



Centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole inc.

Siège social et station expérimentale
142, rang Lainesse
Saint-Norbert d'Arthabaska, QC
G0P 1B0
Tél. 819 369-4000
Fax. 819 369-9589

RAPPORT FINAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE D'INOCULATION MICROBIENNE DU SYSTÈME DE COLLECTE DE LA SÈVE EN ÉRABLIÈRE VISANT LA STABILITÉ DE LA QUALITÉ ET DES PROPRIÉTÉS DU SIROP D'ÉRABLE

Luc Lagacé, Ph.D.

Ce projet a été réalisé grâce au support financier de la Fédération des producteurs acéricoles du Québec et à une aide financière du programme Innov'action issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir 2 conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec et Agriculture et Agroalimentaire Canada

RÉSUMÉ

Ce projet avait pour but d'étudier des traitements d'inoculation du système de collecte de la sève d'érable par des bactéries isolées de cet écosystème. Les résultats ont permis de démontrer que certaines souches bactériennes se sont implantées suite à leur inoculation et que les principales caractéristiques physico-chimiques et sensorielles de la sève et du sirop ont été préservées voire même rehaussées. C'est le cas notamment de la souche B1 (*Pseudomonas* sp. 201-1B) qui semble s'être intégrée de façon privilégiée dans la tubulure servant à la collecte de la sève suite à son inoculation. Suite à son implantation, cette souche n'a pas occasionné de dégradation des paramètres physico-chimiques et sensoriels de la sève et du sirop. Ainsi, la souche B1 n'a eu dans la plupart des cas, aucun effet défavorable sur les propriétés de ces produits (pH, sucres invertis, couleur) et n'a pas eu d'effet néfaste sur le volume de sève récoltée. La saveur des sirops obtenus suite à l'inoculation de cette souche a même parfois été jugée supérieure à celle des sirops des autres traitements et contrôles. La souche B2 (*Janthinobacterium lividum* 100-P12-9) a aussi montré un potentiel intéressant toutefois dans une moindre mesure que la souche B1. Ces résultats serviront de base à des travaux d'optimisation et de validation à plus grande échelle et dans diverses conditions de récolte avant que ce traitement soit proposé comme moyen de contrôle de la qualité associée à la variabilité du microbiote de la sève d'érable.

ABSTRACT

This project aimed to study inoculation treatments of the maple sap collection system by bacteria isolated from this ecosystem. The results demonstrated that certain bacterial strains were implanted following their inoculation and that the main physicochemical and sensory characteristics of sap and syrup were preserved or even enhanced. This is particularly true of the B1 strain (*Pseudomonas* sp 201-1B), which seems to have integrated favorably into the tubing used to collect sap following its inoculation. Following its implantation, this strain did not cause degradation of the physicochemical and sensory parameters of sap and syrup. Thus, in most cases, the B1 strain had no adverse effect on the properties of these products (pH, invert sugars, color) and had no adverse effect on the volume of sap collected. The flavor of the syrups obtained after the inoculation of this strain has even sometimes been judged to be superior to that of the syrups of the other treatments and controls. Strain B2 (*Janthinobacterium lividum* 100-P12-9) has also shown an interesting potential, however to a lesser extent than strain B1. These results will serve as a basis for optimization and validation work on a larger scale and in different harvest conditions before this treatment is proposed as a means of quality control associated with the variability of the microbiota of maple sap.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT	4
TABLE DES MATIÈRES	5
INTRODUCTION	6
MÉTHODOLOGIE	8
Description des souches sélectionnées	8
Dispositif de collecte de la sève d'érable	8
Traitements, échantillonnage de la sève et fabrication de sirop	9
Analyse de la sève et du sirop	10
Analyse du microbiote de la sève	11
RÉSULTATS ET DISCUSSION	13
Effet de l'inoculation sur le volume de coulée de la sève	13
Profil microbiologique et phylogénétique du microbiote de la sève	14
Caractéristiques physico-chimiques de la sève et du sirop	20
Caractéristiques sensorielles du sirop	24
CONCLUSION	26
REMERCIEMENTS	26
BIBLIOGRAPHIE	27

INTRODUCTION

La contamination microbienne excessive de la sève d'érable est connue depuis longtemps pour ses effets néfastes sur la qualité du sirop (Edson et al., 1912, Naghski and Willits, 1955). Les plus communs de ces effets sont le développement excessif de la couleur, du goût de caramel intense ou d'autres saveurs indésirables et affectent donc les principales caractéristiques commerciales du sirop. Le principal rôle joué par les micro-organismes de la sève sur ces effets est de favoriser l'hydrolyse du saccharose et l'accumulation de glucose et fructose dans la sève, ce qui va contribuer à l'intensification de la couleur et des goûts intenses de caramel du sirop (Hayward et Pederson, 1946, Morselli et Whalen, 1991, Lagacé et al., 2002). Parmi les micro-organismes impliqués, les levures semblent plus majoritairement associées à l'hydrolyse du saccharose et à ses conséquences indésirables (Naghski et al., 1957). D'ailleurs, une grande variété de bactéries, levures et moisissures colonisant la sève d'érable ont été répertoriées dans le passé (Sheneman et Costilow, 1959). Nos plus récents travaux à ce sujet ont permis de mettre à jour un portrait exhaustif de la microflore de la sève à l'aide de techniques biomoléculaires sur une gamme importante d'échantillons de différentes provenances (Lagacé et al., 2004, 2006; Filteau et al., 2010, 2012). Ces travaux ont également permis d'observer et de caractériser la formation du biofilm à l'intérieur du système de collecte de la sève et d'observer la dominance de certaines espèces bactériennes dont les *Pseudomonas* (Lagacé et al., 2006). De plus, certaines espèces dominantes de la sève ont été associées selon nos travaux, à des caractéristiques sensorielles favorables du sirop correspondant, telles que la saveur typique d'érable sans pour autant favoriser la présence de défauts de saveur. Ce serait le cas notamment de bactéries des genres *Pseudomonas* et *Janthinobacterium* et d'une levure du genre *Mrakia* (Filteau et al., 2012). Willits et al. (1957) avaient également montré dans leur étude, la capacité de certaines souches dont *Pseudomonas geniculata* à rehausser la saveur typique d'érable du sirop en inoculant préalablement la sève avec cette bactérie suivi d'une étape de maturation à basse température. Ces résultats avaient été obtenus en inoculant une sève fraîche de début de saison faiblement contaminée et récoltée avec une technique d'entaille et de récolte aseptique spéciale permettant de prévenir sa contamination. L'obtention d'une telle sève est laborieuse et ne peut être envisagée dans un contexte de production.

Or, de nos jours, la sève récoltée pour la production commerciale est obtenue à l'aide d'un système de récolte par tubulure de plastique et arrive au réservoir avec une flore microbienne

naturelle pouvant atteindre plus de 107 ufc/ml (Lagacé et al., 2002, 2004). La présence naturelle de cette flore microbienne dans la sève à son arrivée au réservoir implique qu'il y a eu colonisation du réseau de tubulure et croissance de ces microorganismes dans le système préalablement à sa récolte et que cette croissance peut déjà induire des changements dans la composition chimique de la sève et influencer les caractéristiques sensorielles subséquentes du sirop en fonction des microorganismes qui s'y sont développés. Les effets des microorganismes sur la composition chimique de la sève et les propriétés du sirop peuvent donc déjà s'opérer à l'intérieur même du réseau de tubulure avant son arrivée au réservoir. Dans ce contexte, l'utilisation d'un procédé d'inoculation et de maturation de la sève avec une bactérie pourrait s'avérer peu efficace à corriger des changements sur la composition de la sève ayant eu lieu en amont durant sa collecte. D'ailleurs, des travaux antérieurs nous ont permis de constater que la maturation de la sève à basse température à l'aide de sa propre microflore naturelle entraînait bien souvent un déséquilibre dans les populations microbiennes laissant la place à certaines espèces défavorables. Des bactéries telles que *Leuconostoc* et *Lactobacillus* dominaient les bactéries du genre *Pseudomonas* suite à la maturation et entraînaient une acidification de la sève et la production de sirops avec une texture filante non commercialisables (Lagacé et al., 2013). Il existe donc un équilibre naturel dans la composition de la microflore de la sève d'érable où les bactéries sont dominantes sur les levures et moisissures et parmi ces bactéries, celles du genre *Pseudomonas* (Gamma proteobacteria) dominent au profit des autres genres tels que *Leuconostoc* et *Lactobacillus* (lactobacilli). Le maintien de cet équilibre serait donc à favoriser afin de préserver et à la limite rehausser les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles typiques du sirop d'érable. La dégradation des caractéristiques typiques du sirop qui est associée à la croissance microbienne survient d'ailleurs dans la plupart des cas dans la 2ème moitié de la saison où les levures sont en plus grand nombre et où l'élévation de la température extérieure a pu favoriser la croissance d'espèces bactériennes indésirables.

