

**AFPP –CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**ESSAI DE CULTURE ET DE PRODUCTION DU CHAMPIGNON ENTOMOPATHOGENE *BEAUVERIA
BASSIANA* SUR LACTOSERUM, GRIGNON D'OLIVES ET MARGINES**

N. CHAHBAR, F. HALOUANE, S. DRAI et S. KEBOUR

Département de Biologie, Faculté des sciences, Université M'hamed Bougara Boumerdes, 35 000
Avenue de l'indépendance, Boumerdes
chahbar_nora@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Les microorganismes entomopathogènes occupent une place importante parmi les méthodes alternatives de lutte contre les insectes ravageurs. En Algérie les premières études menées sur le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* comme agent de lutte biologique, ont été faites par Chahbar en 1996 et Halouane en 1997. Il peut être utilisé contre différents insectes ravageurs. Pour l'utilisation étendue de ce bio-insecticide, une production de biomasse importante est nécessaire par des techniques simples et peu coûteuses, en utilisant des sous-produits de l'industrie agroalimentaire. Une étude est menée au laboratoire sur la production de biomasse de *Beauveria bassiana* sur des substrats organiques, à savoir le lactosérum, les margines et les grignons d'olives. Notre étude a révélé une très bonne croissance du mycélium sur le lactosérum brut, une croissance non négligeable sur la margine et un taux de sporulation important sur les grignons d'olives, ainsi qu'un rendement en biomasse considérable sur lactosérum déprotéiné, évalué à 5,56g/Litre de substrat.

Mots-clés : *Beauveria bassiana*, entomopathogène, le lactosérum, les margines, les grignons d'olives.

ABSTRACT

Entomopathogenic microorganisms play an important role among alternative control methods against insect pests. In Algeria the first studies on the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent, were made by Chahbarin 1996 Halouane in 1997. It can be used against various insect pests, and the effectiveness of its mode of action is him a bio-insecticide par excellence. To the extensive use of this bio-insecticide, high biomass production is needed by simple and inexpensive techniques, using by-products of the food industry. A study is being conducted in the laboratory on biomass production of *Beauveria bassiana* on organic substrates, namely whey, vegetable water and olive pomace. Our study revealed a very good mycelial growth on raw whey, and a significant growth in the vegetable and a high rate of sporulation on olive pomace. And obtaining a considerable biomass yield on deproteinized whey valued at 5,56g / liter of substrate.

Keywords: *Beauveria bassiana*, entomopathogenic, whey, vegetable water, olive pomace.

INTRODUCTION

Les microorganismes entomopathogènes occupant une place importante parmi les méthodes alternatives de lutte contre les insectes ravageurs à cause des problèmes environnementaux majeurs tels que, la pollution des écosystèmes et surtout la résistance de nombreux insectes aux pesticides chimiques (Lydie, 2010). L'acuité et la nécessité de trouver des alternatives de lutte efficace contre les insectes nuisibles autres que la lutte chimique, nous ont poussés à explorer de nouvelles avenues avec le microchampignon entomopathogène *Beauveria bassiana*.

En Algérie les premières études menées sur le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* comme agent de lutte biologique, sont faites par Chahbar (1996), Halouane (1997) et Bissaad (2011). Plusieurs études ont démontré son potentiel insecticide ; il peut être utilisé contre différents insectes ravageurs appartenant à plusieurs ordres (Sabbahiet *al.*, 2008). Pour l'utilisation de ce bioinsecticide, une production importante de sa biomasse est nécessaire, en utilisant des techniques simples et peu coûteuses.

Les industries agricoles et alimentaires engendrent des quantités appréciables de sous-produits, qui sont pour la plupart peu ou pas valorisés et dont le rejet dans la nature constitue une menace pour l'environnement, néanmoins ils peuvent être utilisés à des fins biotechnologiques. A cet effet, notre étude est basée sur l'utilisation des résidus agroindustriels comme substrat pour la culture du champignon dans le but d'obtenir un rendement en biomasse important. L'étude a porté sur la croissance linéaire de *Beauveria bassiana* sur différents milieux naturels issus de l'industrie agroalimentaire qui sont le lactosérum brut, les margines et les grignons d'olives et le suivi de la cinétique de croissance de *B. bassiana* par une fermentation en batch sur le lactosérum déprotéiné.

