

## MAITRISE DU FLETRISSEMENT BACTERIEN EN CULTURE DE TOMATE HORS SOL

### **ACTIVITE BACTERICIDE DES U.V.c VIS à VIS de *R. solanacearum***

//////  
Durée : décembre 2004 - juillet 2005

Code essai : 12 E 06

Auteurs : Arianna CARIGLIA (ARMEFLHOR) – Philippe PRIOR (INRA-CIRAD) - Olivier PRUVOST (CIRAD) – Jean - Jacques CHERON (CIRAD) - Anne CAPY (ARMEFLHOR) - Isabelle CABEU (ARMEFLHOR) - Bernard Narinsamy (ARMEFLHOR) - Frédéric CHIROLEU (CIRAD) - Jaques VESLOT (CIRAD)

Partenaires : CIRAD - SPV - FDGDON - Université de la Réunion - Chambre d'Agriculture  
/////

## **A -CADRE GENERAL DE L'ETUDE**

A la Réunion, le développement du flétrissement bactérien est un facteur limitant reconnu de la culture de tomate en plein champ. Toutefois, comme en plein champ, une contamination des plants cultivés sous serres en hors sol reste possible, car la bactérie peut être transmise par l'eau.

L'eau est un facteur clé pour la dissémination de la bactérie : les cultures sont fréquemment attaquées suite à la modification des sources d'approvisionnement en eau. A la Réunion ceci se produit notamment après des ruptures d'alimentation en raison d'accidents climatiques, (fortes pluies ou cyclone). De plus la dissémination risque d'être plus importante à la suite des travaux de basculement des eaux de l'Est, ou la bactérie est présente, vers l'Ouest.

Le rôle de l'eau dans la dissémination *R.solanacearum* a été montré par différentes études menées en différents pays. Certaines ont révélé la capacité de conservation de *R. solanacearum* dans différents types d'eaux (Poussier, 2000) d'autres ont montré que la présence dans les eaux de surface est strictement corrélées à la présence de boue. *R. solanacearum* est donc présent dans des eaux riches en matières organiques au sein desquelles elle est capable de survivre pendant plusieurs semaines (Janse, 1996 ; Janse et al., 1998). En Europe du Nord-ouest, certains plants adventices présents au bord des cours d'eaux, sont considérés comme des réservoirs d'inoculum pouvant assurer la survie et la multiplication du pathogène. (Elphinstone, 1996 ; Janse, 1996 ; Hayward et al., 1998 ; Farag et al., 1999 ; Expert, 2000). Des plants flétris peuvent être à l'origine d'une contamination du sol et ce sol contaminé est susceptible de contaminer l'eau. L'accumulation des eaux contaminées dans le sol peut conduire à l'intensification de la maladie.

En raison de la difficulté qu'il y a à détecter la bactérie dans l'eau d'irrigation, qui provient de source d'approvisionnement communes ou de retenues collinaires ou bassins, à l'heure actuelle il n'existe aucune information officielle et précise concernant la présence et la quantité de *R. solanacearum* dans l'eau d'irrigation à la Réunion. Une décontamination efficace de l'eau comme moyen prophylactique est donc nécessaire pour éviter toute introduction dans une serre par les apports d'irrigation. Les techniques de désinfections utilisées pour la désinfection du drainage dans les cultures en hors sol en circuit fermé peuvent être appliquées à l'eau d'irrigation. Parmi elles une des méthodes physiques la plus employée est la désinfection par rayons ultraviolets.

## **B –OBJECTIF**

Ce projet a comme objectif la mise au point de techniques culturales qui permettent de maintenir les serres de production exemptes de *R. solanacearum*, mais aussi de maîtriser le problème en cas d'introduction. Il prévoit plusieurs actions sur une période de trois ans.

Dans cette étude l'objectif est d'évaluer l'efficacité de la désinfection de l'eau d'irrigation et de drainage contaminée par *R. solanacearum* par des rayons UVc d'une lampe germicide. Il s'agit donc d'identifier le pouvoir germicide d'un stérilisateur à ultra-violet sur une population bactérienne à différentes concentrations dans l'eau d'irrigation et de drainage.

## C- MATERIEL ET METHODES

L'expérimentation s'est déroulée au laboratoire de microbiologie du Pôle de Protection de Plantes et dans la serre expérimentale.

