

RAPPORT FINAL

SUIVI DE L'IMPACT DE LA DÉSINFECTION À LA VAPEUR DE SOLS INFESTÉS PAR CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. MICHIGANENSIS.

IDENTIFICATION

- Demandeur : Ferme Le Filon maraicher
- Collaborateur : Jenny Leblanc (MAPAQ)
- Date : 16 janvier 2018
- Projet IRDA # : LEM17-21
- Partenaire financier : MAPAQ (PADAAR)

ÉQUIPE DU LABORATOIRE D'ÉCOLOGIE MICROBIENNE

- Responsable scientifique : Richard Hogue, Ph. D., IRDA
- Professionnel de recherche : Thomas Jeanne, M. Sc., IRDA
- Techniciennes de laboratoire : Vanessa Villeneuve; Véronique Gagné

2700, rue Einstein, Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-2380, poste 420

Courriel : richard.hogue@irda.qc.ca ou thomas.jeanne@irda.qc.ca



L'IRDA a été constitué en mars 1998 par quatre membres fondateurs, soit le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ), l'Union des producteurs agricoles (UPA), le ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC) et le ministère de l'Économie, de l'Innovation et des Exportations (MEIE).

L'IRDA est une corporation de recherche à but non lucratif qui travaille chaque année sur une centaine de projets de recherche en collaboration avec de nombreux partenaires du milieu agricole et du domaine de la recherche.

Notre mission

L'IRDA a pour mission de réaliser des activités de recherche, de développement et de transfert en agroenvironnement visant à favoriser l'innovation en agriculture, dans une perspective de développement durable.

Notre vision

En 2016, l'IRDA est reconnue à l'échelle canadienne comme un chef de file en recherche, développement et transfert en agroenvironnement. L'IRDA se démarque par son approche intégrée et par le dynamisme de ses partenariats qui lui permettent d'anticiper les problèmes et de proposer des solutions novatrices répondant aux besoins des agriculteurs et de la société.

Pour en savoir plus

www.irda.qc.ca

PARTENAIRE

**Agriculture, Pêcheries
et Alimentation**

Québec 

1 TABLE DES MATIÈRES

1	Table des matières.....	3
2	Méthodologie	4
	Contexte	4
2.1	Préparation des échantillons et extraction d'ADN.....	4
2.2	Détection moléculaire par PCR quantitative	4
2.3	Diversité microbienne des sols.....	4
2.4	Traitement bioinformatique et biostatistique	5
2.5	Analyses complémentaires.....	5
3	Résultats	6
3.1	Plan d'échantillonnage	6
3.2	Quantification des bactéries et champignons totaux	7
3.3	Diversité microbienne des sols.....	9
3.3.1	Richesse microbienne.....	9
3.3.2	Composition microbienne	9
3.3.3	Composition taxonomique	11
3.3.4	Détection de Cmm dans les sols par l'analyse de diversité bactérienne totale	11
3.4	Analyses chimiques et biologiques complémentaires.....	12
3.5	Analyse fonctionnelle -Biolog.....	13
4	Conclusion	15
5	références.....	16

2 MÉTHODOLOGIE

Contexte

Suite à la détection d'une bactérie pathogène, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), dans une culture maraîchère en serre, un traitement de désinfection du sol à la vapeur a été entrepris. Afin d'assurer un suivi de l'impact du traitement à la vapeur, des échantillons composites de sol ont été prélevés dans différentes zones des rangs de culture. Trois temps de prélèvement ont été réalisés avant le traitement, cinq jours et 122 jours après le traitement.

Toutes les informations relatives au traitement de désinfection à la vapeur peuvent être consultées dans le rapport : *Désinfection à la vapeur d'un sol de serre biologique infecté par Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* produit par l'équipe de suivi agronomique du producteur sous la direction de Jenny Leblanc, agr..

2.1 Préparation des échantillons et extraction d'ADN

Les échantillons soumis au service d'analyse en écologie microbienne de l'IRDA ont été préparés et extraits en utilisant la trousse d'extraction FastDNA Spin kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH, É-U).

La qualité et la quantité des ADN génomiques extraits ont été déterminées par spectrophotométrie avec les mesures de l'absorbance à 260 nm et 280 nm et du ratio A260/A280.

2.2 Détection moléculaire par PCR quantitative

Deux systèmes qPCR ont été utilisés pour réaliser les détections:

(1) Quantification des bactéries totales avec les amorces eub338/eub518 (Fierer & Jackson 2005);

(2) Quantification de Cmm avec les amorces PSA-8/PSA-R (Patrik & Rainey 1999).

Les détections ont été faites en deux répétitions sur un appareil CFX96 (Biorad, Hercules, CA, É-U) avec un mélange réactionnel SYBR green qPCR mix (Qiagen, Toronto, ON, Canada). Les résultats sont exprimés en unité d'amplification (UA) par g de sol sec. Il est important de noter que plusieurs copies des gènes ciblés peuvent être détectées au sein d'un même organisme et en nombre variable entre les organismes lors du processus de quantification des organismes bactériens (16S r ARN).