I- MATERIEL ET MÉTHODE

1- Les milieux de cultures naturels (les résidus agroindustriels)

Nous avons utilisé des milieux de cultures naturels issus des rejets agroindustriels. La croissance mycélienne de la souche fongique de *Beauveria bassiana* a été menée sur lactosérum et grignons d'olives.

2- La souche fongique

Le champignon *Beauveria bassiana* isolé à partir du sol de la région de Chréa de la wilaya de Blida. Il a été identifié dans le laboratoire de biotechnologie Microbienne de la Faculté des Sciences de l'université de Boumerdes.

3- Caractérisation physico-chimiques des trois milieux de culture utilisés

La réalisation des tests physico-chimiques diffère d'un milieu à un autre, selon leurs compositions et leurs natures (liquide ou solide). La détermination de la teneur en eau, la mesure du pH, la détermination de l'acidité titrable et la détermination de la teneur en cendre sont réalisées par des méthodes décrites par Gaudet et Kowalski (2002). Le dosage du lactose (méthode de Balgolt in Boutaoua, 1992), le dosage calométrique des protéines (méthode de Biuret in Chevillon et al., 1998). Détermination de la matière grasse (méthode de Gerber in AFNOR, 1986) Dosage des sucres totaux (Dubois et al., 1956).

4- Revivification de la souche

Pour assurer la pureté de la souche de *Beauveria bassiana*, des repiquages sont effectués périodiquement (tous les 7 jours) sur le milieu OGA et Sabouraud à partir des boîtes déjà ensemencées.

5- Etude de la croissance mycélienne du champignon *B. bassiana*

La croissance linéaire de *B. bassiana* a été mesurée par culture sur deux milieux gélosés à base des résidus agroindustriels, le lactosérum et les margines. Nous avons utilisé le milieu PDA comme milieu témoin.

6- Etude de la sporulation

A partir d'une boîte de Pétriensemencée avec le champignon sur le milieu OGA, prélever à l'aide d'une anse de platine, la partie poudreuse du mycélium, puis la déposer de manière homogène sur l'ensemble de la boîte de Pétri contenant la poudre de grignons d'olives.

7- Production de la biomasse du *B. bassiana*

Nous avons réalisé pour cette étude la fermentation discontinue, dans un fermenteur de type Minifor d'une capacité totale de 2,5L. La détermination de la biomasse produite lors de la fermentation nous permet d'évaluer des paramètres spécifiques, comme la vitesse de croissance et le taux de production de métabolites. La biomasse (la concentration cellulaire) des échantillons prélevés du moût de fermentation est évaluée par comptage des spores produites sur cellule de Malassez, le nombre des échantillons prélevés est de 06.

II- RESULTATS

1- Caractères physicochimiques des trois milieux de culture utilisés

Les résultats relatifs aux analyses physicochimiques sont présentés tableau I.

Tableau I- Composition physicochimique des résidus agroindustriels (physico-chemical composition of agro-industrial residues)

Milieu Composition	Lactosérum	Margine	Grignons d'olive
Teneur en eau %	96,2	98,4	47,2
Extrait sec %	3,8	1,6	52,8
pH	5,25	4,50	5,68
Acidité titrable (d°)	13	/	/
Lactose (g/l)	40	/	/
Protéine (g/l)	6	1,65	/
Sucres totaux (g/l)	/	2,09	42,6 (cellulose)
Matière grasse (g/l)	1	120	15,3
Teneur en cendre %	0,6	1,8	4,8

A la lecture du tableau, il ressort que le lactosérum est riche en lactose avec une valeur de 40g/l. La valeur de la matière grasse obtenue est très faible comparativement avec la margine et les grignons d'olive. Les grignons d'olive sont riches en matière grasse et en sucre (cellulose) contenue dans les pulpes d'olive avec une faible teneur en eau.

2- Mesure de la croissance mycélienne (linéaire)

Les résultats de la mesure de la croissance mycélienne de la souche *B. Bassiana* cultivée sur les milieux retenus pour l'étude sont présentés tableau II.