### 1. Facteur étudié

Le facteur étudié est le « **pouvoir germicide** » d'un stérilisateur à Ultra-Violet sur une population bactérienne de *R. solanacearum*

### 2. Protocole expérimental

#### 2.1. Dispositif

- *Modalités* :
  - Deux souches bactériennes : biovar 2 race 3 (phylotype II) ; biovar 3 race 1 (phylotype I)
  - 3 doses d'inoculation :  $10^3$  ;  $10^5$  ;  $10^7$  ufc/ml ; témoin (eau)
  - 2 types d'eau: eau d'apport ; eau de drainage
  - 4 doses germicides : 60 mJ/cm<sup>2</sup> ; 120 mJ/cm<sup>2</sup> ; 240 mJ/cm<sup>2</sup> ; 360 mJ/cm<sup>2</sup>
- *répétitions* : 3

#### 2.2 Contamination de l'eau

##### 2.2.1 Type d'eau

Deux types d'eau sont utilisés.

- L'eau d'irrigation qui est filtrée à travers un filtre à sable puis un filtre à tamis (100µ); ensuite stockée dans une citerne de 6m<sup>3</sup> et filtrée à nouveau à la sortie par deux filtres à tamis (130µ et 80 µ).
- L'eau de drainage qui est un mélange de 50% drainage issue d'une culture hors sol de tomate sur la fibre de coco (eau + solution nutritive + résidus de substrat) et de 50% d'eau d'apport.

##### 2.2.2 Souches bactériennes de *R. solanacearum*

Les souches bactériennes utilisées pour la contamination sont la JT 516 appartenant au Phylotype II (biovar 2 race 3) et la JT 519 appartenant au Phylotype I (biovar 3 race 1), souches présentes naturellement à la Réunion.

##### 2.2.3 La suspension bactérienne

Pour chaque inoculation une suspension bactérienne de 70 l est préparée. Pour l'eau d'irrigation la suspension est réalisée à 3 concentrations bactériennes différentes : faible ( $10^3$  ufc/ml), moyenne ( $10^5$  ufc/ml) et forte ( $10^7$  ufc/ml). Par contre, pour l'eau de drainage seule la concentration bactérienne la plus forte de  $10^7$  ufc/ml est testée.

#### 2.3 La désinfection par irradiation aux rayons ultra violets (UV)

##### 2.3.1 Le fonctionnement des lampes UVc

Le principe base de la désinfection par irradiation aux rayons ultraviolets (UV), consiste à générer des rayons UVc au sein d'une chambre d'irradiation (longueur d'onde comprise entre 250-270nm), possédant un fort pouvoir désinfectant. Les rayons irradient les cellules des organismes vivantes contenus dans l'eau traversant l'appareil. Les organismes pathogènes sont donc inactivés ou détruits. La dose d'exposition (mJ/cm<sup>2</sup>) à appliquer est fonction des agents pathogènes présents dans l'eau ou dans la solution de drainage. Suivant la quantité d'énergie UV reçue, la cellule vivante sera soit stérilisée (effet bactériostatique) soit détruite (effet bactéricide).

### 2.3.2 Passage de l'eau contaminée à travers le système UV

Un local a été équipé de deux stérilisateur, chacun ayant un pouvoir germicide de 60 mJ/cm<sup>2</sup>. Leurs caractéristiques techniques sont décrites dans le tableau 1. Ils sont montés en série pour obtenir une dose totale de 120 mJ/cm<sup>2</sup>. Afin d'évaluer le pouvoir germicide à doses plus élevées (240 mJ/cm<sup>2</sup> et 360 mJ/cm<sup>2</sup>) l'eau est récupérée après le passage à 120 mJ/cm<sup>2</sup>, collectée et réinjectée à travers les lampes comme le montre le schéma figure1. Nous avons donc effectué différents passages de l'eau contaminée à travers le système de désinfection aux U.V pour obtenir quatre valeurs de pouvoir germicide et évaluer leur efficacité respective :

- 1) à 60 m J/cm<sup>2</sup> (passage à travers la 1<sup>ère</sup> lampe)
- 2) à 120 mJ/cm<sup>2</sup> (passage à travers la 2<sup>ème</sup> lampe)
- 3) à 240 mJ/cm<sup>2</sup> (3<sup>ème</sup> passage à travers les deux lampes)
- 4) à 360 mJ/cm<sup>2</sup> (4<sup>ème</sup> passage à travers les deux lampes)

Un surpresseur (3m<sup>3</sup>/h) permet d'envoyer l'eau contaminée depuis le réservoir de 70 l vers le système désinfectant après passage par deux filtres à tamis (130μ et 80 μ). Pour vérifier l'absence de contamination le dispositif expérimental a comporté deux témoins négatifs : eau non inoculée avant et après passage à travers les lampes et un témoin positif, eau inoculée non désinfectée. Afin d'éviter toute interaction entre les modalités, le système est désinfecté au chlore et rincé à l'eau claire avant toute nouvelle opération. Le système est équipé d'un manomètre pour pouvoir maintenir une pression d'eau constante de 2 bars.

