



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Utilisation du broyat de péricarpes des cabosses de cacao comme milieu de culture alternatif pour la production de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1

Alahou André Gabazé GADJI^{1,2*}, Ossey Bernard YAPO¹, Kouabenan ABO²,
Ladji MEITE¹, Agnès Eude Yves GNAGNE¹, Satinder Kaur BRAR³ et
Rajeshwar Dayal TYAGI⁴

¹Laboratoire des Sciences de l'Environnement (LSE), Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Gestion de l'Environnement (UFR-SGE), Université Nangui Abrogoua (UNA), Abidjan, Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de Phytopathologie et de Biologie Végétale, Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny (INP-HB), Yamoussoukro, Côte d'Ivoire.

³Laboratoire de Biovalorisation et de Contaminants Emergents, Institut national de la Recherche Scientifique (INRS-Eau Terre et Environnement), Université du Québec, Québec, Canada.

⁴Laboratoire de Bioconversion des Eaux Usées et de Boues d'Épuration en Produits à haute valeur ajoutée, Institut National de la Recherche Scientifique (INRS-Eau Terre et Environnement), Université du Québec, Québec, Canada.

*Auteur correspondant, E-mail : andregadji@yahoo.fr

REMERCIEMENTS

Nos remerciements à l'Association des Universités Africaines (AUA) pour leur appui financier.

RESUME

La recherche de matières premières alternatives pour la production de biopesticides microbiens suscite beaucoup d'intérêts. La présente étude s'est proposée d'utiliser le broyat de péricarpes des cabosses de cacao comme substrat de fermentation pour produire *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (Btk HD-1). Les échantillons de péricarpes des cabosses ont été collectés dans une plantation cacaoyère de Toumokra à Yamoussoukro en Côte d'Ivoire. Les paramètres physico-chimiques ont été déterminés selon les méthodes standards. Le substrat de fermentation a été autoclavé, 2 fois successivement, à 121 °C pendant 30 min et ensemencé avec 4% de l'inoculum de Btk HD-1. Il ressort de cette étude que les teneurs en carbone et en azote total ont été respectivement de 79.7% et 1.4%. Les concentrations en minéraux du substrat ont été plus élevées en calcium (8406.5 mg/kg) et en potassium (8248.8 mg/kg) qu'en magnésium (632.6 mg/kg), sodium (471.5 mg/kg), fer (57 mg/kg), cuivre (52.8 mg/kg), zinc (51.8 mg/kg) et manganèse (44.3 mg/kg). Le dénombrement des cellules et des spores viables a donné respectivement $3.2 \cdot 10^{11}$ et $3.02 \cdot 10^{11}$ UFC/ml, pour le surnageant, et $6.5 \cdot 10^{13}$ et $5.02 \cdot 10^{13}$ UFC/ml, pour le culot. Ce substrat végétal offre une bonne perspective pour la production d'un biopesticide à base de Btk HD-1.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots-clés : Péricarpes des cabosses de cacao, biopesticide, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, fermentation en milieu solide, Côte d'Ivoire.

Use of crushed cocoa hulls as an alternative culture medium for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 production

ABSTRACT

Research for alternative raw material for microbial biopesticides production raises outstanding interests. This study is proposed to use the crushed pericarps cocoa pods as fermentation substrate to produce *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (Btk HD-1). The samples pericarps pods were collected in a cocoa plantation of Toumokro in Yamoussoukro area, Côte d'Ivoire. The physico-chemical parameters were determined using standard methods. The fermentation substrate was autoclaved 2 times successively at 121 °C for 30 minutes and inoculated with 4% of Btk HD-1 inoculum. It appears from this study that the carbon and total nitrogen were 79.7% and 1.4% respectively. Mineral concentrations in substrate were higher in calcium (8406.5 mg/kg) and potassium (8248.8 mg/kg) than magnesium (632.6 mg/kg), sodium (471.5 mg/kg), iron (57 mg/kg), copper (52.8 mg/kg), zinc (51.8 mg/kg) and manganese (44.3 mg/kg). Cell counts and viable spores gave respectively $3.2 \cdot 10^{11}$ and $3.02 \cdot 10^{11}$ CFU/ml, to the supernatant, and $6.5 \cdot 10^{13}$ and $5.02 \cdot 10^{13}$ CFU/ml, for the pellet. This vegetal substrate offers a good prospect for Btk HD-1 based biopesticide production.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Cocoa hulls pod, biopesticide, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, solid medium fermentation, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION

Dans le secteur agricole, un des principaux facteurs qui causent des dommages à l'environnement est la pollution causée par l'utilisation de pesticides chimiques pour le contrôle des insectes nuisibles et des microorganismes phytopathogènes (Vu, 2009; Pohé, 2012). Cette utilisation a permis une amélioration des rendements agricoles (Biego et al., 2009).