2.3 Diversité microbienne des sols

Les analyses de métagénomique ont évalué la diversité bactérienne et eucaryotique. Les amplifications des régions V6-V8 du 16SrARN bactérien et du 18SrARN eucaryotique, ont été réalisées en utilisant les séquences-amorces des régions spécifiques décrites par (Comeau et al. 2017), et en utilisant une approche en deux étapes de PCR (dual-indexed PCR approach) spécialement conçues pour l'analyse avec la plateforme de séquençage haut débit Illumina MiSeq. Les bibliothèques d'amplicons ont été séquencées en format apparié (paired-end) avec

une lecture de 300 bases, soit 2 x 300 paires de bases de chaque côté du brin d'ADN sur Illumina MiSeq à la plateforme d'analyses génomiques de l'Institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS) de l'Université Laval (Québec, CA).

2.4 Traitement bioinformatique et biostatistique

Le traitement bioinformatique des séquences a été effectué sur la plateforme bioinformatique du laboratoire d'écologie microbienne de l'IRDA et a impliqué différentes stratégies de traitement (Qiime 1.9 (Caporaso et al. 2010) et R (R Core Team project 2014)) incluant des étapes de validation de la qualité, des bases de références et d'indices de mesure de la richesse microbienne et des mesures de comparaison de la diversité microbienne. La base de référence SILVA version 119 (Quast et al. 2013) a été utilisée pour les analyses de la diversité des bactéries et des eucaryotes. Les tables d'OTUs obtenues ont été filtrées avant les analyses de diversité alpha et beta afin de réduire certaines problématiques liées aux OTUs de très faibles abondances.

2.5 Analyses complémentaires

Des échantillons groupés des sols de chaque rang et aux 3 dates échantillonnées ont également été analysés au niveau chimique et biologique (pH, pourcentage de matière organique, C et N total, macro et micro-éléments, C et N organique total extractibles à l'eau, respiration microbienne 24 hres). Une analyse fonctionnelle basée sur les plaques Ecoplate de BIOLOG (Hayward, CA, É-U) a également été effectuée pour évaluer la capacité d'utilisation de différents composés carbonés par les micro-organismes du sol.

3 RÉSULTATS

3.1 Plan d'échantillonnage

24 échantillons ont été prélevés sur trois rangs et huit échantillons par rang (rangs 1, 3 et 5).

Un échantillon au 10.5 pieds linaires sur le rang et trois prélèvements de sol par échantillon ont été réalisés.

Le traitement à la vapeur a été effectué le 8 mars 2017 pour les rangs 1 et 3 et le 10 mars 2017 pour le rang 5.

De plus, six échantillons de sols à l'extérieur de la serre ont également été évalués en saison, ils ont été identifiés A, B, C, D, E et F. (voir plan).

Nom	Date d'échantillonnage	Date de réception	Nombre de jours avant ou après traitement
AVANT	6 mars 2017	14 mars 2017	2-4 jours avant traitement
APRES	13 mars 2017	14 mars 2017	3-5 jours après traitement
SAISON	13 juillet 2017	13 juillet 2017	120-122 jours après traitement

Rang 6	Rang 5	Rang 4	Rang 3	Rang 2	Rang 1
	No.24		No.16		No.8
	No.23		No.15		No.7
	No.22		No.14		No.
	No.21		No.13		No.5
	No.20		No.12		No.4
	No.19		No.11		No.3
	No.18		No.10		No.2
	No.17		No.9		No.1

3.2 Quantification des bactéries et champignons totaux

Tableau 1. Quantification des bactéries totales, détection de Cmm et concentration des ADN génomiques des sols. Chaque zone représente un composite de deux échantillons de sol.

Zones	Rang	Bactéries totales UA/g sol sec			Cmm (Positif/Négatif)			ADN génomique µg d'ADN/g sol sec		
		Avant	Après	Saison	Avant	Après	Saison	Avant	Après	Saison
1_2	1	5.51E+09	3.67E+09	1.69E+09	neg.	neg.	neg.	233.15	83.70	297.62
3_4	1	5.28E+09	4.02E+09	1.86E+09	neg.	neg.	neg.	196.37	92.02	245.04
5_6	1	9.19E+09	3.43E+09	1.24E+09	neg.	neg.	neg.	296.41	85.55	216.80
7_8	1	9.66E+09	3.58E+09	1.26E+09	neg.	neg.	neg.	298.49	102.81	207.20
9_10	3	7.61E+09	1.94E+09	1.50E+09	neg.	neg.	neg.	290.17	80.12	280.30
11_12	3	7.49E+09	2.86E+09	1.46E+09	neg.	neg.	neg.	292.39	83.49	307.02
13_14	3	1.18E+10	2.71E+09	2.29E+09	neg.	neg.	neg.	294.94	46.02	401.43
15_16	3	7.49E+09	3.45E+09	1.79E+09	neg.	neg.	neg.	285.95	68.61	322.33
17_18	5	7.00E+09	5.31E+09	1.30E+09	neg.	neg.	neg.	273.89	61.92	219.05
19_20	5	5.57E+09	6.19E+09	1.44E+09	neg.	neg.	neg.	202.28	65.20	215.08
21_22	5	7.35E+09	4.82E+09	1.68E+09	neg.	neg.	neg.	241.65	78.91	212.68
23_24	5	5.89E+09	3.93E+09	1.15E+09	neg.	neg.	neg.	205.92	54.40	197.93
		2 jours avant	5 jours après	122 jours après	2 jours avant	5 jours après	122 jours après	2 jours avant	5 jours après	122 jours après

