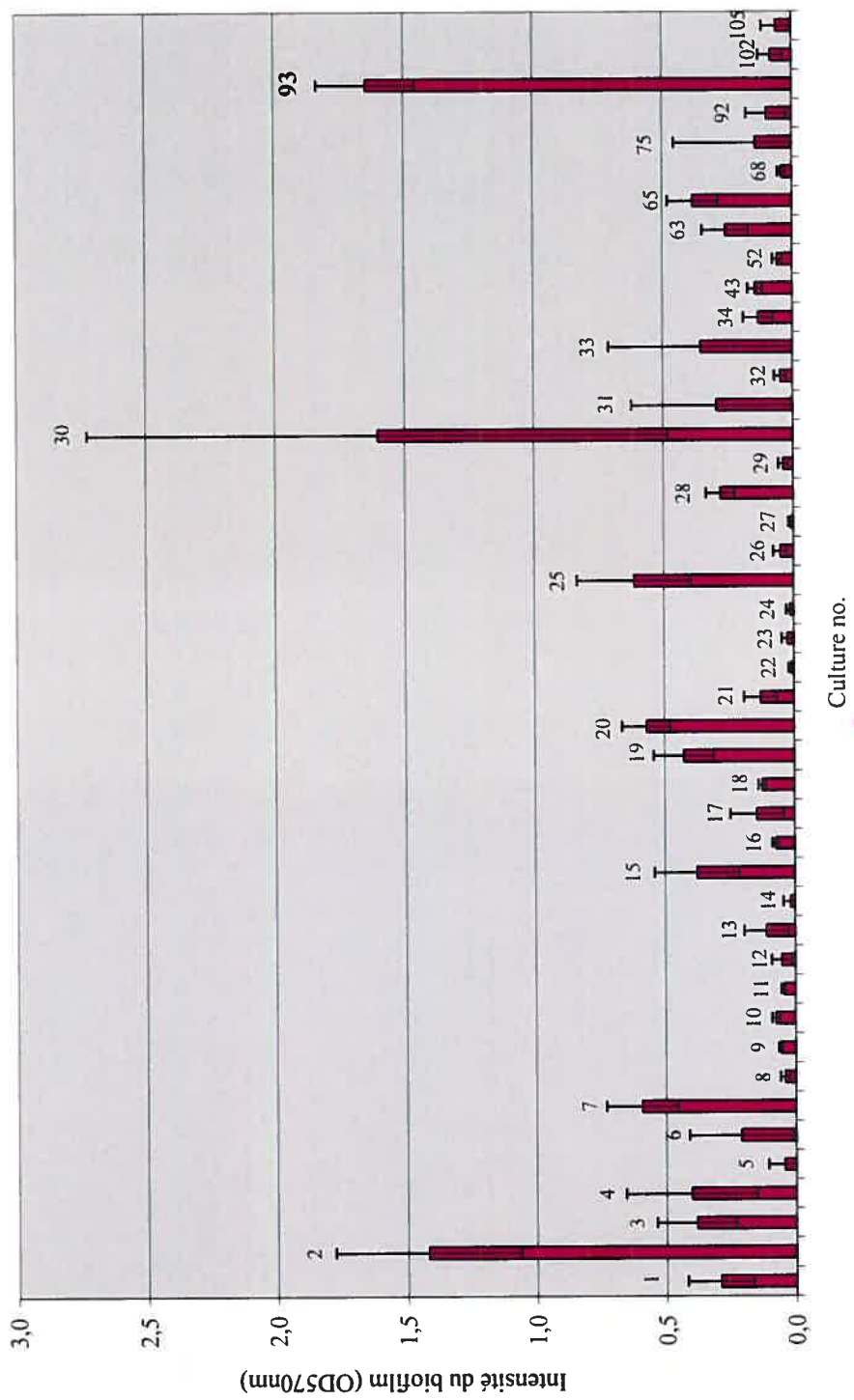


Figure 1. – Résultats de criblage (n = 5) d’une série de souches bactériennes isolées du système de récolte de la sève d’érable. Les souches ont été évaluées selon leur potentiel de formation d’un biofilm en laboratoire dans la sève d’érable à l’aide de la méthode de Pitts et al (2003). Cette méthode consiste à faire croître des biofilms pendant 24 h. à température pièce au fond des puits d’une micro-plaque à 96 puits et à révéler la présence du biofilm par une coloration au cristal violet. L’intensité du biofilm formé est alors mesurée au spectrophotomètre à 570 nm. Suite à ce criblage, la souche no. 93 correspondant à *Pseudomonas marginalis* PTB2093 a été sélectionnée puisqu’elle permettait de produire un biofilm avec une intensité élevée. Cette souche a été utilisée au chapitre III pour évaluer l’efficacité d’agents biocides.