Cependant, ces dernières années, les pesticides chimiques ont été l'objet de critiques substantielles en raison des effets défavorables sur l'environnement (Mpika, 2010). Leur application en agriculture, selon Biego et al. (2009), suscite de nombreuses inquiétudes liées à leur toxicité ainsi qu'à leur influence négative sur la santé humaine. Au regard de ce qui précède et relativement au sujet de la nocivité des substances chimiques, la conscience environnementale pose, aujourd'hui, avec une certaine acuité la question de la sécurité chimique (ou risque chimique). Elle préconise une approche de lutte intégrée associant différentes techniques et méthodes dans la gestion des ravageurs des cultures et des vecteurs de maladies (Mawussi, 2008). A cet égard, la lutte

biologique utilisant les pesticides microbiens, notamment ceux à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), constitue une alternative intéressante à la lutte chimique. Les pesticides microbiens sont des préparations à base de bactéries, de virus, de protozoaires ou de champignons. Les biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) sont des suspensions formulées à partir de mélanges de spores et de cristaux protéiques synthétisés par la bactérie (Bt) après une mise en culture dans un bioréacteur (Adjallé, 2009). Leur utilisation en agriculture a montré des résultats fort intéressants contre les insectes nuisibles, affirment Joung et Coté (2000). En Côte d'Ivoire, les bioessais de Btk HD-1 sur *Phytophthora palmivora* ont révélé un fort pouvoir fongistatique avéré contre ce parasite responsable de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer, selon les travaux de Gadji et al. (2015).

En dépit des nombreux avantages qu'offrent les biopesticides à base de Bt, leur application a été longtemps limitée en raison des coûts de production relativement élevés dus au milieu de culture (Yezza, 2005). L'avènement de nouvelles technologies visant la valorisation des résidus encombrants issus

des activités industrielles, agricoles ou domestiques, a favorisé la production de biopesticides à base de Bt à moindre coût. Les milieux de culture non conventionnels déjà étudiés sont, par exemples, les eaux usées industrielles et les boues d'épuration municipales qui constituent une véritable problématique de gestion efficace et durable pour les pouvoirs publics, les responsables des industries et des usines de traitement des eaux (Adjallé, 2009). Ces rejets utilisés comme milieux de culture alternatifs pour la production de biopesticides à base de Bt ont été évalués en tenant compte que ceux-ci contiennent des éléments pouvant soutenir la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine (Vu, 2009). Dans la présente étude, des péricarpes de cabosses de cacao ont été utilisés comme matière première alternative pour la production de Btk HD-1 dans un incubateur.

MATERIEL ET METHODES

Echantillonnage des péricarpes de cabosses de cacao

Des péricarpes frais de cabosses de cacao ont constitué la matière première utilisée comme substrat de fermentation pour la production d'un biopesticide à base de Btk HD-1. Ils ont été collectés dans une plantation cacaoyère de Toumokro, dans le district de Yamoussoukro (Centre de la Côte d'Ivoire) et fournis gracieusement par l'Entreprise Coopérative de Yamoussoukro (ECOYA). Ils ont été acheminés au Laboratoire de Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) de l'INP-HB de Yamoussoukro pour des analyses physico-chimiques.

Caractéristiques physico-chimiques des péricarpes de cabosses de cacao

Plusieurs paramètres ont été mesurés selon des méthodes standards consignées dans le Tableau 1 avant leur utilisation comme milieu de culture. Le dosage des minéraux a été fait par spectrométrie d'absorption atomique (AAS), selon la méthode utilisée au Laboratoire de Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies

Nouvelles (LAPISEN) de l'INP-HB. Elle consiste à calciner à 600 °C dans un four 0.3 g de l'échantillon sec broyé à 0.1 mm, pendant 5 heures, jusqu'à l'obtention d'une cendre blanche. Après refroidissement, 5 ml d'acide nitrique 1N sont ajoutés puis évaporés à sec sur un bain de sable. Au résidu est ajouté 5 ml d'acide chlorhydrique 1N et le tout est enfourné à nouveau à 400 °C pendant 30 min. Le résidu est récupéré dans 10 ml d'acide chlorhydrique à 0.1N puis mis dans une fiole jaugée de 50 ml. L'opération est répétée trois fois et la fiole est complétée jusqu'au trait de jauge. Les teneurs des minéraux dans la solution (minéralisa) sont ensuite déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (AAS). Les résultats ont été exprimés en mg/kg.