Tableau 1 : Caractéristiques des stérilisateur UV  
Série UVPS IBP 10HO (Fournisseur : ECR Réunion)

Réacteurs inox
Longueur d'onde de 254 nm
Dose germicide UV=60 mJ/cm <sup>2</sup>
Transmission 98% sur 10 mm, débit de pointe horaire 4.8 m <sup>3</sup> /h
Lampe basse pression puissance : 75W



Figure 1 : Système de lampes UVc

### 2.4 Variables mesurées

#### a) Croissance bactérienne : comptage des colonies

Dans le but d'estimer l'évolution du développement de la population bactérienne suite au rayonnement, des échantillons de 1l sont prélevés après chaque passage afin d'évaluer l'efficacité désinfectante des stérilisateur et de quantifier la présence de la bactérie. Chaque échantillon est analysé immédiatement (J<sub>0</sub>) puis après trois (J+3) et sept jours (J+7) en laboratoire.

#### b) Pouvoir pathogène

Ce test consiste à inoculer une culture bactérienne à la plante-hôte dans le but de reproduire les symptômes typiques de la maladie. Les échantillons d'eau contaminée à 10<sup>7</sup> ufc/ml et désinfectés aux UVc sont utilisés pour vérifier son pouvoir pathogène. Après sept jours (J+7), une autre vérification du pouvoir pathogène est réalisée. Les plants de tomate (variété ROMA VF) sont trempés dans les différents échantillons d'eau d'irrigation et/ou d'eau de drainage correspondant à la dose UVc appliqué (à 60 mJ/cm<sup>2</sup>, 120 mJ/cm<sup>2</sup>, 240 mJ/cm<sup>2</sup> et à 360 mJ/cm<sup>2</sup>). Le pouvoir pathogène a aussi été réalisé pour les trois échantillons témoins : les deux positifs (eau non inoculée avant et après passage à 120mJ/cm<sup>2</sup>) et le témoin négatif (suspension bactérienne non désinfectée). Le taux de flétrissement a été calculé en utilisant un indice de maladie qui tient compte de l'ensemble du nombre de plants flétris et des infections latentes révélées après analyse bactériologique des plants qui ne présentaient pas de symptômes.

### c) Evaluation due l'état viable non cultivable (VNC)

*R.solanacearum* peut exister dans la nature dans en état viable mais non cultivable. Cet état permet à la bactérie de rester viable mais incapable de se multiplier. Les conditions qui induisent ce type d'état sont de nature différente et dépendent du type de bactérie : stress osmotique, changements de température, présence de métaux lourds etc. Dans certains cas, la bactérie peut restaurer son état normal et redevenir capable de se multiplier et être pathogène.

L'étude de l'état VNC n'est réalisée que pour les échantillons des deux souches à  $10^7$ UFC/ml. De plus, à chaque manipulation à J0 et J+7, le nombre de bactéries en état VNC est évalué sur un échantillon d'eau d'irrigation (témoin) sans inoculation avant et après passage.

## D. Résultats et Discussion

### 1.1 Efficacité des différentes doses germicides sur la population bactérienne

#### 1.1.1 Eau d'apport

- *Concentration bactérienne de  $10^3$  UFC/ml*

Les rayons ultraviolets sont efficaces à partir d'une dose germicide de 60 mJ/cm<sup>2</sup> avec une eau d'apport chargée à la concentration bactérienne de  $10^3$ UFC/ml et cela quelle que soit la souche utilisée pour l'inoculation (Figure 2).