On en déduit donc qu'il serait souhaitable d'appliquer des mesures de contrôle de l'équilibre de la microflore à l'étape de la récolte de la sève, soit dans le système de collecte par tubulure. Dans ce contexte, les bactéries telles que *Pseudomonas* ont montré par le passé leur capacité à former un biofilm à la surface de différents matériaux dont le système de collecte de la sève (Lagacé et al., 2006), ce qui laisse présager de la faisabilité d'implanter une telle bactérie ou une autre d'espèce voisine dans le réseau de tubulure. Certaines souches de *Pseudomonas* sont également utilisées comme agent de biocontrôle (Stockwell et Stack, 2007) et sont présentes dans l'environnement naturel forestier où elles ont un rôle à jouer au niveau de la mycorhize (Brûlé et al., 2001). Les bactéries du genre *Pseudomonas* font donc partie de

l'écosystème de l'érablière et pourrait être utilisées comme agent de biocontrôle de l'équilibre microbien de la sève d'érable. Ce rapport présente les résultats obtenus de tests d'inoculation de 3 souches bactériennes isolées de la sève d'érable sur la composition et les propriétés physico-chimiques et sensorielles de la sève et du sirop d'érable et sur l'équilibre du microbiote de la sève d'érable.

MÉTHODOLOGIE

DESCRIPTION DES SOUCHES SÉLECTIONNÉES

Une sélection de souches bactériennes isolées de la sève d'érable a été réalisée en procédant à divers tests biochimiques et de croissance afin d'identifier les souches ayant le meilleur potentiel pour l'inoculation en érablière. Les résultats sur la sélection des souches ont été présentés dans le rapport d'étape du projet. En résumé, les souches sélectionnées avaient une bonne croissance dans la sève à basse température, ne dégradait pas les sucres et n'abaissaient pas significativement le pH de la sève tout en ne produisant pas de texture filante et ne détériorant pas le goût du sirop. Suite à ces travaux, 2 souches de la banque de souches du Centre ACER isolées de la sève d'érable ont été sélectionnées pour les essais d'inoculation en érablière. Il s'agit des souches **B1** et **B2** correspondant respectivement à *Pseudomonas sp. (201-1B)* et à *Janthinobacterium lividum (100-P12-9)*, cette dernière ayant été obtenue en collaboration avec l'université Laval. De plus, une souche provenant de l'ATCC a aussi été sélectionnée, la souche **B3** correspondant à *Pseudomonas geniculata ATCC 17926*. Cette dernière a été déposée à l'ATCC par Willits qui a isolée cette souche de la sève d'érable et qui a suggéré que cette souche pouvait rehausser la saveur caractéristique d'érable du sirop (Willits et al. 1957).

Ces souches ont été cultivées en laboratoire et transférées dans la sève d'érable (8°Brix) stérilisée afin de produire des cultures concentrées servant à l'inoculation des systèmes de collecte de la sève par tubulure en érablière. Ces cultures concentrées ont été préparées dans des seringues stériles de 30 ml à usage unique pour faciliter l'inoculation en érablière. Ces seringues ont été préparées à l'avance et congelées jusqu'au moment de leur utilisation.

DISPOSITIF DE COLLECTE DE LA SÈVE D'ÉRABLE

Afin d'évaluer l'impact de l'inoculation des souches sélectionnées, des systèmes de collecte par tubulure ont été installés à l'érablière expérimentale du Centre ACER. Ces systèmes ont été installés dans une même section homogène de l'érablière ou les arbres de 2 blocs

expérimentaux ont été répartis aléatoirement pour chacun des systèmes afin qu'ils soient les plus homogènes possible en termes de diamètre à hauteur de poitrine ($p < 0.05$) et d'apparence. Un même nombre d'arbres (40) a été utilisé pour chaque système. Les systèmes étaient neufs en 2016 et tous identiques (même fournisseur et lot, même longueur et disposition, même pente et exposition, etc.). De plus, les systèmes étaient opérés de façon identiques soient en ayant la même source de vide (une même pompe à vide pour tous les systèmes) et la même rigueur quant à la vérification et la correction des fuites. L'entaillage des arbres a été fait selon les normes de l'industrie, de manière identique pour tous les systèmes et au même moment de la saison (étalé sur 2 jours).

TRAITEMENTS, ÉCHANTILLONNAGE DE LA SÈVE ET FABRICATION DE SIROP

Les souches sélectionnées ont été utilisées pour inoculer les systèmes en érablière. Pour chacune des 3 souches, 2 systèmes indépendants ont été inoculés à raison d'un système par bloc expérimental. Pour chacun des 2 blocs expérimentaux, il y avait donc un système inoculé avec chacune des 3 souches sélectionnées en plus d'un système contrôle sans inoculation pour un total de 4 systèmes par bloc (Tableau 1).

Tableau 1. Description de la répartition des traitements d'inoculation en érablières

	Bloc 1				Bloc 2			
Système	C1	C2	C3	C-contrôle	D1	D2	D3	D-Contrôle
Souche	B1	B2	B3	–	B1	B2	B3	–
Nb d'arbre	40	40	40	40	40	40	40	40

Lors de l'inoculation, 20 ml du contenu de la seringue décongelée contenant l'inoculum était injecté dans le chalumeau maintenu à la verticale au-dessus de la ligne de tubulure latérale au moment de l'entaillage, soit environ 2 semaines avant l'apparition de la 1^{ère} coulée. Une fois l'inoculation effectuée, le chalumeau était inséré dans l'entaille selon la procédure standard. Suite à l'inoculation et l'entaillage des systèmes, le vide a été appliqué avec une consigne à 27 po-Hg à la pompe et un suivi régulier des fuites afin d'assurer une étanchéité optimale de chacun des systèmes. Durant la saison, la mesure quotidienne du volume de coulée de sève de chacun des systèmes a été effectuée à l'aide de compteurs calibrés. Les traitements d'inoculation ont été effectués en 2016 sur les systèmes neufs et répétés en 2017 sur les mêmes systèmes ayant été préalablement assainis à l'alcool isopropylique selon la méthode en vigueur de l'industrie (St-Pierre et al, 2014).

L'échantillonnage a été fait en 2016 et 2017 aux mêmes périodes pour tous les systèmes soit à 2 fréquences (jour de coulée) en début de saison (D1 et D2), à une fréquence en milieu de saison (Mu) et à 2 fréquences en fin de saison (F1 et F2) pour un total de 5 fréquences par saison. À chacune des fréquences, un échantillon de sève par système a été prélevé pour analyses ainsi qu'un volume nécessaire (150 L) à la fabrication d'un sirop d'érable correspondant à l'aide de l'évaporateur pilote. Le volume de sève prélevé pour la fabrication du sirop pilote (1 bloc seulement) était d'abord concentré à l'aide d'un système de concentration membranaire pour amener la concentration en solides solubles de la sève à une valeur identique de 12°Brix pour toutes les sèves de chacun des systèmes et selon la même méthode. Chacun des concentrés de sève a alors été congelé jusqu'au moment de la fabrication du sirop. Lors de la fabrication du sirop, le concentré de sève était décongelé de manière standardisée pour tous les concentrés dans un système de décongélation par recirculation d'eau pour ensuite alimenter en continu l'évaporateur pilote pour la production du sirop d'érable selon les mêmes paramètres de fabrication standard. Les échantillons de sève et de sirop correspondants ont ensuite été soumis à divers analyses physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles.

ANALYSE DE LA SÈVE ET DU SIROP

Les échantillons de sève et de sirop d'érable ont été analysés pour divers paramètres tels que le pH, le Brix, la conductivité électrique, la composition en sucres et acides organiques (Lagacé et al, 2015). De plus, les comptes de bactéries totales et de levures et moisissures ont été effectués sur les échantillons de sève tandis que le % de transmission de la lumière à 560 nm (couleur) et l'analyse sensorielle ont été spécifiquement effectués sur les échantillons de sirop. Pour l'analyse sensorielle, celle-ci a été effectuée dans un 1er temps par la division Acer Inspection afin de vérifier si le sirop comportait un défaut de saveur en utilisant la procédure standard de l'industrie. Dans un 2ème temps, les échantillons de sirop ont été soumis à un panel sensoriel de 20 juges en utilisant un test de comparaison à un témoin. Il s'agit d'une méthode de différenciation dans laquelle on présente simultanément un témoin identifié et plusieurs échantillons à chaque juge. Le juge est prié d'évaluer la magnitude de la différence entre les échantillons codés et le témoin. Les attributs de la flaveur d'érable, flaveur globale (appréciation positive globale) et flaveur étrangère, sont évalués à l'aide d'une échelle catégorique à 9 niveaux (très léger à élevé) avec la possibilité d'être identique au témoin. Un plan expérimental de type carré latin a été utilisé pour chacun des tests en combinaison avec le logiciel BIOSYSTÈMES FIZZ (version 2.4A) pour l'analyse statistique des résultats ($\alpha = 0.05$).