Préparation du substrat de fermentation

Les échantillons des péricarpes de cabosses destinés à la préparation du milieu de culture ont été lavés à l'eau de robinet puis rincés à l'eau distillée stérile. Ils ont été ensuite broyés dans un mortier de sorte à obtenir des particules de taille comprise entre 1 mm et 1 cm telles que recommandées par Manpreet et al. (2005). Le pH du substrat a été ajusté à 7 avec l'hydroxyde de sodium (NaOH, 1 M) et le substrat a été autoclavé à 121 °C pendant 30 min, selon le protocole décrit par Vu et al. (2009a). La stérilisation du substrat de fermentation à l'autoclave a été faite 2 fois, successivement. Une fois refroidi, le substrat a été disposé dans un bac en plastique stérile avant l'inoculation.

Caractéristiques de l'inoculum

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* HD-1 a été le microorganisme utilisé dans cette étude. L'inoculum constitué de cette bactérie est obtenu par bioconversion des eaux usées d'industries d'amidon en biopesticide (Vu et al., 2009a). Il est sous forme liquide, avec un pH égal à 5 et contient des spores ($2.46.10^9$ UFC/ml) et de cellules ($3.13.10^9$ UFC/ml). Il a été formulé au Laboratoire de Bioconversion des Eaux Usées et de Boues d'Épuration en Produits à haute valeur ajoutée, de l'Institut National de la Recherche

Scientifique (INRS-Eau Terre et Environnement), Université du Québec au Canada.

Procédé expérimental de la fermentation

Le procédé de fermentation a été réalisé suivant la méthode de Brar (2007). Elle consiste à ensemencer le milieu de culture avec 4% (volume/masse) de l'inoculum dans des conditions aseptiques. Ainsi, le milieu de culture (1 kg) contenu dans un bac en plastique a été inoculé. Une fois le milieu inoculé, le bac a été couvert avec la popeline stérile. Il a été ensuite placé dans une étuve à 30 ± 1 °C pendant 72 heures. Le milieu était agité manuellement pendant 15 secondes chaque 24 heures afin de favoriser le dégagement de la chaleur et l'aération du milieu de culture.

Evaluation des cellules et des spores du substrat fermenté

Homogénéisation et centrifugation

La biomasse fermentée a été additionnée à l'eau distillée stérile dans un ratio 3:1 (volume/masse). L'ensemble a été transvasé dans des fioles stériles de 500 ml pour être homogénéisé sur un agitateur magnétique à la vitesse de 600 trs/min pendant 15 min. Le bouillon fermenté a été ensuite centrifugé à 6000 trs/min pendant 30 min dans des conditions aseptiques conformément à la procédure décrite par Brar et al. (2005). Le surnageant et le culot de la centrifugation du bouillon fermenté ont été conservés à 4 °C dans des conditions aseptiques jusqu'à l'évaluation du nombre total de bactéries et de spores viables (Adjallé et al., 2007).

Dénombrement des cellules et des spores viables

La technique d'ensemencement direct sur milieu gélosé a été réalisée en faisant des dilutions décimales successives de l'échantillon pour déterminer le nombre total des bactéries et de spores de Btk HD-1 viables dans le surnageant et le culot du bouillon fermenté. Pour le dénombrement des colonies de Btk HD-1, un volume de 0.5 ml de l'échantillon correspondant a été prélevé et

dilué dans des fioles en verre stériles contenant 4.5 ml d'eau saline (NaCl 0.85%) préalablement stérilisée comme mentionné par Vu et al. (2009b). Cette suspension est bien mélangée à l'aide d'un vortex et une quantité de 0.5 ml est prélevée puis diluée dans une autre fiole contenant la même quantité d'eau saline, soit 4.5 ml. La même opération a été répétée si bien que la suspension mère a été diluée 12 fois. Un aliquote de 0.1 ml des 4 derniers tubes a été étalé sur le milieu solide TSA (trypticase soja agar) en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Les étalements ont été réalisés avec une pipette Pasteur en râteau dans 4 boîtes de Pétri pour chaque dilution, et ce, pour les 4 dernières dilutions. Les boîtes ont été incubées à l'inverse à l'étuve à 30 °C pendant 20 heures. Seuls les résultats compris entre 30 et 300 colonies ont été retenus pour évaluer le nombre total des cellules viables par ml (UFC/ml) (Barnabé, 2000).