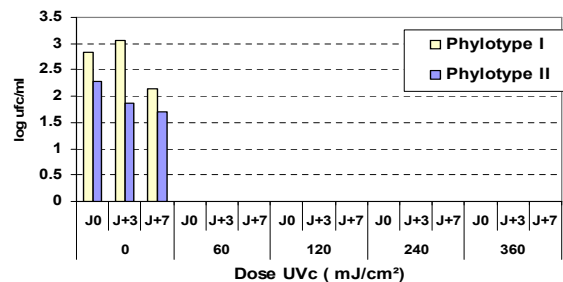


Figure 2 : Niveau moyen de population bactérienne dans l'eau d'apport chargée à la concentration bactérienne  $10^3$  ufc/ml après désinfection aux UVc (doses germicides UV : 0, 60, 120, 240, 360 mJ/cm<sup>2</sup>), mesuré immédiatement (J0) puis 3 (J+3) et 7 jours après (J+7)

- *Concentration bactérienne de  $10^5$  UFC/ml*

En ce qui concerne la population bactérienne à la concentration de  $10^5$ UFC/ml dans l'eau d'apport, elle subit une forte réduction de concentration après le passage à travers le stérilisateur, comme le montre la figure 3. Il est intéressant de noter une meilleure efficacité de désinfection pour le Phylotype II. En effet, pour le Phylotype I, malgré la forte dose bactéricide (360 mJ/cm<sup>2</sup>), les analyses faite à J+3 et J+7 montrent que le risque d'un passage de quelques bactéries capables de se multiplier, même 7 jours après passage, existe. Le rayonnement UV a un effet sur l'ADN, l'acide nucléique et les enzymes. L'action stérilisante, est due à la perturbation apportée par le rayonnement ultraviolet dans la structure chimique des constituants de la cellule vivante, et par suite, de leur fonctionnement. Les organismes pathogènes sont donc inactivés ou détruits. La différence de croissance bactérienne que nous avons observée entre les deux souches pourrait être attribuée à une divergence dans les mécanismes réparateurs qui interviennent lorsque l'ADN est endommagé par les rayons ultraviolets. Ce processus se traduit dans une meilleure résistance et capacité de survie du Phylotype I. Ce résultat nous suggère que telle dose d'exposition appliquée ne permet pas la destruction totale (effet bactéricide).

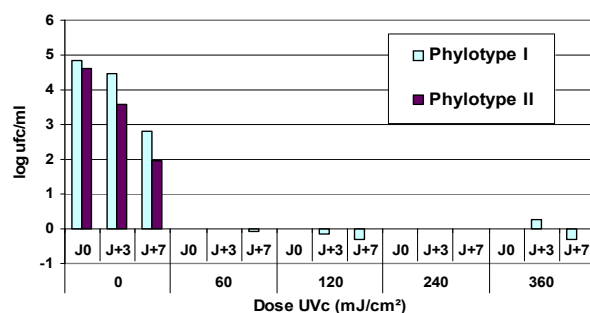


Figure 3 : Niveau moyen de population bactérienne dans l'eau d'apport chargée à la concentration bactérienne  $10^5$  ufc/ml après désinfection aux UVc (doses germicides UV : 0, 60, 120, 240, 360 mJ/cm<sup>2</sup>), mesuré immédiatement (J0) puis 3 (J+3) et 7 jours après (J+7)

• *Concentration bactérienne de  $10^7$  UFC/ml*

Quand nous avons analysé l'effet germicide des UVc sur de l'eau d'irrigation contaminée avec une concentration bactérienne très élevée de  $10^7$ UFC/ml, nous observons aussi une forte diminution de la charge bactérienne. Comme nous avons décrit précédemment, nous constatons un effet plus important sur le Phylotype II. Mais dans ce cas l'efficacité des lampes UVc est fortement réduite. En effet, malgré la forte dose germicide (240, 360 mJ/cm<sup>2</sup>) la population bactérienne reste en quantité considérable dans l'eau (quantité de l'ordre de une unité logarithmique). (Figure 4)

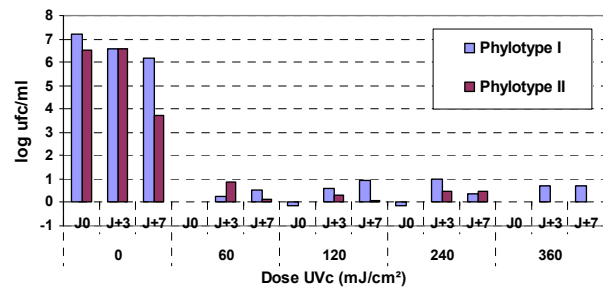


Figure 4 : Niveau moyen de population bactérienne dans l'eau d'apport chargée à la concentration bactérienne  $10^7$  ufc/ml après désinfection aux UVc (doses germicides UV : 0, 60, 120, 240, 360 mJ/cm<sup>2</sup>), mesuré immédiatement (J0) puis 3 (J+3) et 7 jours après (J+7)