Tableau II- Evolution de la croissance linéaire de *B. bassiana* en cm (Evolution of the lineargrowth of *B. bassiana* in cm)

Temps	Milieu	PDA	Lactosérum	Margine
0		0	0	0
3		0.55	0.27	0.10
6		1.37	1.27	0.22
9		1.80	3.35	0.57
12		2.45	3.50	1.05
15		3.30	3.50	2.07

Le développement du champignon dans les différents milieux nécessite la présence d'une source de carbone. Sur les marges, nous avons noté un développement lent qui s'est amélioré au bout du 9^{ème} jour. IL faut attendre les 15 jours de culture pour atteindre une croissance linéaire de 2 cm. Le mycélium développé sur les marges est moins visible et moins dense avec des ramifications très fines et d'aspect cotonneux.

Sur le lactosérum, nous assistons à une croissance qui a démarré lentement puis elle s'accélère à partir du 3^{ème} jour jusqu'au 15 jour avec un développement du mycélium qui déborde de la boîte de Pétri .

Sur la gélose PDA, on note une croissance stable du champignon qui s'accroît de 0,7 cm chaque 3 jours, pour atteindre son maximum au bout de 15 jours.

3- La sporulation

Les résultats du dénombrement à l'aide de la cellule de Malassez, des spores produites par *B. bassiana* dans 0,1 g de grignons d'olives chaque 72 heures, pendant 15 jours sont présentés dans la figure1.

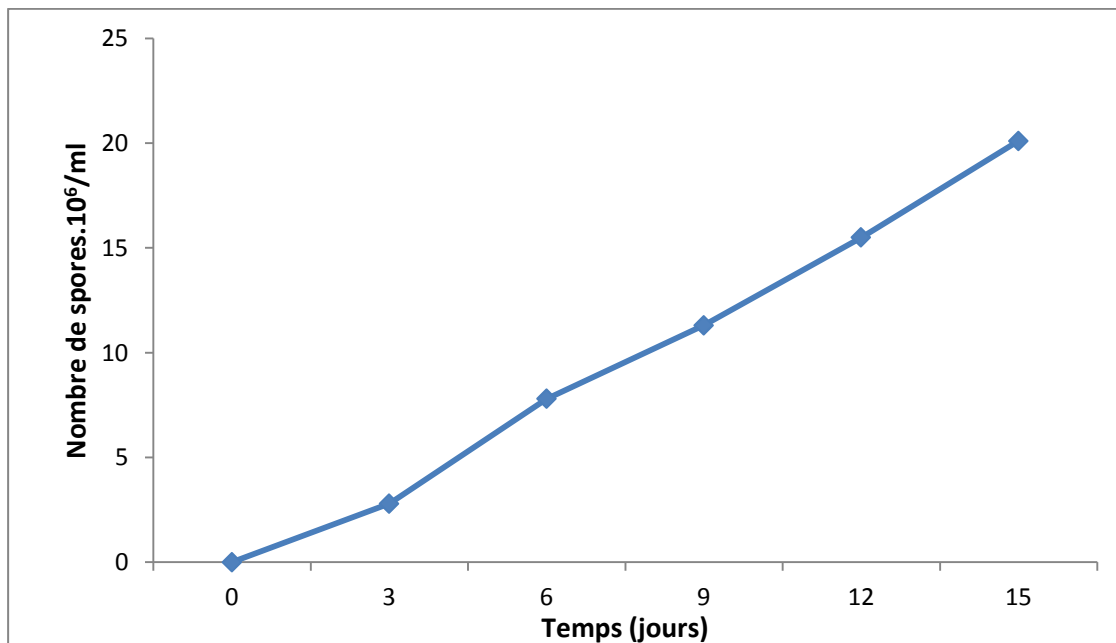


Figure1 : Evolution de la sporulation de *Beauveria bassiana* sur les grignons d'olives (Evolution of sporulation of *B. bassiana* on olive pomace)

Le suivi de la sporulation de *B. bassiana* sur les grignons d'olives durant 15 jours, nous montre une évolution de la production des spores du 1^{er} jour au 15^{ème} jour. Au-delà du 15^{ème} jour la sporulation cesse.