ANALYSE DU MICROBIOTE DE LA SÈVE

En plus des analyses physico-chimiques et microbiologiques, les profils phylogénétiques du microbiote des échantillons de sève ont été analysés (1 bloc aux périodes D1, Mu et F2 seulement). Cette analyse a été effectuée en concentrant la biomasse par centrifugation et en extrayant l'ADN génomique à l'aide du kit PowerWater®DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Inc_CA, USA). L'amplification du gène de l'ARN 16S, la mise en pool équimolaire et le séquençage ont été réalisés par la Plateforme d'analyses génomiques (IBIS, Université Laval, Québec, Canada). En bref, l'amplification de la région V3-V4 16S a été réalisée en utilisant les régions spécifiques de la séquence décrites dans Klindworth et al. (2013) dans une approche de PCR double indexée. Les séquences d'oligonucléotides génériques suivantes ont été utilisées pour l'amplification : Bakt_341F-long AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [index1] TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG et Bakt_805R-long CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [index2] GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC. Veuillez noter que les amorces utilisées dans ce travail contiennent des séquences spécifiques d'Illumina protégées par la propriété intellectuelle (Séquences oligonucléotidiques © 2007-2013 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Les œuvres dérivées créées par les clients Illumina sont autorisées uniquement avec les instruments et produits Illumina.

La PCR a été réalisée dans un volume total de 50 µL contenant 1X de tampon Q5 (NEB), 0,25 µM de chaque amorce, 200 µM de chaque dNTPs, 1 U d'ADN polymérase haute-fidélité Q5 et 1 µL de matrice ADNc. La PCR a démarré avec une dénaturation initiale à 98 ° C pendant 30 s, suivie de 10 cycles de dénaturation à 98 ° C pendant 10 s, recuit à 55 ° C pendant 10 s, extension à 72 ° C pendant 30 s. 25 cycles supplémentaires ont été effectués en utilisant une dénaturation à 98 ° C pendant 10 secondes, une hybridation à 65 ° C pendant 10 secondes, une extension à 72 ° C pendant 30 secondes, puis une étape d'extension finale à 72 ° C pendant 2 minutes. La réaction de PCR a été purifiée en utilisant le kit de nettoyage PCR Axygen (Axygen). La qualité du produit de PCR purifié a été vérifiée sur une puce DNA7500 BioAnalyzer (Agilent) et quantifiée à l'aide du Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Les amplicons barcodés ont été regroupés en concentration équimolaire et séquencés sur Illumina Miseq (appariement de 300 bases avec deux lectures d'index) (Klindworth et al. 2013).

Les séquences obtenues ont par la suite été traitées à l'aide du logiciel Mothur (Schloss et al., 2009), version 1.38.0. L'ensemble des données a été organisé afin de ne conserver que les séquences ayant une longueur entre 400 à 470 bps, sans Ns (maxambig=0 et maxhomop=8). Les séquences conservées ont été alignées à l'aide de la base de données SYLVA. Les chimères ont été enlevées en utilisant la fonction UCHIME ainsi que les séquences classées comme provenant des Archaea, chloroplastes et mitochondria. Les séquences restantes ont été classifiées à l'aide de la base de données trainset 9_032012. Les différentes séquences de la base de données ont été regroupées en unités de classification taxonomiques opérationnelles (OTU). Le regroupement s'est fait avec un niveau de similarité de 97% (0.03), ce qui a mené à une classification en OTU0.03. Cette sélection a mené à l'établissement des OTU généralement considérés comme étant des espèces bactériennes distinctes (Schloss et Handelsman, 2005). La présentation des résultats sous forme de dendrogrammes a été réalisée par le logiciel MEGA5.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

EFFET DE L'INOCULATION SUR LE VOLUME DE COULÉE DE LA SÈVE

La contamination microbienne excessive du système de collecte de la sève a le potentiel de ralentir ou de provoquer un arrêt prématuré de la coulée en fin de saison qui pourra éventuellement entraîner des pertes de récolte. La Figure 1 montre les résultats obtenus du volume moyen de coulée des systèmes inoculés avec les souches sélectionnées et des systèmes contrôles. Selon ces résultats, les volumes de coulée de la sève obtenus des systèmes inoculés ne semblent pas avoir été significativement affectés comparativement à ceux des systèmes contrôle (non inoculé). Un volume moyen pour les systèmes inoculés avec la souche B1 semble légèrement inférieur aux autres sans toutefois sortir des écarts mesurés sur les moyennes. Des résultats similaires ont été obtenus en regardant les saisons 2016 et 2017 et les 2 blocs expérimentaux séparément. Ces résultats indiquent que l'inoculation des systèmes telle que pratiquée dans le contexte de cette étude ne semble pas avoir eu d'effet significatif sur le volume récolté de sève.

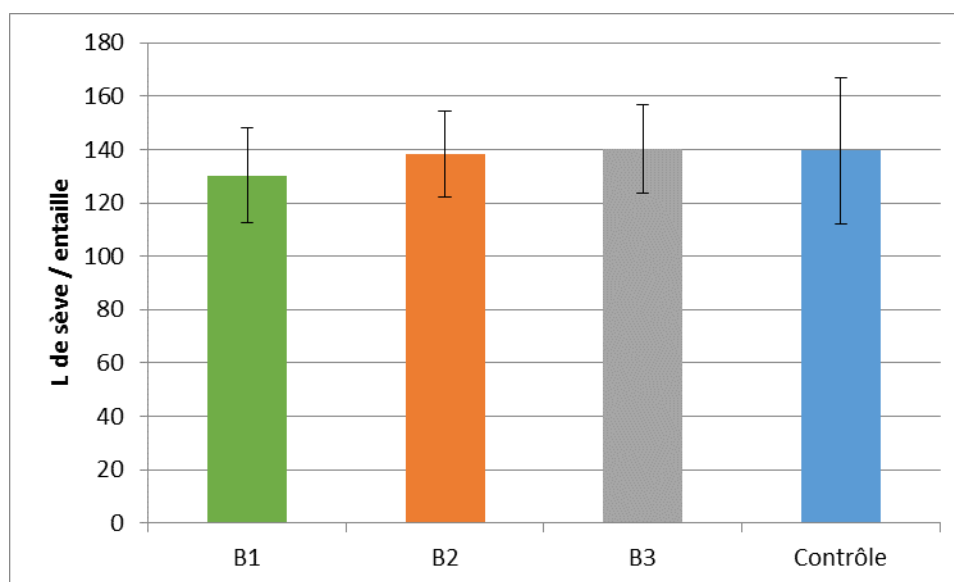


Figure 1. Volume moyen (N = 4) de sève récoltée à partir des systèmes inoculés avec les souches sélectionnées et ceux non inoculés (contrôle). Les barres sur les moyennes indiquent les écart-types.

PROFIL MICROBIOLOGIQUE ET PHYLOGÉNÉTIQUE DU MICROBIOTE DE LA SÈVE

La sève d'érable est vulnérable à la contamination par les microorganismes naturellement présents dans l'environnement immédiat de l'entaille et du système de collecte par tubulure. L'inoculation de souches spécifiques dans le système de collecte pourrait jouer un rôle bénéfique sur l'équilibre de cette microflore. La Figure 2 montre les résultats des comptes bactériens issus des traitements d'inoculation et des contrôles en fonction de l'avancement de la saison (2016 et 2017 combinées). Il est possible d'y observer une augmentation générale des comptes bactériens en fonction de l'avancement de la saison avec des comptes plus faibles en début de saison. Pour le reste, peu de différences ont été notées entre les traitements d'inoculation et les contrôles pour les comptes bactériens totaux. On note par contre une tendance pour le compte bactérien des systèmes contrôles à être légèrement plus faibles en début de saison mais tout de même à l'intérieur des écarts mesurés sur les moyennes. Les mêmes tendances ont été observées pour les saisons 2016 et 2017 et les 2 blocs expérimentaux pris séparément avec des comptes légèrement plus faibles en général en 2016 alors que les systèmes étaient neufs au départ. C'est donc dire qu'une contamination naturelle et appréciable des systèmes contrôles est survenue même si ceux-ci étaient neufs au départ et n'ont pas été inoculés.