### 1.1.2 Eau de drainage

Comme pour l'eau d'apport, l'effet désinfectant des rayons UVc sur l'eau de drainage contaminée à une concentration de  $10^7$ UFC/ml est visible (Figure 5). Contrairement à ce que nous avons constaté dans le cas précédent l'effet est plus élevé pour le Phylotype I. L'explication que nous pouvons avancer est que l'eau de drainage utilisée pour cette dernière inoculation était fortement trouble et chargée en matière organique puisque issue d'une culture de tomate qui venait d'être plantée sur fibre de coco. L'efficacité de rayons ultraviolets est fortement compromise lorsque la turbidité de l'eau augmente puisque la transmittance diminue.

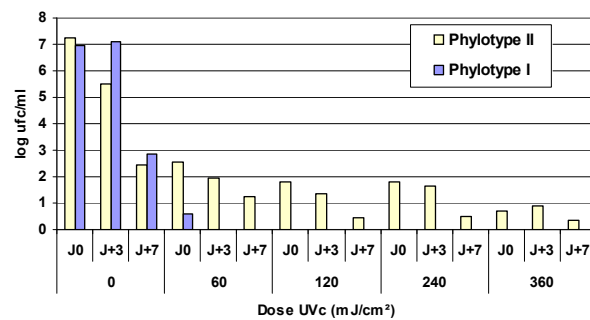


Figure 5 : Niveau moyen de population bactérienne dans l'eau de drainage chargée à la concentration bactérienne  $10^7$  ufc/ml après désinfection aux UVc (doses germicides UV : 0, 60, 120, 240, 360 mJ/cm<sup>2</sup>), mesuré immédiatement (J0) puis 3 (J+3) et 7 jours après (J+7)

### 1.2 Evaluation du pouvoir pathogène

L'évaluation du pouvoir pathogène confirme les résultats obtenus précédemment avec les analyses bactériologiques des eaux d'apport et de drainage après le passage à travers les stériliseurs. Nous pouvons remarquer un pouvoir germicide des lampes sur une charge bactérienne élevée. Cependant, le nombre de plants flétris et la présence de la bactérie dans des plants non flétris à la fin de la période d'observation, mettent en évidence un taux de flétrissement considérable à la dose germicide de 60 mJ/cm<sup>2</sup>, même sept jours après la désinfection dans le cas de l'eau d'apport (47.50%). De plus, malgré un passage à des doses germicides plus élevées, les plants restent susceptibles d'être contaminés même après sept jours (240 mJ/cm<sup>2</sup> J+7 : 5% ; 360 mJ/cm<sup>2</sup> à J<sub>0</sub> : 15%), et ceci de façon plus évidente pour le Phylotype I. (Figure 6)

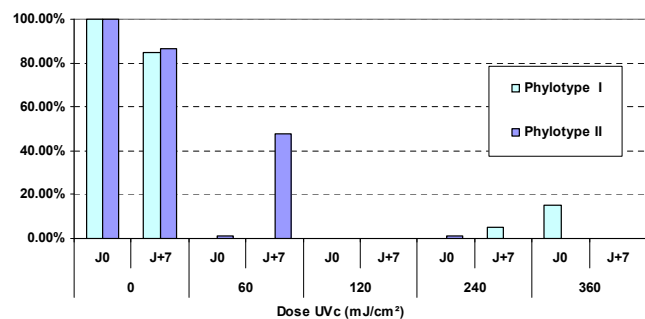


Figure 6 : Pourcentage de plants flétris. A partir de plants sains inoculés avec l'eau d'apport chargée à la concentration bactérienne  $10^7$  ufc/ml après désinfection aux UVc (doses germicides UV : 0, 60, 120, 240, 360 mJ/cm<sup>2</sup>), mesuré immédiatement (J0) puis 3 (J+3) et 7 jours après (J+7)