Préalablement à la quantification du nombre total de bactéries dans chaque échantillon de sol, nous avons réalisé un test préliminaire pour détecter dans les extraits d'ADN totaux de sol, la présence de contaminants qui peuvent être co-extraits avec les ADN et qui peuvent inhiber le processus enzymatique de la réaction d'amplification PCR des ADN de bactéries. Les résultats de ce test préliminaire indiquent que l'ensemble des extraits d'ADN total ne présente pas d'inhibition de la réaction PCR à la dilution utilisée pour quantifier les bactéries totales et les champignons totaux.

Le Tableau 1 présente les résultats obtenus pour trois éléments d'information : (1) l'estimation du nombre de bactéries par gramme de sol sec; (2) la détection de la bactérie pathogène Cmm dans les sols ; et (3) la quantité d'ADN génomique total, exprimée en microgramme d'ADN par gramme de sol sec.

Pour le premier élément d'information, le nombre estimé de bactéries est exprimé en unité d'amplification de bactéries (UA) par g de sol sec. Il est important de noter que le gène ciblé pour la quantification de toutes les bactéries d'un échantillon de sol peut être présent en plusieurs copies au sein d'une même bactérie et en nombre variable entre les différentes espèces de bactéries. La méthode de quantification des bactéries totales par gramme de sol sec fournit donc une estimation fiable du nombre total de bactéries par échantillon, lorsque les échantillons sont composés de populations de bactéries similaires.

Le Tableau 1 indique que les nombres totaux estimés de bactéries totales dans les échantillons de sol sont généralement un peu plus faibles cinq jours après le traitement à la vapeur et plus faibles encore 122 jours après le traitement. Dans l'ensemble toutefois, ces diminutions sont relativement trop faibles pour être significatives d'un point de vue biologique, l'exposant log étant demeuré à 09 (Ex. :1.00E+09) dans toutes les mesures. Une différence d'exposant log de plus de 1 (Ex. : 1.00E+07) aurait davantage de signification biologique.

Ainsi, les résultats du tableau 1 indiquent deux constats possibles : soit le traitement n'a pas eu d'effet sur le nombre total de bactéries par g de sol sec pour tous les échantillons prélevés, ou bien le traitement a eu un effet mais le nombre total de bactéries cinq jours après le traitement était déjà revenu au niveau du nombre total de bactéries estimé dans les sols avant le traitement.

Tous les échantillons sont négatifs pour la détection de la bactérie Cmm (Tableau 1, (2)).

Lorsque l'on regarde la quantité extraite d'ADN génomique par gramme de sol sec (3), on observe une diminution importante de la quantité d'ADN total extraite des sols cinq jours après le traitement à la vapeur (Tableau 1). La quantité extraite d'ADN génomique par gramme de sol sec s'accroît ensuite pour l'échantillon de sol prélevé 122 jours après le traitement. Cela pourrait indiquer que le traitement a affecté la quantité totale d'ADN génomique que l'on a extrait du sol cinq jours après le traitement. Le traitement a donc eu un effet significatif sur la réduction des ADN totaux, ce qui représente deux choses : un effet de suppression des organismes qui possèdent ces ADN génomiques, et, la destruction d'ADN génomique qui peut être extrait de la matière organique morte et en décomposition dans le sol. Puisque le nombre de bactéries totales n'a pas été réduit dans les sols prélevés cinq jours après le traitement, nous pouvons déduire que le traitement aurait eu un effet suppressif sur des organismes autres que bactériens, ou, aurait contribué à éliminer ou détruire une grande quantité d'ADN lié à de la matière organique morte et en décomposition dans le sol. Cette dernière source d'ADN génomique peut être importante lorsque des échantillons de sol sont soumis aux extractions d'ADN totaux.

Après 122 jours, la quantité d'ADN génomique par gramme de sol sec est similaire à la quantité détectée dans les sols avant le traitement, ce qui laisse penser que l'effet supprimeur ne s'exprime plus et que les organismes qui avaient été réprimés ne le sont plus. Le nombre total de bactéries quantifiées dans les sols 122 jours après le traitement étant similaire à celui des bactéries quantifiées avant et cinq jours après le traitement, il est probable que ce sont d'autres organismes qui se sont introduits ou multipliés dans le sol pour élever la quantité d'ADN génomique total détectable par gramme de sol sec au niveau qui avait été détecté avant traitement (Tableau 1). De même, de la matière organique a été intégrée au sol lors de la saison de culture et l'ADN de cette matière organique morte et en décomposition peut-être extrait et peut contribuer à augmenter la quantité d'ADN génomique total détectable par gramme de sol sec.