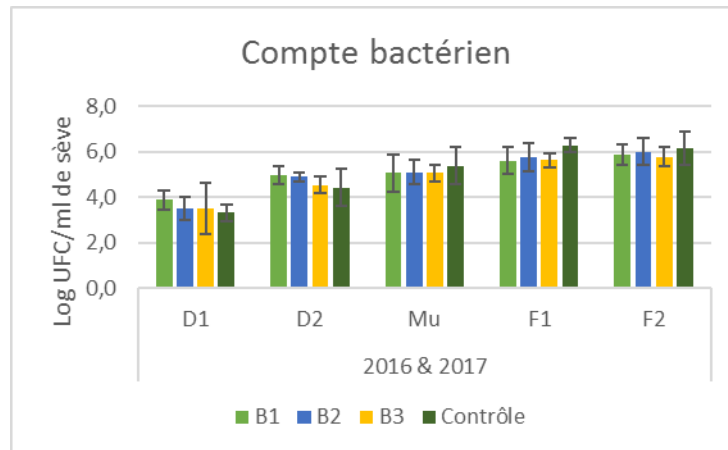


Figure 2. Compte bactérien moyen (N = 4) de la sève récoltée à 5 périodes à partir des systèmes inoculés avec les souches sélectionnées et ceux non inoculés (contrôle). Les barres sur les moyennes indiquent les écart-types.

Pour ce qui est des comptes en levures et moisissures de la sève, ceux-ci semblent suivre la même tendance saisonnière que ceux des bactéries totales (Figure 3). Les comptes de levures et moisissures par contre sont généralement inférieurs à ceux des bactéries totales. Il ne semble pas non plus y avoir de différence entre les comptes de levures et moisissures entre les traitements et les contrôles. L'inoculation ne semble donc pas avoir eu d'effet sur la croissance des levures et moisissures de la sève, celle-ci ayant une progression similaire à ce qui a déjà été rapporté (Lagacé et al, 2002; 2015).

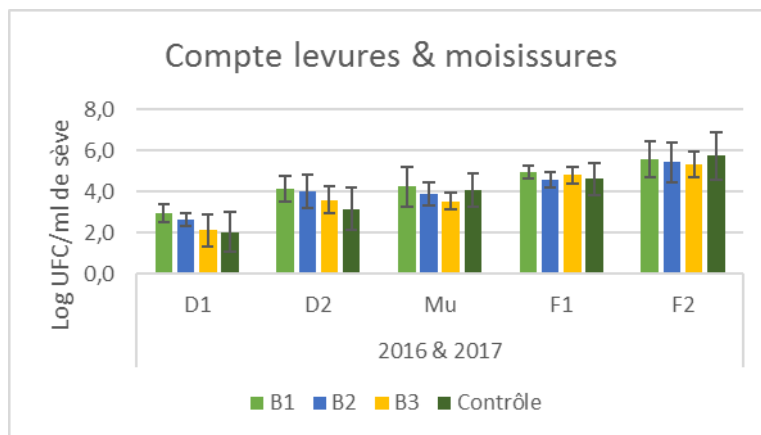


Figure 3. Compte de levures et moisissures moyen (N = 4) de la sève récoltée à 5 périodes à partir des systèmes inoculés avec les souches sélectionnées et ceux non inoculés (contrôle). Les barres sur les moyennes indiquent les écart-types.

Suite aux analyses des comptes microbiens, une analyse plus détaillée du profil phylogénétique de la sève a été réalisée. Le Tableau 2 résume les données obtenues de ces analyses. On remarque qu'en général, le nombre de séquences et d'OTU0.03 sont élevés, ce qui permet d'avoir un aperçu plus détaillé et représentatif de la composition des espèces présentes dans cet écosystème. En 2016 par contre, alors que les systèmes étaient neufs au départ, le nombre de séquences et le nombre d'OTU0.03 obtenus ont été largement plus faibles qu'en 2017.

Tableau 2. Résumé des informations générales obtenues de l'analyse phylogénétique

	2016-2017	2016	2017
Nb d'échantillons	24	12	12
Nb de séquences	29 3487	25 730	26 7757
Moyenne des séquences	12 229	2 144	22 313
Nb d'OTU_{0.03}	5 046*	581	4 605

*n'égal pas la somme des 2 saisons puisque certains OTU identiques sont retrouvés dans les 2 saisons

La Figure 4 compare quant à elle les profils phylogénétiques basées sur la présence des OTU_{0.03} des différents échantillons de sève prélevés des systèmes inoculés et contrôles. Selon cette figure, le contrôle et le traitement d'inoculation B3 de début de saison 2016 (cluster C) semblent comparables et se distinguer des traitements B1 et B2. Pour le reste de 2016, 2 groupes se distinguent soit celui du haut (cluster A) regroupant principalement les échantillons du traitement B1 et celui du milieu (cluster B) regroupant majoritairement les échantillons des traitements B2 et contrôle. Pour ce qui est de 2017, l'inoculation avec la souche B2 montre un profil clairement distinct des autres traitements et des contrôles en début de saison. Pour le reste de 2017, les échantillons se regroupent selon 2 grands clusters où les traitements B2 et B3 sont regroupés (cluster D) et où le traitement B1 et les contrôles sont majoritairement associés (cluster E).

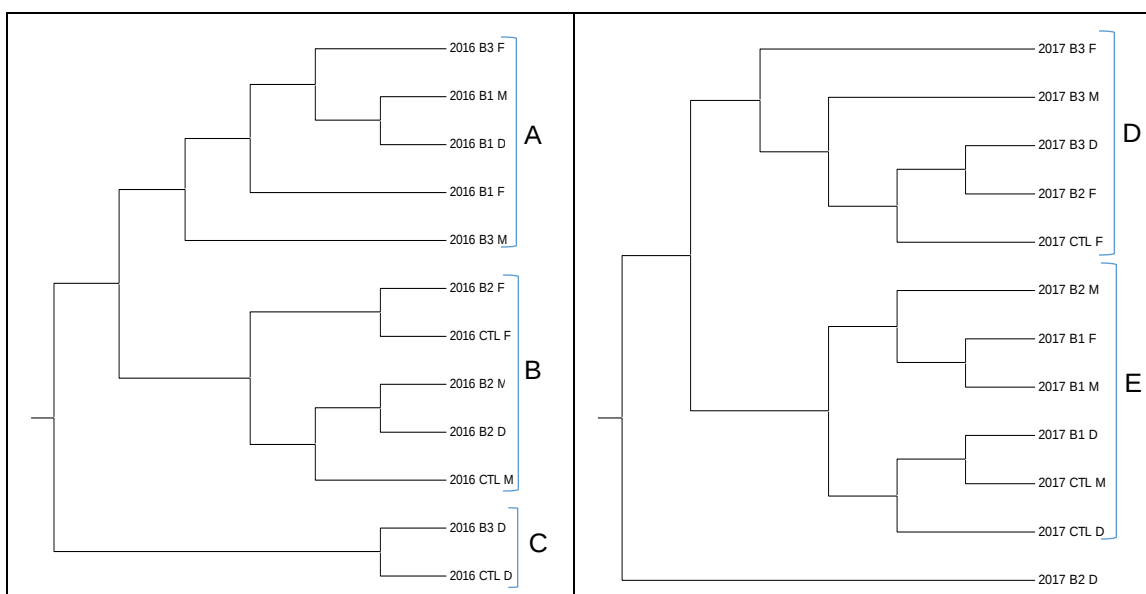


Figure 4. Dendrogramme représentant les similarités entre les profils phylogénétiques de la communauté bactérienne (OTU_{0.03}) des échantillons de sève prélevés en 2016 et 2017 des systèmes inoculés (B1, B2, B3) et contrôle en début, milieu et fin de saison (D, M, F).

Ces résultats semblent indiquer de manière générale que par exemple, l'inoculation avec la souche B3 en 2016 ne semble pas avoir permis à celle-ci de bien s'implanter en début de saison étant donné sa similitude avec le contrôle non inoculé. L'inoculation avec la souche B1 par contre semble avoir donné un profil distinct des autres traitements et contrôle laissant présager que cette souche ait pu s'implanter de façon prioritaire dans le système. Ce serait le cas également pour la souche B2 en début de saison 2017 qui montre un profil complètement

distinct des autres. La souche B1 semble aussi en 2017 donner des profils regroupés mais plus près de ceux du contrôle. Ces résultats montrent donc des profils généralement distincts pour les souches B1 (2016 et 2017) et B2 (2017) qui laissent présager qu'elles ont pu s'implanter de façon privilégiée dans les systèmes. Cependant, ces résultats doivent être appuyés par une analyse de la taxonomie des séquences associées afin de permettre de compléter les informations obtenues de la comparaison des profils d'OTU0.03 et ainsi mieux juger de l'implantation de ces souches et des effets subséquents sur la sève et le sirop.