Tableau 1. – Liste descriptive des cultures présentées à la Figure 1 de l’annexe III

No. culture	Description	No. culture	Description
1	<i>Pedobacter cryoconitis</i> MSB2122	23	<i>Frigobacterium</i> sp. MSB2127
2	<i>Pedobacter cryoconitis</i> MSB2094	24	<i>Arthrobacter rhombi</i> MSB2040
3	<i>Pedobacter</i> sp. MSB3023	25	<i>Micrococcus luteus</i> MSB3029
4	<i>Chryseobacterium</i> sp. MSB3020	26	<i>Microbacterium</i> sp. MSB2098
5	<i>Flavobacterium indoltheticum</i> MSB2060	27	<i>Sanguibacter suarezi</i> MSB2114
6	<i>Paenibacillus borealis</i> MSB3005	28	<i>Cellulomonas flavigena</i> MSB3037
7	<i>Ralstonia</i> sp. MSB2010	29	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> MSB3004
8	<i>Bacillus cereus</i> MSB2054	30	<i>Brevibacterium casei</i> MSB2033
9	<i>Staphylococcus warneri</i> MSB2016	31	<i>Rothia dentocariosa</i> MSB3008
10	<i>Staphylococcus epidermis</i> MSB2005	32	<i>Rhodococcus erythropolis</i> MSB3003
11	<i>Staphylococcus</i> sp. MSB2024	33	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PTB2016
12	<i>Brenneria alni</i> MSB2146	34	<i>Pseudomonas marginalis</i> PTB2033
13	<i>Pseudomonas graminis</i> MSB2084	43	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i> PTB2043
14	<i>Pseudomonas fulgida</i> MSB2111	52	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PTB2052

15	<i>Pseudomonas syringae</i> MSB2037	63	<i>Stenotrophomonas maltophila</i> PTB2063
16	<i>Pseudomonas sp.</i> MSB2097	65	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PTB2065
17	<i>Pseudomonas sp.</i> MSB2082	68	<i>Pseudomonas synxantha</i> PTB2068
18	<i>Pseudomonas sp.</i> MSB2046	75	<i>Pseudomonas marginalis</i> PTB2075
19	<i>Pseudomonas sp.</i> MSB2138	92	<i>Enterobacter amnigenus</i> PTB2092
20	Uncultured γ proteobacteria MSB3007	93	<i>Pseudomonas marginalis</i> PTB2093
21	<i>Plantibacter flavus</i> MSB2139	102	<i>Citrobacter freundii</i> PTB2102
22	<i>Agreia sp.</i> MSB3012	105	<i>Rhanella aquatilis</i> PTB2105

October 10, 2005

Dear Dr. Lagacé,

Per your request, with this letter I grant you permission to reproduce the manuscript as you outlined below:

to include an article in your thesis. The article is entitled: Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence, and was published in JFS in 2002 (vol. 67, 1851-1854).

You may include this paper as part of your PhD. Thesis.

Sincerely,

Carole R. Hirth
Manager, Manuscript Submission & Review
JFS/JFSE/CRFSFS
IFT Annual Meeting + Food Expo
June 24-28, 2006 - Orlando
Save the Date!

“ . . . the authoritative voice of food science and technology.”

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant		Option
Luc Lagacé		
Sigle du programme	Titre du programme	Option
Ph.D.	Sciences vétérinaires	

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs	
Lagacé, L., M. Pitre, M. Jacques, and D. Roy	
Titre	
Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing	
Revue	Date de publication
Applied and Environmental Microbiology	2004
Auteurs	
Titre	
Revue	Date de publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que Luc Lagacé inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre <i>Étude de la communauté bactérienne et de la formation du biofilm à l'intérieur du système de collecte de la sève d'érable.</i>		
Coauteur		Date
Luc Lagacé		05-08-24
Coauteur		Date
Mélanie Pitre		05-08-24
Coauteur		Date
Mario Jacques		16 sept 2005
Coauteur		Date
Denis Roy		2005-12-02
Coauteur		Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