Pour le dénombrement de spores viables, les quatre dernières dilutions utilisées pour le dénombrement des colonies de Btk HD-1 ont été utilisées. Ces dilutions ont été chauffées dans un bain marie à 65 °C pendant 15 min (Barnabé, 2000). Un aliquote de 0.1 ml de ces dilutions a été étalé sur milieu solide TSA ou gélose PCA en boîtes de Pétri. Les étalements ont été faits en deux duplicata pour chaque dilution. Les boîtes ont été incubées à l'inverse à l'étuve à 30 °C pendant 20 heures. Les résultats compris entre 30 et 300 colonies ont été retenus et exprimés en unité formant colonie par ml (UFC/ml) (Barnabé, 2000).

Analyse statistique

Les données ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel Statistica 7.1. En cas de différence significative entre les moyennes, le test HSD de Tukey a été utilisé au seuil de 5%.

RESULTATS

Caractéristiques physico-chimiques des péricarpes de cabosses de cacao

Les résultats des analyses du broyat des péricarpes de cabosses de cacao ont montré que les concentrations en solides totaux et en orthophosphate ont été, respectivement, de

154800 mg/kg et de 208.3 mg/kg. Le taux d'humidité du substrat végétal a été de 84.5% alors que sa composition en carbone et en azote total a indiqué des teneurs de 79.7% et de 1.4% respectivement. Le pH du substrat, avant la fermentation, a indiqué 6.3 et le rapport C/N calculé a donné 56.9 (Tableau 2). Leur composition en éléments minéraux, déterminée à partir de la matière sèche (MS), a montré une forte teneur en calcium (8406.50 mg/kg) et en potassium (8248.80 mg/kg). Les concentrations en magnésium, en sodium, en fer, en cuivre, en zinc et manganèse ont été respectivement de 632.60 mg/kg, 471.5 mg/kg, 57.00 mg/kg, 52.83 mg/kg, 51.83 mg/kg et de 44.33 mg/kg (Tableau 3).

Dénombrement des cellules et des spores viables

La centrifugation de la biomasse fermentée a permis d'obtenir deux fractions liquides: le surnageant (Figure 1a) et le culot (Figure 1b). Le nombre total de cellules et de

spores viables dénombré dans le surnageant de la centrifugation du bouillon fermenté a été de $3.2.10^{11} \pm 0.13.10^{11}$ UFC/ml et de $3.02.10^{11} \pm 0.09.10^{11}$ UFC/ml, respectivement. Le nombre total de cellules dans le surnageant a été statistiquement différent ($p = 0.000346$) de celui du culot dont le nombre de cellules a été de $6.5.10^{13} \pm 0.22.10^{13}$ UFC/ml. L'analyse a aussi révélé une différence significative ($p = 0.000347$) entre le nombre de spores viables du surnageant et celui du culot ($5.02.10^{13} \pm 0.21.10^{13}$ UFC/ml). L'homogénéité des concentrations en cellules et en spores étudiée par une analyse de variance à deux facteurs (surnageant et culot), à travers le test HSD de Tukey, a varié de 3 à 4.2% entre le surnageant et le culot de la centrifugation du bouillon fermenté. Les mesures du pH après fermentation n'ont montré aucune différence significative ($p = 0.685059$) entre les deux produits (surnageant et culot) de la centrifugation du bouillon fermenté (Tableau 4).

Tableau 1 : Méthodes d'analyse des paramètres physico-chimiques du broyat des péricarpes de cabosses de cacao.

| Paramètres | Méthodes | Références |
|--|--|----------------------------|
| Humidité | Méthode gravimétrique | CEAEQ (2005) |
| pH | Méthode électrométrique | CEAEQ (2003) |
| Carbone total (Ct) | Méthode de Walkley-Black | Martinez-Chois (2012) |
| Azote total (Nt) | Méthode colorimétrique | CEAEQ (2014) |
| Cu, Fe, Zn, Mg, Mn, Na, K, Ca, PO ₄ ³⁻ | Dosage par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) | Méthode interne au LAPISEN |