Pour l'analyse taxonomique, il faut rappeler que les souches B1 et B3 appartiennent au genre *Pseudomonas* et font donc partie de la division des Proteobacteria et de la classe des Gamma proteobacteria. La souche B2 quant à elle appartient au genre *Janthinobacterium* qui fait partie de la division des Proteobacteria et de la classe des Beta proteobacteria. On a rapporté dans nos études antérieures du microbiote que la sève de bonne qualité est majoritairement composée de bactéries des genres *Pseudomonas* (Gamma proteobacteria) et de *Janthinobacterium* (Beta proteobacteria) (Lagacé et al 2004, Filteau et al. 2012). On a par contre associé les genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* (division des Firmicutes et classe des Bacilli) à une microflore indésirable pouvant occasionner certains défauts au sirop (Lagacé et al, 2013).

La Figure 5 présente la répartition de la microflore de la sève en ses principales divisions et classes pour la saison 2016. On remarque sur cette figure que le contrôle est composé majoritairement de Proteobacteria (95%) et de Bacteroidetes (4.9%). Les Proteobacteria sont composés quant à eux de 84.4% de Gamma proteobacteria et de Beta proteobacteria (10.3%). Ce profil pour le contrôle est tout à fait typique d'une sève de bonne qualité et s'explique probablement par le fait qu'en 2016, on a débuté l'expérimentation avec des systèmes neufs où l'influence d'une microflore indésirable était absente et aussi par la rigueur apportée aux opérations en érablière qui pourrait expliquer ce profil taxonomique typique, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour toutes les érablières. Les systèmes inoculés par la souche B1 quant à eux montrent aussi un profil taxonomique largement dominé par les Proteobacteria (89.7%) et complété essentiellement par les Bacteroidetes (7.6%). Les Gamma proteobacteria sont également majoritairement présents en plus des Beta proteobacteria qui complètent la division des Proteobacteria. Ce profil pour les systèmes inoculés avec la souche B1 correspond aussi à un profil favorable typique de la sève et s'explique dans ce cas-ci par le fait qu'ils ont été inoculés par une souche du genre *Pseudomonas*. Ce genre bactérien domine donc ces systèmes démontrant ainsi que la souche B1 semble s'être installée prioritairement dans ces systèmes. De plus, on n'y rapporte seulement que 4.9% des séquences parmi les Gamma

proteobacteria appartenant aux Enterobacteriaceae (flore indésirable) comparativement à 25% pour les systèmes contrôles (données non montrées). Si on regarde les systèmes inoculés avec la souche B2 par contre (Fig. 5), on remarque que ceux-ci sont dominés par les Proteobacteria de la classe des Gamma proteobacteria (85.9%) et par seulement 7.6% des bactéries de la classe des Beta proteobacteria à laquelle appartient la souche B2 (*Janthinobacterium*). La souche B2 semble donc ne pas s'être bien installée dans ces systèmes suite à son inoculation en début 2016. La souche B3 de son côté semble montrer qu'elle s'est moins bien installée suite à son inoculation comparativement à la souche B1 avec une proportion plus importante de Bacteroidetes (21%) et seulement 66.5% de Gamma proteobacteria, classe à laquelle la souche B3 appartient. Selon ces résultats de 2016, la souche B1 semble s'être mieux implantée dans les systèmes (Fig. 5), ce qui correspond également aux résultats cités plus haut à la figure 4.

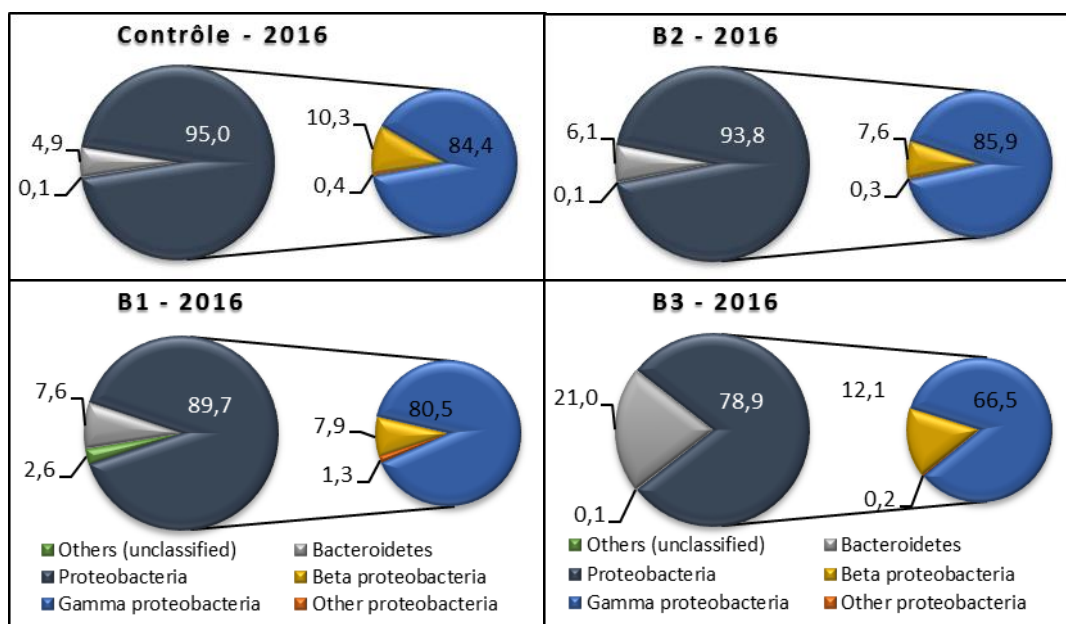


Figure 5. Résultats de répartition taxonomique moyenne (% de séquences par classe) en 2016 des échantillons provenant des systèmes inoculés (B1, B2, B3) et contrôles

La Figure 6 quant à elle présente les résultats de la répartition taxonomique (% de séquences par classe) cette fois-ci pour la saison 2017 où les systèmes étaient usagés d'un an et ont été assainis à l'alcool isopropylique à la fin de la saison 2016. Selon cette figure, les systèmes contrôles affichent un profil encore une fois tout à fait typique d'une sève de bonne qualité avec une proportion majoritaire des séquences appartenant à 95.8% aux Proteobacteria (Gamma proteobacteria à 90.5%). Un profil similaire est aussi obtenu des systèmes inoculés avec la souche B1 indiquant que celle-ci semble s'être bien installée malgré le risque plus grand qu'une

flore contaminante autre aurait pu s'installer dans un système usagé. Pour les systèmes inoculés avec la souche B2, ceux-ci montrent de façon évidente que la souche B2 s'est cette fois-ci bien installée dans ces systèmes puisqu'une proportion importante des séquences appartiennent aux Proteobacteria (92%) de la classe des Beta proteobacteria (40.7%). Ce qui n'a pas été le cas en 2016. Ce résultat est aussi conforme à celui présenté à la Figure 4. L'analyse des séquences indique également que le genre *Janthinobacterium* compose en très grande majorité (99.9%) la classe des Beta proteobacteria rapportée en 2017 pour ces systèmes (données non montrées). Pour la souche B3, celle-ci semble s'être installée dans les systèmes en 2017 mais encore une fois de façon moins évidente que la souche B1. L'inoculation avec cette souche a donné 90.9% de proteobacteria (83.6% Gamma) et 9.0% de Bacteroidetes.

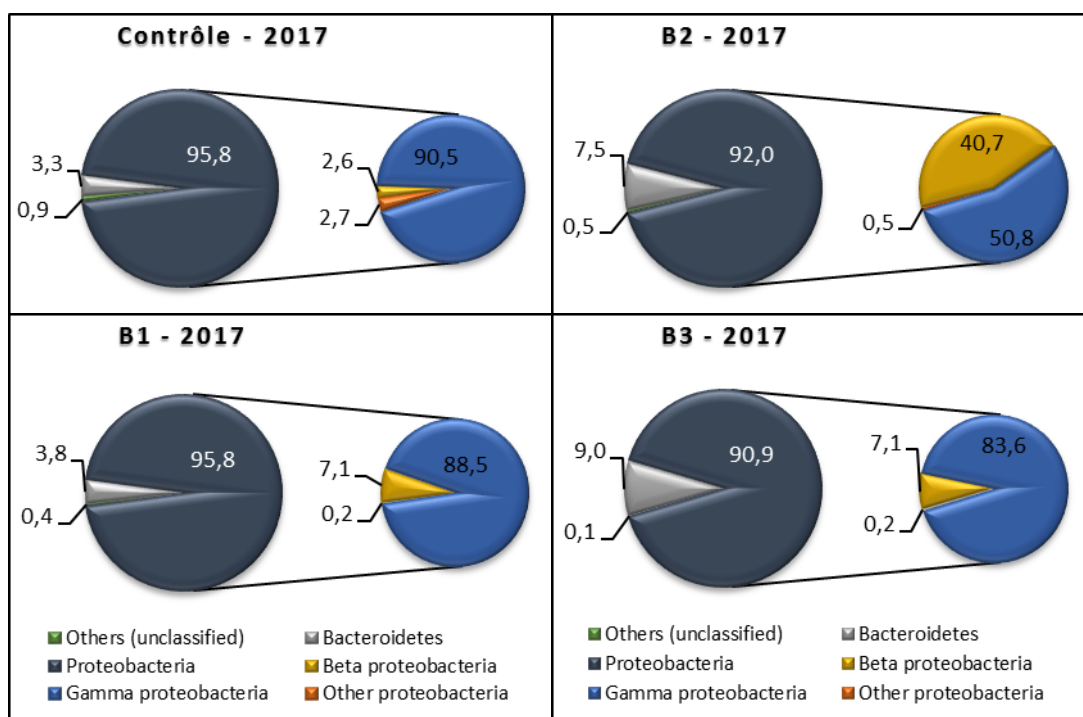


Figure 6. Résultats de répartition taxonomique moyenne (% de séquences par classe) en 2017 des échantillons provenant des systèmes inoculés (B1, B2, B3) et contrôles