Les résultats des analyses du microbiome (section 2.3) des sols pourront fournir des indices sur le type d'organismes présents dans les sols à chacune des dates de prélèvement. Les résultats permettront aussi de connaître la proportion qu'occupe chaque type d'organisme détecté. Les analyses du microbiome pourront mieux discerner la bonne interprétation à donner des résultats du Tableau 1.

3.3 Diversité microbienne des sols

3.3.1 Richesse microbienne

La figure 1 présente les résultats de la richesse microbienne. L'indice de Shannon est utilisé afin d'évaluer la richesse bactérienne (Gauche) et eucaryotique (Droite). Dans les deux cas, le traitement à la vapeur a réduit significativement la richesse microbienne. On observe également que cette richesse n'est pas encore revenue au niveau d'avant traitement même en cours de saison au mois de juillet. Enfin, la richesse microbienne des sols de la serre en saison, est équivalente à la richesse des sols à l'extérieur de la ferme avec une plus grande variabilité pour les sols extérieurs dans le cas de la richesse eucaryotique.

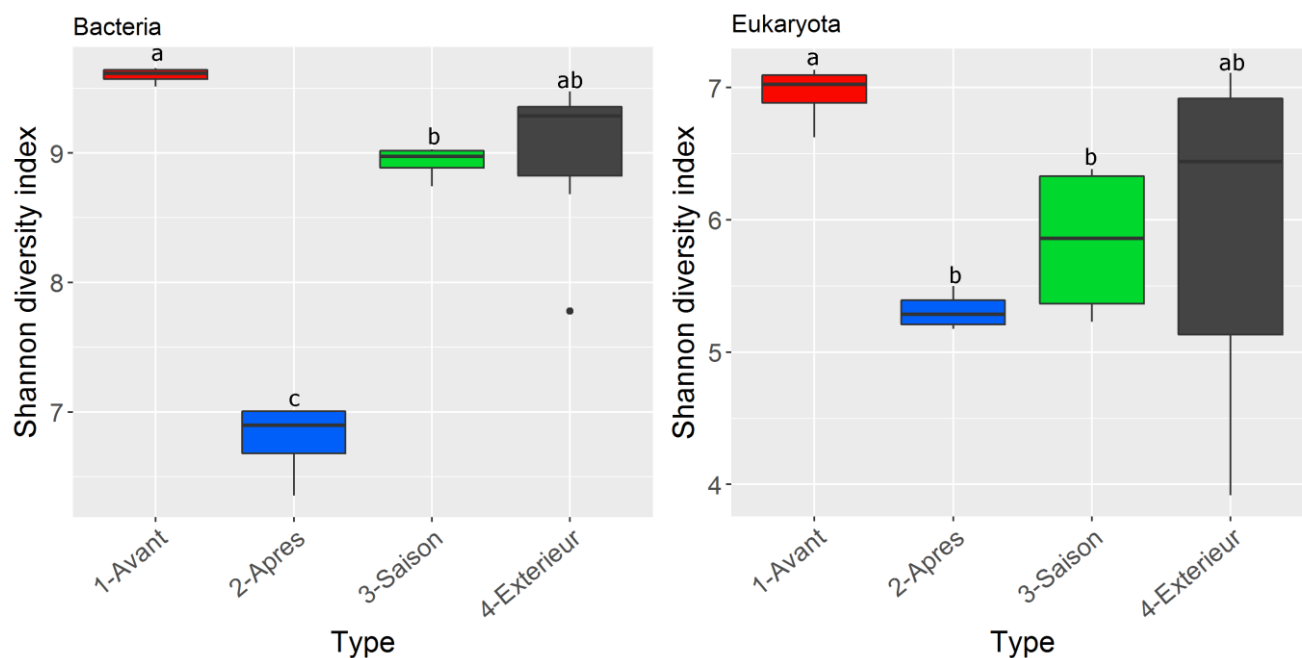
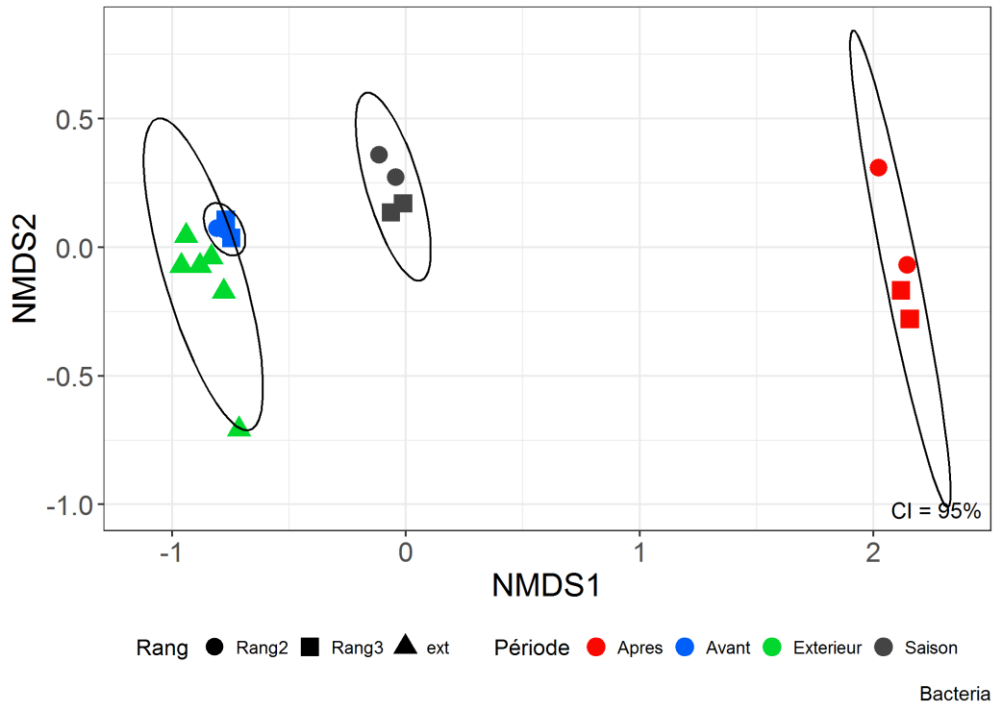