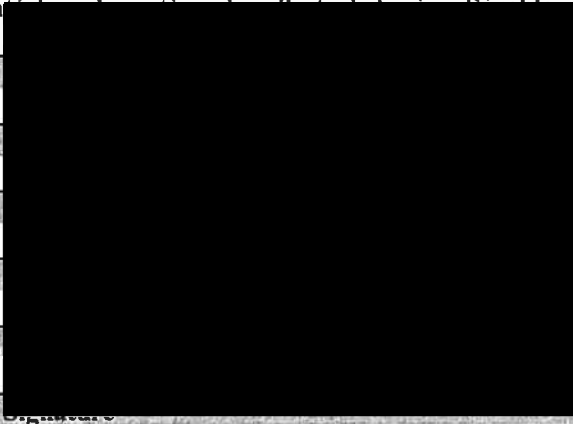
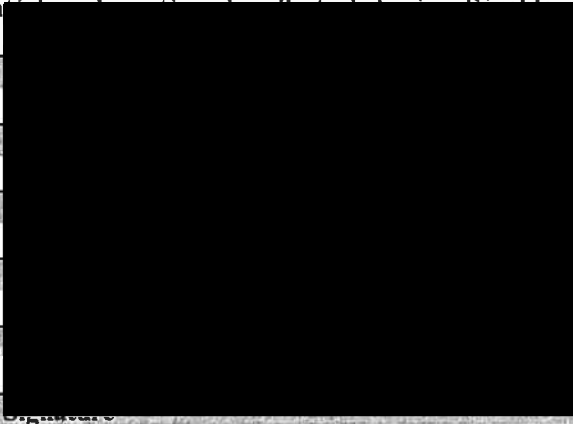
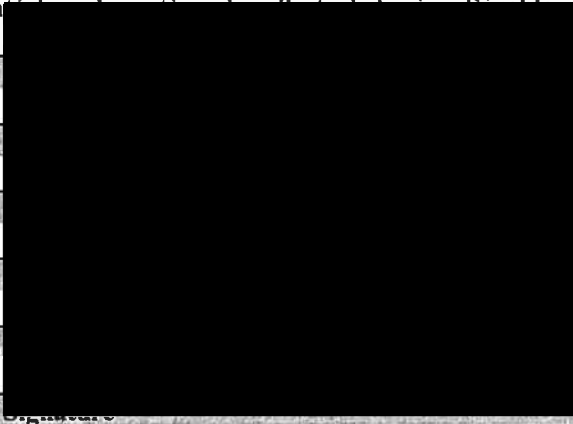
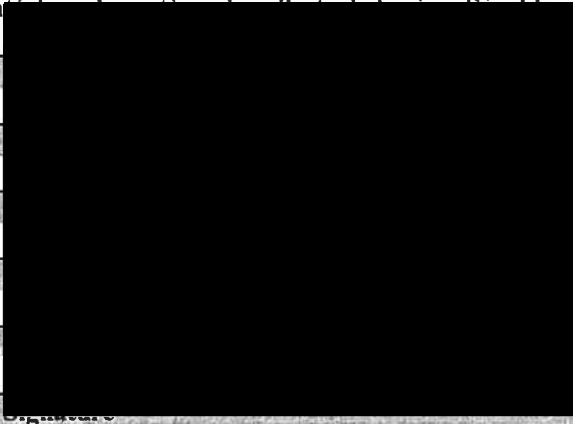
IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant		
Luc Lagacé		
Sigle du programme	Titre du programme	Option
Ph.D.	Sciences vétérinaires	Microbiologie

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs	
L. Lagacé, M. Jacques, M .A. Assanta, D. Roy	
Titre	
Microbial community composition of maple sap and collection system biofilm evaluated by scanning electron microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis	
Revue	Date de publication
International Journal of Food Microbiology	Accepté
Auteurs	
L. Lagacé, M. Jacques, M .A. Assanta, D. Roy	
Titre	
Biocides sensitivity of planktonic and adhered <i>Pseudomonas</i> isolated from maple sap collection system	
Revue	Date de publication
Journal of Food Protection	En préparation

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<p><i>À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que (Luc Lagacé) inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Étude de la communauté bactérienne et de la formation du biofilm à l'intérieur de systèmes de collecte de sève de érable.</i></p>		
Coauteur	Signature	Date
Luc Lagacé		05-10-06
Coauteur	Signature	Date
Mario Jacques		13.10.05
Coauteur	Signature	Date
M. A. Assanta		26-10-05
Coauteur	Signature	Date
Denis Roy		12.12.02
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Luc Lagacé		
Sigle du programme Ph.D.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs Lagacé, L., C. Girouard, J. Dumont, J. Fortin, D. Roy	
Titre Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence	
Revue Journal of Food Science	Date de publication 2002
Auteurs	
Titre	
Revue	Date de publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que Luc Lagacé inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Étude de la communauté bactérienne et de la formation du biofilm à l'intérieur du système de collecte de la sève d'érable</i>		
Coauteur Luc Lagacé		Date 05-10-06
Coauteur Carolle Girouard		Date
Coauteur Johanne Dumont		Date 05-10-17
Coauteur Jacinthe Fortin		Date 05-10-07
Coauteur Denis Roy		Date 02-12-05
Coauteur		Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant		
Luc Lagacé		
Sigle du programme	Titre du programme	Option
Ph.D.	Sciences vétérinaires	Microbiologie