4- Conduite de la fermentation

Nous observons après 9 jours d'incubation de l'inoculum dans l'agitateur incubateur, un trouble important dans le milieu de culture, ainsi que la formation d'un anneau mycélien en haut de l'erlen. La concentration de la préculture est estimée de $5.3.10^7$ spores /ml.

La culture de *B. bassiana* dans le lactosérum déprotéiné durant 15 jours, nous a permis d'observer une formation d'une masse mycélienne au sommet du moût de fermentation de plus en plus dense, de couleur blanche qui vire vers le rose au contact du milieu liquide. De même, une diminution du volume du moût de fermentation avec une production de fragments mycéliens sont notées.

4-1- Evolution du pH

Les résultats relatifs à l'évolution du pH durant 15 jours de la conduite de la fermentation de la souche de *B.bassiana* sur le lactosérum sont représentés sur la figure 2.

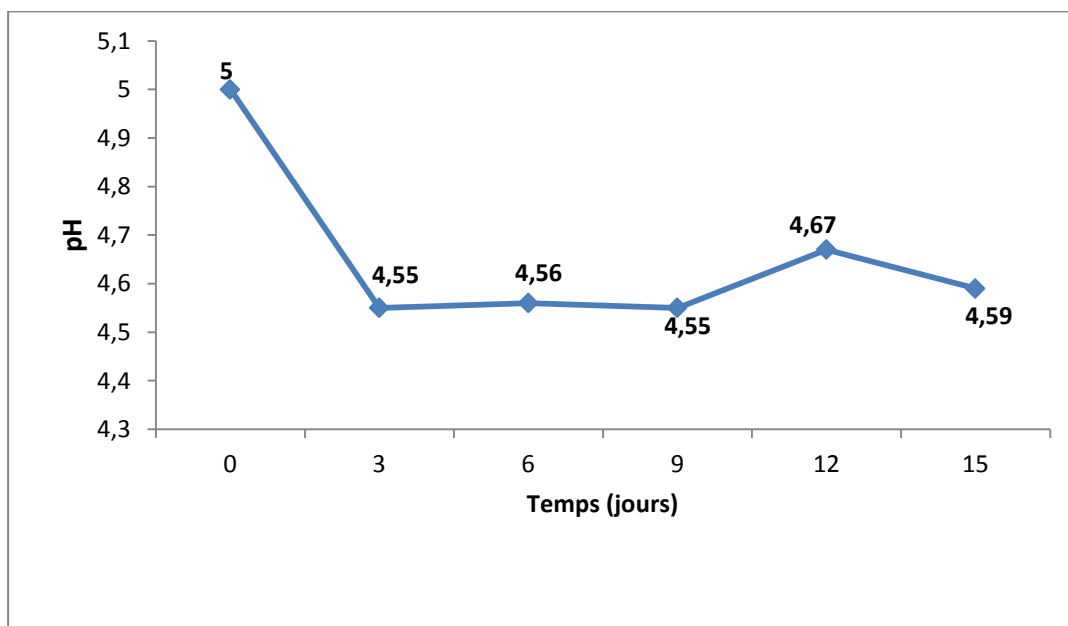


Figure 2 : Evolution du pH au cours de la fermentation discontinue de *B. bassiana* sur lactosérum déprotéiné (Evolution of pH during the batch fermentation of *B. bassiana* on deproteinized whey) .

A la lecture de la figure2, il ressort une diminution du pH de fermentation du 1^{er} au 3^{ème} jour, puis une légère augmentation a été notée entre le 9^{ème} et 12^{ème} jour.

4-2- Dosage des sucres réducteurs

Le suivi de la dégradation des sucres contenus dans le lactosérum est réalisé par le dosage des sucres réducteurs en utilisant la méthode du DNS. Les résultats obtenus sont consignés sur la figure 3.