Par contre, le taux de flétrissement des plants inoculés avec le Phylotype II reste élevé même pour les plants inoculés avec l'eau de drainage qui a subi un passage à fortes doses germicides (240 mJ/cm<sup>2</sup>, 360 mJ/cm<sup>2</sup>), (Figure 7). Ceci confirme le résultat précédent. En effet si l'eau de drainage est très colorée, l'efficacité des UV est réduite et la charge bactérienne reste importante et toujours pathogène, même avec de l'eau conservée pendant sept jours. Cela expliquerait aussi la différence de pourcentage de plants flétris entre les Phylotype I et II. En effet, des contraintes d'expérimentation nous ont obligé à prélever le drainage en deux temps. L'eau contaminée avec le Phylotype I était une eau de drainage plus claire, prélevée en fin de culture. L'eau contaminée avec le Phylotype II a été prélevée en début de culture, plus chargée en fibre de coco°

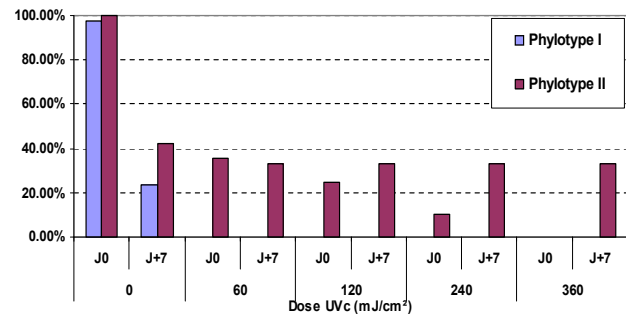
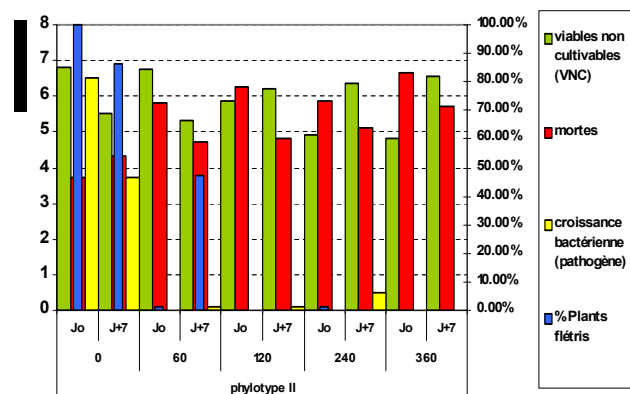
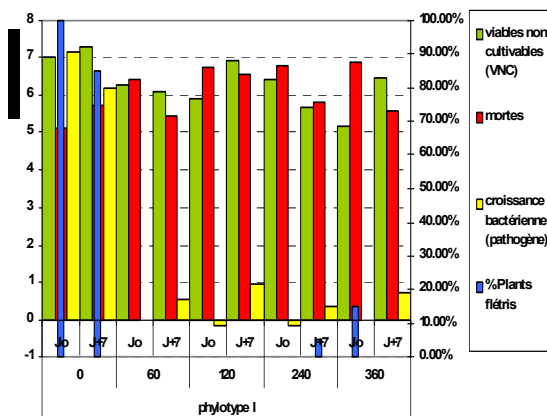


Figure 7: Pourcentage de plants flétris. Inoculation avec l'eau de drainage chargée à la concentration bactérienne 10<sup>7</sup> ufc/ml après désinfection aux UVc (doses germicides UV : 0,60,120,240, 360 mJ/cm<sup>2</sup>), mesuré immédiatement (J0) puis 3 (J+3) et 7 jours après (J+7)

## 1.2 Evaluation de l'état viable non cultivable (VNC)

L'étude de l'état VNC montre que la possibilité de conversion *R. solanacearum* en état viable mais non cultivable existe. En effet le nombre de bactéries VNC comptées reste relativement équivalent à la suspension de départ, même après passage à travers les rayons ultraviolet (10<sup>7</sup> ufc/ml) et il est également constant après sept jours. L'évaluation de la croissance bactérienne a montré que, malgré la forte dose germicide (240, 360 mJ/cm<sup>2</sup>), la population bactérienne reste en quantité considérable dans l'eau. Cela indique que les bactéries ne sont pas toutes complètement détruites, elles restent viables. Donc suite au rayonnement les bactéries sont endommagées par les UV, elles subissent un stress. Parmi les stressées il y a une fraction qui évolue vers la mort, certaines qui restent viables et pathogènes et, enfin la majorité qui bascule en état VNC et qui est capable de ressusciter et reprendre son activité. Ceci semble être lié à la présence d'exsudats racinaires de certains plants. (Figures 8 et 9)



Figures 8 et 9 : Effet des UV (Doses germicides: 0 ;60 ;120 ;240 ;360 mJ/cm<sup>2</sup>) sur la population de *R. solanacearum* (Phylotypes I et II) dans l'eau à jour 0 (J0) et après 7 jours (J+7).