LAPISEN : Laboratoire de Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles, Institut National Polytechnique HOUPHOUET-BOIGNY (INP-HB), Yamoussoukro, Côte d'Ivoire.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques du broyat des péricarpes de cabosses de cacao.

| Paramètres | Valeur |
|------------------------|----------|
| pH | 6,3 |
| Taux d'humidité (%) | 84,5 |
| Carbone total (%) | 79,7 |
| Azote total (%) | 1,4 |
| Rapport C/N | 56,9 |
| Solide totaux (mg/kg) | 154800,0 |
| Orthophosphate (mg/kg) | 208,3 |

Tableau 3 : Caractéristiques en éléments métalliques (mg/kg) du broyat des péricarpes de cabosses de cacao.

| Paramètres | Teneur (mg/kg de MS) |
|------------|----------------------|
| Cu | 52,83 |
| Fe | 57,00 |
| Zn | 51,83 |
| Mg | 632,67 |
| Na | 471,50 |
| K | 8248,80 |
| Mn | 44,33 |
| Ca | 8406,50 |

MS : matière sèche

Tableau 4 : Nombre total de cellules et de spores viables dans le surnageant et le culot de la centrifugation du bouillon fermenté du broyat des coques de cabosses de cacao.

| Produits de la centrifugation du bouillon fermenté | Cellules | | Spores | | pH | |
|--|---|-------|--|-------|------------------|-------|
| | Moy.(UFC/ml) | CV(%) | Moy.(UFC/ml) | CV(%) | Moy. | CV(%) |
| Surnageant | $3,2 \cdot 10^{11} \pm 0,13 \cdot 10^{11b}$ | 4,0 | $3,02 \cdot 10^{11} \pm 0,09 \cdot 10^{11b}$ | 3,0 | $5,3 \pm 0,08^a$ | 1,5 |
| Culot | $6,5 \cdot 10^{13} \pm 0,22 \cdot 10^{13a}$ | 3,4 | $5,02 \cdot 10^{13} \pm 0,21 \cdot 10^{13a}$ | 4,2 | $5,3 \pm 0,05^a$ | 0,9 |

UFC : Unité formant colonie

Les moyennes de chaque colonne suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, selon le test HSD de Tukey, au seuil de 5 %.



Figure 1 : Surnageant (a) et culot (b) de la centrifugation du bouillon fermenté du broyat des péricarpes de cabosses de cacao.

DISCUSSION

Les résultats des analyses réalisées sur le broyat des coques de cabosses montrent que cette matière première contient des éléments pouvant servir comme substrat pour la culture de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (Btk HD-1). Ces éléments sont l'azote, le carbone et les ions métalliques (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} et Ca^{+2}) qui sont importants pour la croissance, la sporulation et la synthèse de delta endotoxine, comme l'a indiqué Yezza (2005). En outre, le substrat offre une humidité acceptable se situant dans l'intervalle des taux d'humidité (30 à 85%) recommandés pour une fermentation en milieu solide en utilisant la biomasse lignocellulosique comme milieu de culture (Krishna, 2005 ; Dilhon, 2012). La teneur en humidité (84.5%) obtenue dans cette étude est relativement similaire à celles trouvées dans la littérature. Maffeja et al. (2009), Oddoye et al. (2010) et Sahoré et al. (2015) ont obtenu respectivement 85.5%, 87% et 75.92 à 84.52% de taux d'humidité dans les coques fraîches de cabosses de cacao.

Les eaux usées agroindustrielles constituent, à ce jour, une des meilleures matières premières alternatives, pour produire *Bacillus thuringiensis* (Bt) par bioréaction. Plusieurs travaux entrepris sur l'utilisation des eaux usées agroindustrielles comme milieu de culture alternatif pour la production de biopesticides à base de Bt sont disponibles dans la littérature. Mais le potentiel nutritif qu'offrent les péricarpes de cabosses de cacao permet de dire que ce substrat présente aussi un meilleur profil pour la synthèse de Bt var. *kurstaki* HD-1 au regard des résultats obtenus après fermentation. Ainsi, selon Sachdeva et al. (2000), le rapport carbone/azote (C/N) joue un rôle important dans la croissance, la sporulation et le pouvoir entomotoxique de *Bacillus thuringiensis*. La valeur déterminée au cours de cette étude est plus importante que celle trouvée par Adjallé et al. (2007) et Vu et