Figure 1 : Indice de diversité (richesse) de Shannon pour les bactéries (Gauche) et pour les eucaryotes (Droite). (Signification $p < 0.05$)

3.3.2 Composition de la diversité microbienne

La figure 2 permet de comparer la composition de la diversité microbienne des sols dans le cas des bactéries (Haut) et des eucaryotes (Bas). On observe qu'il y a un effet important du traitement à la vapeur sur la composition bactérienne (voir les regroupements) et également dans le cas des eucaryotes. Cette composition microbienne a nettement évolué pour les sols de saison mais demeure différente de la composition microbienne avant traitement et également différente par rapport à celle des sols prélevés à l'extérieur de la serre (surtout dans le cas des bactéries).

Composition de la diversité bactérienne des sols



Composition de la diversité eucaryotique des sols

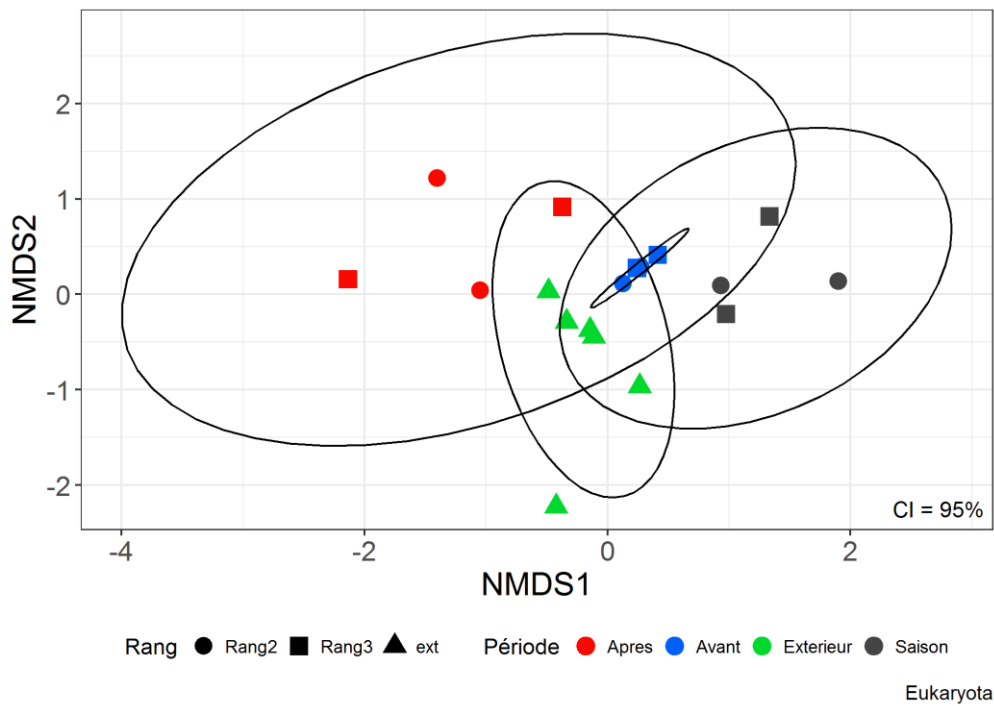


Figure 2 : Ordination NMDS permettant de représenter la composition de la diversité microbienne des sols dans le cas des bactéries (haut) et des eucaryotes (bas)

3.3.3 Composition taxonomique

La figure 3 présente les proportions relatives des principaux groupes bactériens et eucaryotiques identifiés dans les sols analysés. Les résultats sont regroupés selon le temps de prélèvement des sols. Les sols échantillonnés à l'extérieur de la serre sont regroupés en une seule catégorie dans la figure 3. Le détail des échantillons de l'extérieur de la serre sera communiqué directement aux partenaires du projet.