Ces résultats sur la taxonomie démontrent principalement avec les souches B1 (2016 et 2017) et B2 (2017) qu'il est possible d'influencer la composition de la microflore de la sève en procédant à l'inoculation des systèmes de collecte par des souches indigènes à l'érable. Les résultats obtenus des contrôles rendent cependant plus difficile cette interprétation puisque que ceux-ci étaient aussi typique d'une flore favorable avec un équilibre penchant vers les Gamma proteobacteria. Ce qui n'est évidemment pas le cas de toutes les érablières où on a déjà

observé des déséquilibres importants favorisant d'autres espèces et aboutissant dans bien des cas à des défauts dans le sirop.

CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SÈVE ET DU SIROP

L'inoculation des systèmes de collecte de la sève par des microorganismes ne devrait pas en principe, induire de changement ou de dégradation notable de la composition et des propriétés de la sève et du sirop d'érable correspondant. Afin de vérifier ceci, plusieurs échantillons de sève et sirop ont été prélevés à différentes périodes des saisons 2016 et 2017 et analysés selon différents paramètres physico-chimiques.

Le pH est un paramètre physico-chimique important de la sève et du sirop souvent utilisé comme indicateur de changement dans la composition. La Figure 7 présente les résultats de pH pour les échantillons de sève et sirop correspondant prélevés à différents moments des saisons 2016 et 2017. De manière générale, le pH des sèves et sirops se situe entre 6.0 et 8.0, des valeurs qui sont normalement rencontrées pour des sèves et sirops de bonne qualité (Lagacé et al. 2015). On n'observe par ailleurs pas ou peu d'effet des traitements (inoculation et contrôle) sur le pH des sèves et sirops. On peut noter par contre un effet de la période sur les échantillons de sève où le pH tend à s'acidifier en fin de saison surtout en 2017 où les valeurs s'approchent de 6.0. Cet effet n'est par ailleurs pas perceptible sur les échantillons de sirop.

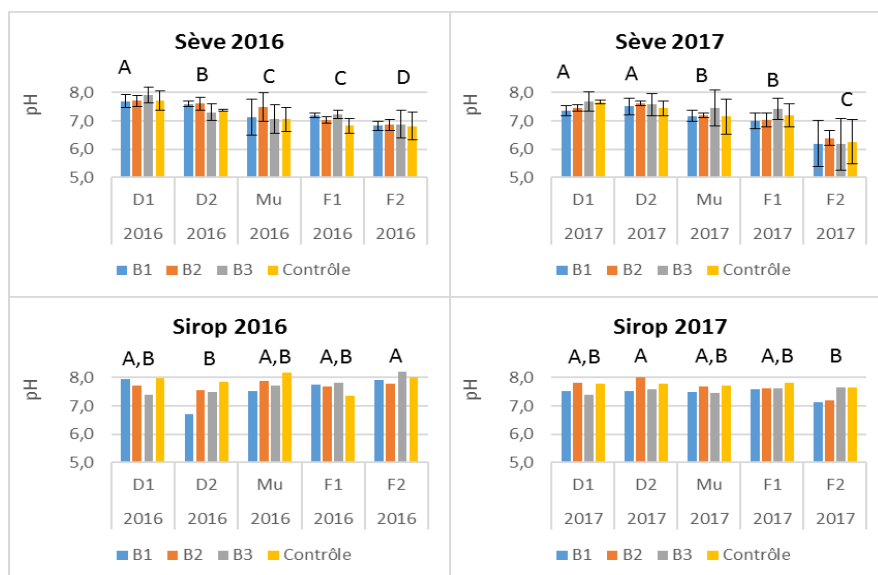


Figure 7. Résultats du pH de la sève et du sirop à différentes périodes des saisons 2016 et 2017 des échantillons provenant des systèmes inoculés (B1, B2, B3) et contrôles. Les lettres différentes indiquent une différences significatives, $p < 0.05$.

Un autre paramètre déterminant de la qualité des produits acéricoles, est sa teneur en glucose et fructose. Ces sucres sont issus de l'hydrolyse du saccharose, le principal sucre de la sève et sont aussi appelés sucres invertis. La présence de ces sucres dans la sève et le sirop est bien souvent indicatrice d'une activité microbienne jugée indésirable dans certains cas où l'hydrolyse du saccharose sera largement favorisée. La Figure 8 rapporte les résultats des teneurs en glucose et fructose des échantillons de sève prélevés à différentes périodes des saisons 2016 et 2017. On y remarque particulièrement que les teneurs en glucose et fructose sont beaucoup plus faibles en 2016 et pratiquement nulle sauf pour le contrôle où de faibles teneurs ont été enregistrées à la période F1. Pour le reste de 2016, les teneurs étaient inférieures à la limite de quantification de la méthode. Pour 2017, les teneurs sont légèrement plus élevées surtout en fin de saison (F2) où les teneurs en glucose et fructose du contrôle se démarquent des autres traitements d'inoculation. On retient donc que les concentrations en sucres invertis de la sève sont faibles dans la majorité des cas avec une légère augmentation en fin de saison pour les systèmes contrôles non inoculés dans lesquels une flore microbienne plus diversifiée ayant la capacité d'hydrolyser le saccharose a vraisemblablement pu se manifester. Notons qu'en 2017, les systèmes étaient usagés d'un an contrairement à 2016, où ceux-ci étaient neufs au départ, ce qui peut expliquer une légère augmentation des concentrations en sucres invertis en fin 2017. On notera pour compléter qu'aucun effet des traitements et de la période n'a été observé pour la teneur en saccharose des échantillons de sève.

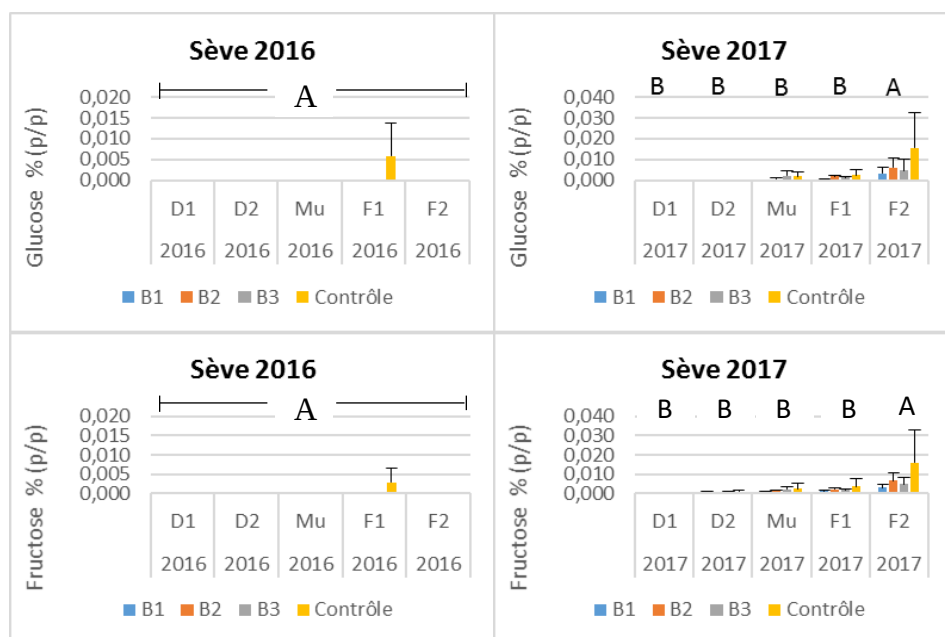


Figure 8. Résultats du % de glucose et fructose de la sève à différentes périodes des saisons 2016 et 2017 des échantillons provenant des systèmes inoculés (B1, B2, B3) et contrôles. Les lettres différentes indiquent une différences significatives, $p < 0.05$.