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs	
Lagacé, L., C. Girouard, J. Dumont, J. Fortin, D. Roy	
Titre	
Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence	
Revue	Date de publication
Journal of Food Science	2002
Auteurs	
Titre	
Revue	Date de publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que Luc Lagacé inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Étude de la communauté bactérienne et de la formation du biofilm à l'intérieur du système de collecte de la sève d'érable		
Coauteur		
Luc Lagacé		
Coauteur		
Carolle Girouard		
Coauteur		
Johanne Dumont		
Coauteur		
Jacinthe Fortin		
Coauteur	Signature	Date
Denis Roy		
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Luc Lagacé		
Sigle du programme Ph.D.	Titre du programme Sciences vétérinaires	
		Option Microbiologie

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs Lagacé, L., M. Pitre, M. Jacques, A. A. Mafu, and D. Roy	
Titre Microbiology of maple sap and biofilm formation in maple sap collection systems	
Revue Tree Sap III. Proceedings of the 3rd International Symposium on Sap Utilization. 3rd edition. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan.	Date de publication 2005
Auteurs	
Titre	
Revue	
	Date de publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration
À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que Luc Lagacé inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a trait de la communauté bactérienne et de la formation du biofilm à l'intérieur de la communauté

Coauteur Luc Lagacé	Date 05-10-28
Coauteur Mario Jacques	Date 13 déc 2005
Coauteur Mélanie Pitre	Date 05-10-28
Coauteur Akier Assanta Mafu	Date 08-12-05
Coauteur Denis Roy	Date 10-12-07
Coauteur	Date
Coauteur	Date

exe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

09 PERMISSION OF JOURNAL EDITOR¹

Revised

STUDENT IDENTIFICATION

Student's name	[Redacted]	Degree
Luc Lagacé		Ph.D.
University	Faculty	Dept
University of Montreal	Veterinary medicine	Pathology and microbiology

DESCRIPTION OF ARTICLE

PERMISSION GRANTED
 CONTINGENT ON AUTHOR PERMISSION (which you must obtain)
 AND APPROPRIATE CREDIT
 American Society for Microbiology

Authors	[Redacted]	ment
Luc Lagacé		Date 9-20-05
Mélanie Pitre		
Mario Jacques		
Denis Roy		
Title	Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing	
Name and volume of journal	Pages	Date
Applied and Environmental Microbiology 70	2052 - 2060	2004

IDENTIFICATION OF JOURNAL

Complete name of journal	Applied and Environmental Microbiology
Address	Date
American Society for Microbiology 1752 N Street, N.W. Washington, DC 20036-2904	Jan. 14 th 2004

DECLARATION OF EDITOR

Complete name of editor	[Redacted]	
Declaration	As staff editor of Applied and Environmental Microbiology, I authorize the microfilming of the thesis and consent that Luc Lagacé includes this article in his thesis dissertation entitled Étude de la communauté bactérienne et de la formation du biofilm à l'intérieur du système de collecte de la sève d'érable	
Editor	Signature	Date
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

Student	Date
LUC LAGACE	05-09-20

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat

PERMISSION OF BOOK EDITOR¹

STUDENT IDENTIFICATION

Student's name Luc Lagacé		Degree Ph.D.
University University of Montreal	Faculty Veterinary medicine	Dept Pathology and microbiology

DESCRIPTION OF ARTICLE OR CHAPTER

Authors Luc Lagacé Mario Jacques Mélanie Pitre Akier Assanta Mafu Denis Roy	
Title Microbiology of maple sap and biofilm formation in maple sap collection systems	
	Date 2005

IDENTIFICATION

Complete Title of book and edition Tree Sap III : Proceedings of the 3 rd international symposium on sap utilization (ISSU). 3 rd edition. Bifuka, Hokkaido, Japan.	
Address Hokkaido University Press, Sapporo, Japan	Date April 2005

DECLARATION OF EDITOR

Complete name of editor Dr. Minoru Terazawa	
Declaration <i>As staff editor of Applied and Environmental Microbiology, I authorize the microfilming of the thesis and consent that Luc Lagacé includes this article in his thesis dissertation entitled</i> Étude de la communauté bactérienne et de la formation du biofilm à l'intérieur du système de collecte de la sève d'érable	
Editor Minoru Terazawa	Date Oct. 30, 2005

Student Luc Lagacé	Signature	Date
------------------------------	------------------	-------------