Au niveau des bactéries, même si la quantité totale de bactéries n'est pas significativement différente entre les sols avant et après traitement (tableau 1), on observe qu'il y a un effet drastique du traitement sur la composition bactérienne. Le traitement a eu un effet suppressif important sur l'ensemble des principaux groupes bactéries incluant les Actinobactéries (dont fait partie Cmm), excepté pour les Firmicutes. Ce phylum bactérien est majoritaire dans les sols des parcelles évaluées une semaine après traitement. Cependant, on observe un retour à une composition en saison, plus proche de celle d'avant traitement. La proportion des Firmicutes reste plus importante en saison qu'avant le traitement à la vapeur. L'impact du traitement à la vapeur au niveau des eucaryotes est moins marqué, mais on observe que ce sont les populations fongiques qui sont les plus affectées. Les changements initiés perdurent en saison, avec une réduction supplémentaire de la proportion des champignons au profit de groupes microfauniques tel que les nématodes ou les annélides (identifié comme « animalia » dans la figure 3). N'ayant pas de parcelles non traitées, il est cependant difficile d'isoler l'effet temporel lié à la saison agronomique.

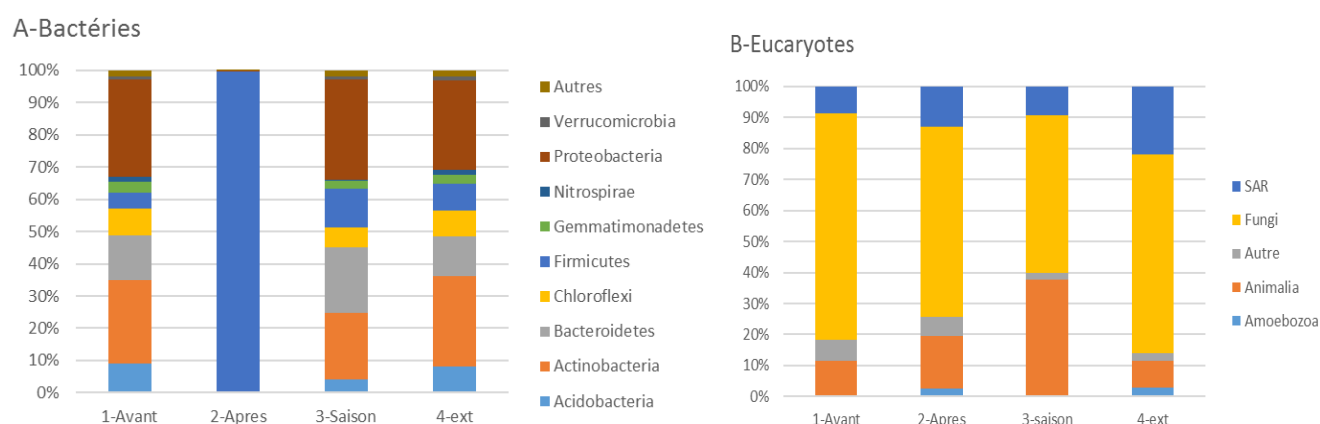


Figure 3 : Proportions relatives des principaux groupes Bactériens (A) et Eucaryotiques (B)

3.3.4 Détection de Cmm dans les sols par l'analyse de diversité bactérienne totale

L'analyse de diversité bactérienne, qui n'est pas couramment utilisée comme outil de détection (plus un outil d'écologie microbienne), a permis d'identifier la présence de Cmm dans le rang 3 pour un des deux groupés analysés et pour le temps Avant traitement. Ces détections sont par contre très faibles (<0.01%) et à la limite du seuil de détection pour cette technique d'analyse. Il est donc important de bien nuancer l'interprétation de ces détections. Aucune détection n'a été faite après traitement ou en saison sur les mêmes zones. L'analyse par une autre méthode moléculaire plus couramment utilisée en analyse de détection, la PCR quantitative, n'avait pas permis d'identifier la présence de Cmm dans les sols analysés. L'analyse de diversité microbienne ayant été

effectuée sur des groupés et des ADN différents, ainsi que le très faible niveau d'ADN de Cmm détecté peut expliquer ce résultat. La présence de Cmm dans les sols extérieurs A et D a été détectée mais toujours à des niveaux de détection très faibles (<0.01%).