Pour ce qui est des teneurs en glucose et fructose des échantillons de sirop, celles-ci suivent essentiellement la même tendance que pour celles des échantillons de sève. Selon la Figure 9, les teneurs en sucres invertis du sirop en 2016 ont tendance à être plus faibles qu'en 2017. Seul le contrôle affiche une teneur plus élevée à la période F1 de 2016. Quant à 2017, la plupart des traitements (B1 et B2) et contrôles affichent une augmentation notable et comparable des concentrations en sucres invertis en fin de saison (F2) à l'exception du traitement B3. Ces teneurs restent tout de même relativement faibles.

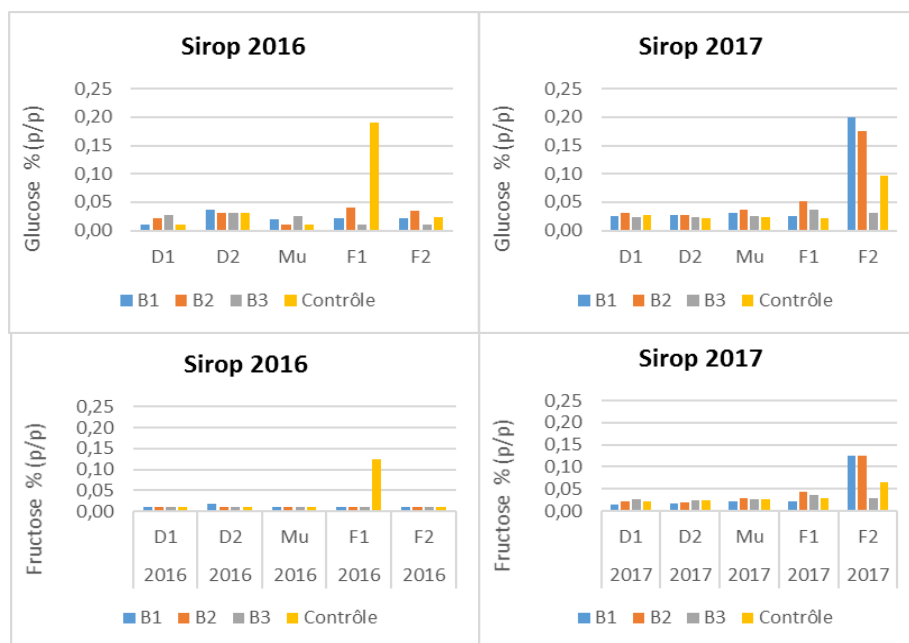


Figure 9. Résultats du % de glucose et fructose du sirop à différentes périodes des saisons 2016 et 2017 des échantillons provenant des systèmes inoculés (B1, B2, B3) et contrôles. Les lettres différentes indiquent une différences significatives, $p < 0.05$.

La couleur du sirop est un autre paramètre physico-chimique utilisé pour juger de sa qualité. Cette couleur (%T560 nm) est aussi liée dans une certaine mesure à la teneur en sucres invertis de la sève et à une augmentation de l'activité microbienne associée (Lagacé et al, 2002). Plus le sirop sera foncé (%T plus faible), plus la teneur en sucres invertis de la sève correspondante aura tendance à être élevée pour les mêmes conditions thermiques d'évaporation du sirop. Afin de juger de l'effet des traitements d'inoculation sur la couleur du sirop, la Figure 10 montre les valeurs de % de transmission de la lumière des échantillons obtenus des systèmes inoculés (B1, B2 et B3) et contrôles en 2016 et 2017. Rappelons que tous les échantillons de sirop ont été fabriqués selon les mêmes paramètres de concentration et d'évaporation thermique afin d'éviter l'influence de ceux-ci sur la couleur. En regardant la Figure

10, on constate que les sirops sont généralement pâles avec un % de transmission de la lumière entre 70 et 80%. En 2016, aucune différence n'a été relevée pour la couleur des sirops en fonction de la période. Les sirops issus des différents traitements et contrôles avaient aussi une couleur comparable. Pour 2017, seuls les sirops de fin de saison (F1 et F2) affichent une couleur légèrement plus foncée ($p < 0.05$). Ce résultat serait surtout attribuable aux sirops du traitement B1 et du contrôle. Pour ces sirops, la couleur plus foncée de ceux-ci en fin de saison est aussi reliée en partie à leur teneur légèrement plus élevée en sucres invertis (Figure 9) pour la même période. Le traitement B2 par contre ne semble pas suivre cette tendance pour la même période. Les effets restent tout de même légers, considérant les écarts de % de transmission de lumière observés. Peu d'effet donc a été observé de l'inoculation sur la couleur du sirop.

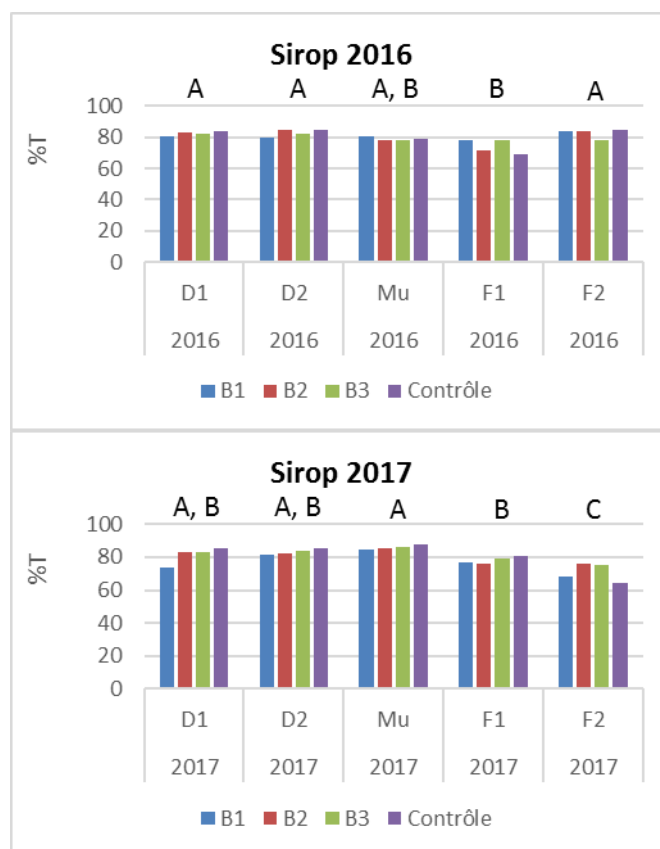


Figure 10. Résultats du % transmission de la lumière à 560 nm (couleur) du sirop à différentes périodes des saisons 2016 et 2017 des échantillons provenant des systèmes inoculés (B1, B2, B3) et contrôles.

Pour compléter, notons que la conductivité électrique, le °Brix et les acides organiques (acétique, citrique, fumarique, lactique, malique oxalique, pyruvique, quinique, shikimique, succinique et tartrique) des échantillons de sève et de sirop ont été mesurés. Ces paramètres par contre n'ont pas montré d'effet des traitements d'inoculation, les valeurs obtenues étaient sensiblement les mêmes pour les différents traitements (B1, B2 et B3) et les contrôles.

CARACTÉRISTIQUES SENSORIELLES DU SIROP

Le sirop d'érable provenant de la sève ayant été récoltée par un système inoculé, ne devrait pas présenter de défaut de saveur qu'on pourrait associer à cette inoculation et devrait être en général de bonne qualité sensorielle. C'est pourquoi des échantillons de sirop provenant des différents systèmes inoculés et contrôles ont été soumis dans un premier temps au service d'inspection afin de les catégoriser selon la présence ou non de défauts et dans un deuxième temps, à un panel de 20 juges afin d'établir des comparaisons entre eux en fonction des principales familles sensorielles.

Pour ce qui est des résultats obtenus du service d'inspection du sirop d'érable, les sirops produits en 2016 ont tous montré sans exception l'absence de défaut de saveur avec un goût conforme ou avec à l'occasion une légère trace de défaut (crochet) sans pénalité. Ce fût le cas également pour les sirops de 2017 à l'exception des sirops contrôles de début et fin de saison qui ont affiché un défaut vR4 et vR1 respectivement. Le défaut vR4 correspond à un défaut de saveur non identifié alors que le vR1 est caractérisé par la présence d'un défaut bien souvent d'origine naturelle comme le boisé, la sève ou relié à la transformation comme le surcaramélisé ou le brûlé. Dans l'ensemble donc, les sirops provenant des différents traitements possédaient un goût conforme à l'exception des sirops contrôles de début et fin de saison 2017.