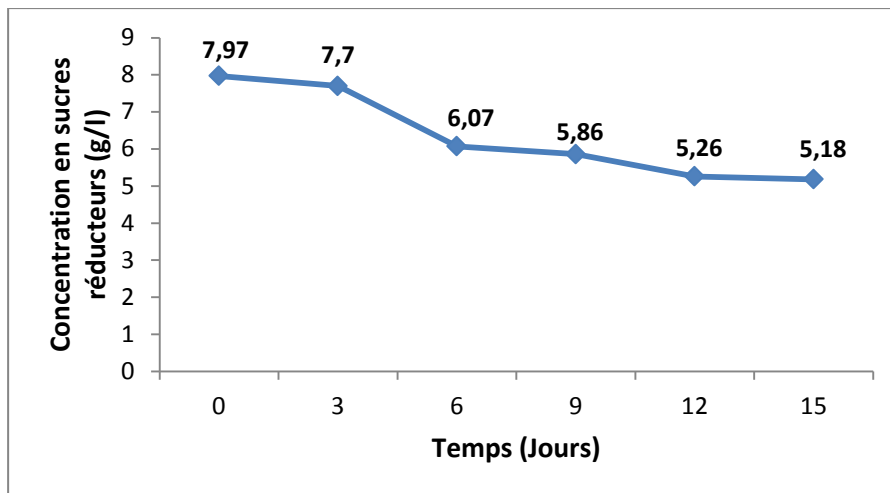


Figure 3 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs (g/l) au cours de la culture discontinue de *B. bassiana* dans le lactosérum déprotéiné (Changes in the concentration of reducing sugars (g / l) during the batch culture of *B. bassiana* in the deproteinizedwhey).

La concentration des sucres réducteurs dans le lactosérum déprotéiné diminue progressivement ce qui explique la consommation de cette source de carbone par le champignon *Beauveria bassiana*. Le taux de sucres consommés par le champignon tout au long de la fermentation a connu des changements. Une diminution de la concentration est notée du 1^{er} au 6^{ème} jour, elle est évaluée à 1,90 g/l, ce qui confirme la consommation de cette source de carbone par *B. Bassiana*.

4-3- Mesure de la biomasse

Les résultats obtenus de la biomasse produite par *B. bassiana* dans le lactosérum déprotéiné est présentée sur la figure 4.