3.4 Analyses chimiques et biologiques complémentaires

Tableau 2. Bilan des analyses chimiques et biologiques

Période Zone Rang	AVANT TRAITEMENT			5 jrs APRES TRAITEMENT			122 jrs APRÈS TRAITEMENT		
	Début 1	Début 3	Début 5	Début 1	Début 3	Début 5	Début 1	Début 3	Début 5
pH * eau	6.7	6.7	6.7	7.1	6.9	6.8	7.1	7.3	7.1
M.O. * (PAF) %	5.8	6.2	7.4	6.2	7.0	7.2	7.6	9.1	8.7
N-NH4 mg/kg	1.3	1.2	2.0	30.6	32.4	38.7	1.6	1.6	1.5
N-NO3 * mg/kg	31.8	48.4	50.5	5.6	3.7	5.9	14.7	21.1	24.7
P mg/kg	200	223	318	288	259	315	343	361	339
K mg/kg	293	193	328	325	168	287	757	791	811
Ca mg/kg	2173	2496	2897	2510	2314	2605	3726	3833	3602
Mg mg/kg	253	307	382	286	264	324	414	436	442
Al mg/kg	1550	1457	1352	1427	1442	1335	1326	1174	1247
B mg/kg	0.8	0.8	1.0	1.0	0.8	0.9	1.4	1.5	1.4
Cu mg/kg	2.2	2.2	2.5	2.3	1.7	2.0	3.2	3.0	3.4
Fe mg/kg	168	179	206	179	194	206	168	162	188
Mn mg/kg	12.1	12.9	16.0	49.3	51.3	67.1	35.7	34.4	43.5
Zn mg/kg	9.4	12.1	15.2	11.4	11.0	14.3	18.1	21.4	18.4
Na mg/kg	231	241	281	161	168	182	174	282	276
C total %	2.8	3.2	4.0	3.2	3.7	4.0	4.1	5.4	5.1
N total %	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
C/N total Calcul	14.8	15.0	14.9	14.8	14.8	14.4	15.5	16.3	15.6
C-CO2 24 h_eau mg/kg	59	60	75	70	68	86	109	109	116
C Org_ext eau mg/kg	258	213	275	476	517	642	227	339	329
N Tot_ext eau mg/kg	48	59	79	45	46	62	35	53	60
N-NH4_ext eau mg/kg	0.5	0.8	1.4	13.4	13.8	19.5	2.0	2.1	2.3
N-NO3_ext eau mg/kg	29.6	43.4	57.5	5.1	3.7	5.6	15.1	23.5	29.1
N Org_ext eau mg/kg	17.4	15.0	20.5	26.6	28.4	37.2	17.6	27.0	28.3
C/N Org_ext eau	14.9	14.2	13.4	17.9	18.2	17.3	12.9	12.6	11.6

Les zones «Début» de chacun des rangs 1, 3 et 5 sont constituées d'un composite des échantillons de sol prélevés no 1,2,3,4 pour le rang 1; 9,10,11,12 pour le rang 3; et 17-18-19-20 pour le rang 5.

Les résultats du tableau 2 montrent que le traitement appliqué aux sols a eu un impact au niveau du Corg total et également au niveau de la répartition des formes d'azote dans les sols. Le traitement à la vapeur a eu un effet d'hydrolyse de la matière organique libérant ainsi des formes de matières organiques facilement disponibles et mesurées sous forme de Corg ext eau. Toutefois, ce Corg ext eau dans les échantillons prélevés 122 jours après

le traitement revient au même niveau que celui observé pour les échantillons d'avant traitement. On observe aussi que la respiration microbienne (C-CO₂ 24h_ext eau) n'est pas impactée par le traitement à la vapeur. Mais, les valeurs de respiration sont plus élevées dans les échantillons prélevés 122 jours après le traitement, ce qui peut s'expliquer par les interventions de régie agronomique appliquées durant la saison de croissance de la culture.

3.5 Analyse fonctionnelle -Biolog

Rang 1	Début du rang			Fin du rang				
Période	Avant	Après	Saison	Avant	Après	Saison	Effet avant/après	Effet après/saison
Carbohydrates	8.83	3.43	8.89	7.40	4.08	8.83	-	+
Complex carbon source	3.31	4.19	4.07	3.54	2.59	4.23	var	var
Carboxylic acids	6.81	9.62	7.23	9.19	8.25	7.89	var	-
Amino acids	5.65	8.06	4.02	6.10	7.67	4.58	+	-
Phosphate-carbon	1.05	1.30	0.80	0.53	0.64	0.71	+	var
Rang 3	Début du rang			Fin du rang				
Période	Avant	Après	Saison	Avant	Après	Saison		
Carbohydrates	9.03	6.21	8.98	7.85	6.99	7.25	-	+
Complex carbon source	3.86	3.18	4.62	3.66	3.77	3.94	var	+
Carboxylic acids	8.08	8.36	7.24	8.31	8.97	8.51	+	-
Amino acids	5.80	8.67	4.14	7.26	7.26	4.10	var	-
Phosphate-carbon	0.37	0.82	0.81	0.57	1.38	0.75	+	var
Rang 5	Début du rang			Fin du rang				
Période	Avant	Après	Saison	Avant	Après	Saison		
Carbohydrates	7.93	8.40	9.71	7.76	7.29	8.35	var	+
Complex carbon source	3.22	3.24	5.26	4.15	3.59	3.93	var	+
Carboxylic acids	7.67	7.78	8.02	7.96	9.46	7.54	+	var
Amino acids	5.99	5.16	4.13	5.79	5.46	4.36	-	-
Phosphate-carbon	0.96	1.56	0.57	0.60	1.09	0.75	+	-

La colonne saison réfère aux échantillons de sol prélevés 122 jours après l'application du traitement.