Pour poursuivre, les sirops ont été soumis à une étude un peu plus approfondie de la saveur à l'aide d'un panel sensoriel. Les résultats obtenus des sirops de 2016 montrent très peu de différence pour les 3 familles sensorielles étudiées que sont la flaveur globale, la flaveur érable et la flaveur étrangère. En fait, aucune différence n'a été rapportée sur les familles flaveur globale et étrangère aux différentes périodes de la saison 2016. Seule la famille flaveur érable a montré une différence en fin de saison 2016 où le sirop contrôle et celui obtenu avec la souche B3 ont obtenu une note légèrement supérieure ($p < 0.05$). En 2017, plus de différences ont par contre été notées entre les sirops. Le Tableau 3 rassemble les résultats obtenus de cette analyse. On remarque sur le Tableau 3 premièrement qu'aucune différence n'a été notée sur les flaveurs globale et érable des sirops en début et milieu de saison. Seule la famille flaveur

étrangère a montré des différences notamment pour les sirops B2 et B3 qui avaient une intensité significativement supérieure comparativement aux sirops contrôle et B1 en début de saison. Les sirops B2 et B3 avaient de manière générale une intensité supérieure de goût d'emballage carton. Pour le reste, les différences ont surtout été notées aux périodes de fin de saison 2017 (F1 et F2). Pour ces périodes, les sirops obtenus des sèves inoculées avec les souches B1 et B2 ont affichés un score significativement supérieur pour les familles flaveur globale et érable comparativement au contrôle et B3. Ces résultats couplés à ceux obtenus en phylogénie où on a montré que les souches B1 et B2 semblaient s'être bien implantées en 2017, indiquent un effet bénéfique de ces souches sur le plan de la flaveur du sirop d'érable. Dans le cas du contrôle et de la souche B3 qui semble s'être moins bien implantée, les saveurs globale et érable se seraient moins bien développée en plus de présenter des défauts (contrôle).

Tableau 3. Comparaison de l'intensité des principales familles sensorielles du sirop d'érable pour les différents traitements d'inoculation (B1, B2 et B3) et le contrôle (sans inoculation) en fonction des différentes périodes de la saison 2017.

Famille sensorielle	Souches	Intensité de la flaveur par période				
		D1	D2	Mu	F1	F2
Flaveur globale	<i>Probabilité</i>	0.5458	0.8301	0.1215	0.0341*	0.0139*
	Contrôle	—	—	—	3.95 ^b	3.30 ^b
	B1	—	—	—	4.80 ^a	4.35 ^a
	B2	—	—	—	4.25 ^b	4.15 ^a
	B3	—	—	—	4.05 ^b	3.70 ^{ab}
Flaveur érable	<i>Probabilité</i>	0.3877	0.5899	0.2855	0.3248	0.0124*
	Contrôle	—	—	—	—	3.40 ^c
	B1	—	—	—	—	4.45 ^a
	B2	—	—	—	—	4.25 ^{ab}
	B3	—	—	—	—	3.60 ^{bc}
Flaveur étrangère	<i>Probabilité</i>	0.0140*	0.8299	0.5665	0.5117	0.2237
	Contrôle	3.90 ^{ab}	—	—	—	—
	B1	3.35 ^b	—	—	—	—
	B2	4.25 ^a	—	—	—	—
	B3	4.25 ^a	—	—	—	—

Les lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0.05$). Les valeurs de probabilité inférieures à 0.05 sont non significatives et indiquent qu'il n'y a pas de différence entre les traitements.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude sont les premiers à être obtenus dans le but d'évaluer la possibilité d'inoculer des souches bactériennes indigènes à l'érable à l'étape de la collecte de la sève. Une preuve de concept a été établie par la démonstration que certaines souches bactériennes se sont implantées suite à leur inoculation et que les principales caractéristiques physico-chimiques et sensorielles de la sève et du sirop ont été préservées voire même rehaussées. C'est le cas notamment de la souche B1 (*Pseudomonas* sp. 201-1B) qui semble s'être intégrée de façon privilégiée dans la tubulure servant à la collecte de la sève suite à son inoculation. Ce résultat n'a pas été obtenu au détriment d'une dégradation des paramètres physico-chimiques et sensoriels de la sève et du sirop. Au contraire, la souche B1 n'a eu dans la plupart des cas, aucun effet défavorable sur les propriétés de ces produits (pH, sucres invertis, couleur) et n'a pas eu d'effet néfaste sur le volume de sève récoltée. La saveur des sirops obtenus suite à l'inoculation de cette souche a même parfois été jugée supérieure à celle des sirops des autres traitements et contrôles. La souche B2 (*Janthinobacterium lividum* 100-P12-9) a aussi montré un potentiel intéressant toutefois dans une moindre mesure que la souche B1.

Bien qu'ils soient encourageants, ces résultats doivent être validés à une plus grande échelle et dans diverses conditions de récolte afin que cette technique soit proposée comme une solution viable à la variation de la qualité des produits acéricoles associée au manque de contrôle de la flore microbienne de la sève. Une optimisation des conditions d'inoculation pourrait également être envisagée afin de rendre celle-ci plus conviviale et efficace.

REMERCIEMENTS

Merci à Carmen Charron, Jessica Houde et Stéphane Corriveau pour leur contribution technique à ces travaux. Nous désirons également remercier le service d'analyse sensorielle (Nancy Graveline) du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments d'Agriculture et Agroalimentaire Canada ainsi que la plateforme d'analyses génomiques (IBIS) de l'Université Laval, Québec.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brûlé, C., Frey-Klett, P., Pierrat, J.C., Courrier, S., Gérard, F., Lemoine, M.C., Rousselet, J.L., Sommer, G., Garbaye, J. 2001. Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and the effects of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*. 33 : 1683-1694.
2. Edson, H.A., Jones, C.H., Carpenter, C.W. 1912. Micro-organisms of maple sap. Vermont University Agriculture and Experimental Station Bulletin no. 167.
3. Filteau, M., Lagacé, L., Lapointe, G., Roy, D. 2010. Seasonal and regional diversity of maple sap microbiota revealed using community PCR fingerprinting and 16S rRNA gene clone libraries. *Systematic and Applied Microbiology*, 33 : 165-173.
4. Filteau, M., Lagacé, L., Lapointe, G., Roy, D. 2012. Maple sap predominant microbial contaminants are correlated with the physicochemical and sensorial properties of maple syrup. *Int. J. of Food Microbiol.*, 154 : 30-36.
5. Hayward, F.W., Pederson, C.S. 1946. Some factors causing dark-colored maple sirup. New York State Agriculture and Experimental Station Bulletin no. 718.
6. Klindworth, A., E. Priesse, T. Schweer, J. Peplles, C. Quast, M. Horn et F. O. Glöckner. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41 (1): e1
7. Lagacé, L., Girouard, C., Dumont, J., Fortin, J., Roy, D. 2002. Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence. *Journal of Food Science*, 67 : 1851-1854.
8. Lagacé, L., Pitre, M., Jacques, M., Roy, D. 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 : 2052-2060.
9. Lagacé, L., Pitre, M., Jacques, M., Mafu, A.A., Roy, D. 2006. Compositions of maple sap microflora and collection system biofilms evaluated by scanning electron microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, 109 : 9-18.
10. Lagacé, L., Leclerc, S., Charron, C., Arzate, A., Boudreault, G., Houde, J., Corriveau, S., Pellerin, F., Sadiki, M. 2013. Maturation microbienne du concentré de sève d'érable. Centre ACER no. 4080079-FIN-0313. Rapport interne présenté à la Fédération des producteurs acéricoles du Québec. 79p.

11. Lagacé, L., Leclerc, S., Charron, C., Sadiki, M. 2015. Biochemical composition of maple sap and relationships among constituents. *Journal of Food Composition and Analysis*. 41 : 129 – 136.
12. Morselli, M.F., Whalen, M.L. 1991. Aseptic tapping of sugar maple (*Acer saccharum*) results in light color grade syrup. *Canadian Journal of Forest Research*, 21 : 999-1005.
13. Naghski, J. and Willits C.O. 1955. Maple sirup IX. Microorganisms as a cause of premature stoppage of sap flow from maple tap holes. *Applied Microbiology*, 3 : 149
14. Naghski, J., Reed, L.L., Willits, C.O. 1957. Maple sirup X. Effect of controlled fermentation of maple sap on the color and flavor of maple sirup. *Food Research*, 22 (2) : 176-181.
15. Sheneman, J.M., Costilow, R.N. 1959. Identification of microorganisms from maple tree tapholes. *Food Res.*, 24 : 146-151.
16. Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1501-1506
17. Stockwell, V.O., Stack, J.P. 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*, 97 : 244-249.
18. St-Pierre, N., Annecou, C., & Lagacé, L. (2014). Sanitisation of collection systems using isopropyl alcohol, guide for maple producers. Centre ACER, 27 p.
19. Willits, C.O., Frank, H.A., Bell, R.A. 1957. Maples sirup XIX. Flavor and color through controlled fermentation of maple sap. *Food Technology*, 15 : 473-474.