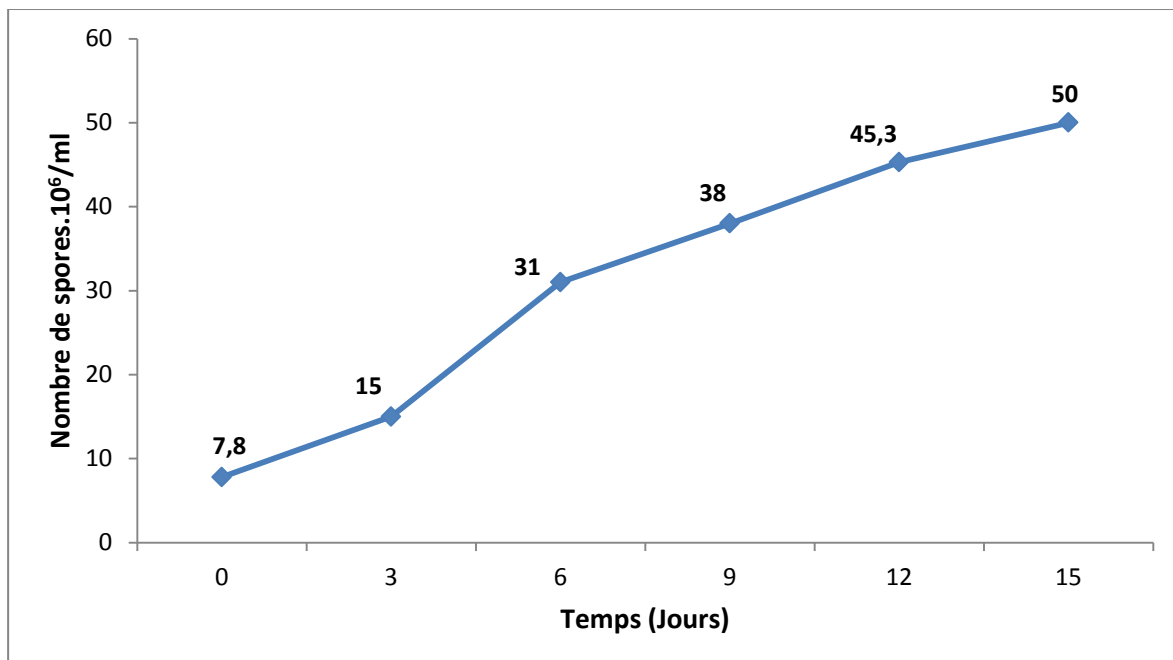


Figure 4 : Evolution de la biomasse au cours de la culture en discontinue de *Beauveria bassiana* sur lactosérum déprotéiné (Evolution of biomass during batch culture *Beauveria bassiana* on deproteinizedwhey).

L'évolution de la biomasse ne cesse d'augmenter pour atteindre 50×10^6 spores / ml au 15^{ème} jour. L'augmentation de la biomasse signifie le développement du champignon (production importante des spores et des hyphes).

III- DISCUSSION

La meilleure croissance du champignon est observée au niveau du lactosérum suivie par le milieu PDA et les margines. Cette succession est due à la nature de la source de carbone contenue dans chaque milieu or le lactosérum contient une teneur considérable en lactose. Cette molécule est composée de galactose et de glucose, facilement dégradable par la B-galactosidase sécrétée par *B. bassiana* (Halouane, 1997). Contrairement aux margines qui contiennent différents glucides complexes qui sont le raffinose, la cellulose et la pectine (Tsioulpaset *al.*, 2002). Le Milieu PDA contient deux sources de carbone à savoir l'amidon et le glucose qui est favorable pour la croissance du champignon.

La diminution du pH peut être tributaire de l'excrétion ou la synthèse des produits acides issus du métabolisme des éléments nutritifs qui rentrent dans la composition du milieu de culture utilisé (Lactosérum déprotéiné) notamment les sources de carbone telles que les sucres. Dans la majorité des fermentations industrielles, la formation de CO₂ et d'acides organiques acidifie le milieu (Simon et Meunier, 1970). Par contre l'augmentation du pH peut être traduite par la production par *B. Bassianades* métabolites basiques comme l'ammoniac qui neutralise l'acidité du milieu. Ce résultat est déjà signalé par Bidochka et Khchatourians (1991) qui travaillent sur la production d'acide organique par *Beauveria bassiana*. Des résultats similaires sont reportés par Guellal et Khechkouche (2002), Sadjji et Ladjici (2003) et Brachmi et Halimi (2004). Ces auteurs ont travaillé sur la même souche de *B. bassiana* sur des milieux de culture différents.

L'évolution de la biomasse ne cesse d'augmenter pour atteindre 50×10^6 spores./ ml au 15^{ème} jour. L'augmentation de la biomasse signifie le développement du champignon (production importante des spores et des hyphes). Des résultats similaires sont obtenus par Brachmi et Halimi (2004). Le nombre de spores contenu dans le moût de fermentation a connu une augmentation progressive allant de $7,8 \times 10^6$ à 50×10^6 spores/ml. Du 1^{er} au 6^{ème} jour nous avons noté une production importante de spores s'évalue à $10,2 \times 10^6$ spores /ml, qui représente la continuité de la phase exponentielle de croissance du champignon. A partir du 6^{ème} jour, la production des spores diminue légèrement et s'estompe à la fin de la fermentation, qui peut être dû, d'une part à l'épuisement du milieu en nutriments et d'autre part à l'activité métabolique du champignon qui rend le milieu toxique (Branger et al., 2007). A la fin de fermentation, nous avons pu récupérer du moût de lactosérum une biomasse de 5,56 g/l.

IV-CONCLUSION

La caractérisation physico-chimique des trois résidus agroindustriels a révélé une teneur en sucres considérable dans le lactosérum, non négligeable dans les grignons d'olives et à un moindre niveau des margines. Ces sucres constituent une source de carbone indispensable au développement du champignon.

L'étude de la croissance mycélienne ou le préférendum cultural montre que les deux milieux naturels à savoir le lactosérum et les margines conviennent au développement de notre souche *B. bassiana*, néanmoins, la meilleure croissance a été enregistrée au niveau de lactosérum. Les résultats du taux de sporulation de *B. bassiana* sur les grignons d'olives permet de constater que ce sous-produit de l'industrie agricole convient à l'accroissement du champignon et qu'il peut être utilisé comme milieu de culture.