Figure 4. Cumul des absorbances des plaques Ecoplate pour les groupes de composés carbonés évalués. Le gradient de couleur est spécifique pour chaque groupe de composés et pour chaque zone (début de rang ou fin de rang). Une intensité de couleur élevée signifie que des valeurs supérieures d'absorbance cumulée sont observées.

Au niveau fonctionnel, la figure 4 présente le cumul des utilisations de différents composés carbonés par les bactéries. On observe que pour les rangs 1 et 3 les carbohydrates sont généralement moins bien utilisés par rapport aux autres composés carbonés tel que les composés phosphate-carbone et les amino-acides dans les sols après traitement par rapport aux sols avant traitement. La répartition des composés des sols prélevés 122

jours après le traitement redevient plus similaire à la répartition de la métabolisation des composés carbonés des sols avant traitement. Ces changements pour les sols prélevés cinq jours après traitement, pourraient résulter de l'hydrolyse de composés organiques par le traitement à la vapeur qui aurait ainsi bénéficié à certains groupes microbiens.

Les cinétiques de croissance du cumul des absorbances des différents composés carbonés des plaques Ecoplate ont également été évaluées mais ne montrent pas de différence entre les sols avant et cinq jours après traitement. Par contre, les sols prélevés 122 jours après le traitement présentent des courbes qui plafonnent plus haut, ce qui reflète une plus large gamme d'utilisation de composés carbonés et donc, une composition bactérienne possiblement différente par rapport aux sols avant et après traitement.

4 CONCLUSION

L'analyse des sols à 3 stades, soit avant traitement à la vapeur, 5 jours après le traitement et en saison, a permis de valider que le traitement à la vapeur a eu un effet important aussi bien au niveau des constituants chimiques que de la biologie des sols. Un effet particulièrement important est observé au niveau de la composition microbienne et de la richesse microbienne. On observe que la majorité des groupes microbiens sont affectés par le traitement à l'exception des Firmicutes. Ce groupe, de par sa constitution cellulaire, semble avoir mieux résisté au traitement à la vapeur et c'est développé dans les jours suivant le traitement. L'hydrolyse de la matière organique a pu également profiter à ce développement. L'objectif de ce traitement étant de réduire ou d'éliminer la présence de Cmm dans les sols, on constate que le groupe des Actinobactéries (qui inclut les Cmm), est affecté par le traitement, donc a priori, également la bactérie *Clavibacter michiganensis* (Cmm). Afin de valider l'effet direct du traitement sur la présence de la bactérie Cmm, une première approche spécifique utilisant la technologie de PCR quantitative n'avait pas permis de détecter la présence de Cmm dans les sols analysés. Par contre, l'analyse de diversité bactérienne totale a permis d'identifier la présence de la bactérie Cmm dans un échantillon du rang 3 pour le temps avant traitement. Il est par contre important de mentionner que son importance relative est très faible et inférieure à 0.01% du nombre total de bactéries. Deux autres détections ont également été identifiées sur les prélèvements effectués à l'extérieur de la serre, également à des niveaux très faibles. Ces observations vont donc dans le sens des diagnostics effectués sur les végétaux. Le traitement à la vapeur semble avoir eu un effet positif pour réprimer la bactérie Cmm, mais il est possible que cette bactérie puisse à nouveau se développer, surtout si la source de contamination n'a pas été identifiée. Le fait de retrouver des traces de Cmm à l'extérieur de la serre montre qu'il serait pertinent d'approfondir cette étude afin d'éviter le développement de nouveau cas de maladie sur la ferme.

5 RÉFÉRENCES

- Caporaso, J.G. et al., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), pp.335–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0510-335> [Accessed November 1, 2012].
- Comeau, A.M., Douglas, G.M. & Langille, M.G.I., 2017. Microbiome Helper: a Custom and Streamlined Workflow for Microbiome Research. *mSystems*, 2(1), pp.e00127-16. Available at: <http://msystems.asm.org/lookup/doi/10.1128/mSystems.00127-16>.
- Fierer, N. & Jackson, J., 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), p.4117. Available at: <http://aem.asm.org/content/71/7/4117.short>.
- Pastrik, R.-H. & Rainey, F., 1999. Identification and Differentiation of *Clavibacter michiganensis* Subspecies by Polymerase Chain Reaction-based Techniques. *Journal of Phytopathology*, 147, pp.687–693.
- Quast, C. et al., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), pp.D590-6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3531112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 10, 2014].