## E - Conclusion et perspectives

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité désinfectante des stérilisateurs UVc sur une eau d'irrigation contaminée par *R. solanacearum*. Afin de recommander des mesures prophylactiques qui permettraient de maintenir des serres exemptes de *R. solanacearum* ou réduire les possibilités d'introduction de la bactérie par l'eau d'irrigation, nous avons cherché à définir une dose germicide applicable en situation réelle d'exploitation agricole. Dans ces travaux nous avons considéré aussi la possibilité de désinfecter l'eau de drainage. En effet le recyclage des eaux en culture hors sol sera nécessaire pour respecter la réglementation.

Après désinfection la croissance bactérienne dans de l'eau contaminée à trois concentrations, une faible à  $10^3$  ufc/ml, une moyenne  $10^5$  ufc/ml et une forte  $10^7$  ufc/ml, a été étudiée. Les résultats montrent que l'efficacité de lampes UV pour la désinfection de l'eau d'apport est fonction de la charge bactérienne et de la souche. En effet à concentration bactérienne relativement « faible » ( $10^3$  ufc/ml) les lampes UV sont efficaces à partir de  $60 \text{ mJ/cm}^2$ , à concentration bactérienne  $10^5$  ufc/ml l'efficacité est quasi-totale. Le passage de quelques bactéries dans l'eau reste une éventualité même après une dose germicide élevée. Par contre pour la concentration bactérienne plus élevée ( $10^7$  ufc/ml) l'efficacité est réduite. En effet l'évaluation du VNC (« état viable non cultivable ») confirme que, sur une fraction de la population bactérienne les UV ont une action bactériostatique, qui permet à la cellule de continuer à vivre, mais sans avoir la possibilité de se reproduire, toutefois une autre fraction reste viable et pathogène. La population bactérienne qui est en état VNC peut restaurer son état normal et redevenir capable de se multiplier et être pathogène. Cet aspect pose la question de la « durabilité » de la désinfection aux UV. L'influence du rayonnement UVc sur passage de *R. solanacearum* de VNC à pathogène est un sujet qui mériterait d'être approfondi.

Pour ce qui concerne la désinfection de l'eau de drainage l'efficacité des lampes est fonction de la turbidité et de la coloration du drainage. En effet nous avons constaté que quand un drainage est « coloré » ou trouble, même après passage à travers les filtres, l'efficacité est fortement compromise. Ces résultats ont été confirmés par le taux de flétrissement enregistré pour le même traitement.

Il est donc recommandé de ne pas réutiliser l'eau de drainage en début de culture dans un substrat comme la fibre de coco et en dans tous les cas de mélanger l'eau de drainage avec de l'eau claire avant passage aux UV.

On peut conclure à la suite de cet essai que les UV sont efficaces pour contrôler la bactérie dans certaines conditions. En effet, il semble assez clair que ce système de désinfection utilisé comme seul moyen de contrôle de la bactérie a des limites qui sont liées au type de lampe utilisée, au système de culture (la puissance des lampes est limitée par le débit), au Phylotype de la bactérie présent, à l'état VNC et bien sûr à la charge bactérienne dans l'eau d'apport. La combinaison de deux méthodes de désinfection pourrait apporter une efficacité plus renforcée.

Afin de pouvoir faire un choix ciblé sur la dose UV germicide la plus appropriée nous aurions besoin de connaître quelle est la gamme des concentrations bactériennes présentes naturellement dans l'eau d'irrigation et mais aussi si elles varient d'une saison à l'autre. Le fait d'avoir pris en considération ces trois concentrations différentes nous a permis d'avoir une idée de la réduction de la charge bactérienne que nous pouvons obtenir tout en sachant qu'une concentration de  $10^5$  ufc/ml est une charge déjà très forte mais pas impossible à atteindre en condition fortement contaminante.

Sur la base de ces résultats la prochaine étape consiste à vérifier en condition de culture si une désinfection de l'eau d'apport en préventif peut être efficace pour prévenir ou réduire le développement du flétrissement bactérien en cas de contamination accidentelle.