Les paramètres suivis pendant 15 jours lors de la fermentation en batch conduite sur *B. bassiana* dans le lactosérum déprotéiné nous permettent de noter une fluctuation du pH qui révèle la sécrétion par *B.*

bassiana des métabolites acide. De même, l'augmentation de la biomasse produite lors de la fermentation confirme la multiplication de *B.bassiana* par la consommation de la source de carbone présente dans le milieu.

Il est beaucoup plus intéressant de projeter notre essai à grande échelle pour concrétiser au sein d'une unité de biotechnologie qui travaille au service de l'agriculture et l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

Bidochka M. et Khchatourians G., 1991- Identification of *Beauveria bassiana* extracellular as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Jour.invo. pathol.* , pp 362-370.

Bissaad F.Z., 2011- Etude comparative de l'effet de deux entomopathogènes, *Beauveria bassiana* Bals. et *Metarhizium anisopliae* var *acridum* Metch. (*Hyphomycètes, Deuteromycotina*) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (*Orthoptera, Acrididae*). Thèse Doct., Ecol. Nat. Sup. Agro., El-Harrache. 230p.

Boutaoua N., 1992 – Etude physico-chimique et microbiologique d'un fromage artisanal. Mem.fin d'étude. INIA, 43p.

Brachmi R. et Halimi F., 2004- caractérisation biochimique d'une souche l'hyphomycète *Beauveria bassiana* cultivée sur lactosérum et moût d'orge. Mem.DES, Boumerdes, 58p.

Branger A., Ricjher M.M. et Roustel S., 2007 – Microbiologie et alimentation, conduite de la fermentation. Ed. educagri, pp 209-221.

Chahbar N. 1996 - *Morphométrie de Schistocerca gregaria (forskal, 1775) et Locust migratoria cinerascens Bonnet et Finnot, 1885 (Orthoptera, Acrididae) à Adrar en 1996. Effet du champignon entomopathogène Beauveria bassiana (Deuteromycotina) sur quelques paramètres physiologiques de S. gregaria*. Mem.Ing.Agr.,Int.Nat.Sup. Agro., El-Harrach, 98p.

Chevillon I. Larrose C. et Moreau N., 1998- conservation des échantillons d'avant analyse des paramètres biochimiques les plus courantes. Ann.Biol.Clin., Paris, Vol 56, pp.200-204

Gaudet P. et Kowalski A., 2002- Physique et chimie 1^{er} bac pro. Ed. educagri, pp 96-272.

Guella D. et Khechkouche S., 2002 – Contribution à l'étude de la production de citrate par *Beauveria bassiana* cultivé sur lactosérum. Mem.DES, Boumerdes. 62p.

Halouane F., 2007 – Recherche sur l'entomopathogène *Beauveria bassiana* : Bioécologie, production et application sur *Schistocerca gregaria* (forskal, 1775) (*Orthoptera, Acrididae*). Thèse Doct., Ecol. Nat. Sup. Agro., El-Harrache. 190p.

Lydie S., 2010- La lutte biologique. Ed.Quae. ISBN.

Sabbahi R., Merzouki A. et Guertin L., 2008 – Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. against the tarnished plant bug. *Lygus lineolaris* L., in strawberries. Appl. entomol. 2 :J24-J34. Academic Press. New York, 28p.

Sadji D. et Ladjici L., 2003- Contribution à l'étude de l'excrétion d'acide citrique et d'agent anti-microbiens par *Aspergillus niger* et *Metarhizium anisopliae* sur deux milieux naturels : Lactosérum et moût d'orge. Mem. DES. Boumerdes. 62p.

Simon P. et Meunier M., 1970 – Microbiologie industrielle et génie biochimique. TECH et DOC. Lavoisier, 523p.

Tsioulpas A. Dimoulconou D. et Aggelis G., 2002 – Phenolic removal in olive mill wastewater by strain of *Pleurotus* spp. to their phenol Oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* 84: 251-257.