al. (2009a) à partir des eaux usées d'industries d'amidon et qui sont de 18.88 et 12.87, respectivement. Cependant, les teneurs en carbone et en certains éléments métalliques trouvées diffèrent de celles obtenues par Djeke et al. (2011) et Sahoré et al. (2015) en utilisant la même matrice. Les premiers auteurs cités ont trouvé des teneurs de 36% en carbone, de 6000 mg/kg en calcium, de 4000 mg/kg en magnésium et de 34000 mg/kg en potassium ; alors que les seconds auteurs ont obtenu des teneurs moyennes de 56.92% en carbone, de 500 mg/kg en sodium et de 12900 mg/kg en calcium. Les différences constatées au niveau des teneurs seraient certainement dues à l'utilisation des intrants en agriculture, du type de sols et des clones de cacaoyer en présence.

Les péricarpes de cabosses de cacao employées comme milieu de culture ont influencé la croissance et la sporulation de la bactérie. Le nombre total des cellules et spores viables obtenus, aussi bien dans le culot que dans le surnageant, a été plus important que ceux trouvés dans la littérature en utilisant les eaux usées agroindustrielles ou les boues d'épuration comme substrat de fermentation (Barnabé, 2000 ; Adjallé et al., 2007 ; Vu et al., 2009b). Ces résultats seraient probablement dus au potentiel nutritif élevé des coques de cabosses de cacao pour la culture de Bt. En effet, à l'issue de ses travaux sur la conception d'une stratégie de production opérationnelle de biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation, Yezza (2005) a conclu que la production à haut rendement des cellules et des spores y compris les δ -endotoxines avec un fort potentiel entomotoxique est liée à la composition du milieu de culture. Le substrat utilisé dans cette étude offre donc une bonne perspective pour la production de Btk HD-1 par fermentation dans un incubateur.

Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence le potentiel nutritif des péricarpes de cabosses de cacao pouvant servir de substrat pour la culture de Btk HD-1. La caractérisation physico-chimique de cette matière a montré qu'elle contient les éléments nutritifs nécessaires pour la croissance et la sporulation de Btk HD-1. Le nombre total de cellules et de spores obtenu dans le culot de la centrifugation du bouillon fermenté a été respectivement de $6.5.10^{13}$ UFC/mL et $5.02.10^{13}$ UFC/ml. Celui du surnageant a été de $3.2.10^{11}$ UFC/ml et $3.02.10^{11}$ UFC/ml, respectivement. Au regard de ces résultats, et en attendant que l'efficacité du bouillon fermenté ne soit évaluée sur les insectes nuisibles et les microorganismes phytopathogènes, le broyat de péricarpes des cabosses de cacao constitue un des meilleurs milieux de culture alternatifs pour la production du biopesticide à base de Btk HD-1 par fermentation dans un incubateur.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont aucun conflit d'intérêts.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Ce travail a été réalisé dans une parfaite collaboration entre tous les auteurs. AAGG a élaboré le protocole, a fait l'échantillonnage, a participé à l'analyse physico-chimiques du substrat, a mis en œuvre le procédé de biofermentation, et a écrit l'article. OBY a fourni la documentation pour faire le travail, a corrigé le protocole, a participé à la mise en œuvre du procédé de biofermentation, a fait l'analyse des résultats physico-chimiques et corrigé le manuscrit. L'auteur KA a fourni le matériel pour faire le travail au laboratoire ; il a aussi corrigé le protocole et participé à la rédaction de l'article. LM a aidé à la rédaction et à la correction du manuscrit ainsi que le résumé en

anglais. AEYG a participé à l'analyse physico-chimique du substrat en laboratoire. L'auteur SKB a conçu l'étude en donnant les grandes étapes du procédé de biofermentation. L'auteur RDT est le concepteur du biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD-1 en utilisant les rejets agroindustriels comme milieu de culture.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à l'Entreprise Coopérative de Yamoussoukro (ECOYA), pour nous avoir fourni des péricarpes frais de cabosses de cacao.

REFERENCES

- Adjallé K. 2009. Etape d'ultrafiltration et procédé de formulation dans la production de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* en utilisant des eaux usées et des boues d'épuration comme substrat. Thèse de PhD, Université du Québec, Canada, p. 243.
- Adjallé KD, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valéro JR, Surampalli RY. 2007. Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Process Biochem.*, **42**: 1302-13011.
- Barnabé S. 2000. Utilisation des boues d'épuration comme substrat pour la production de biopesticides : induction abiotique de la sporulation chez *Bacillus thuringiensis*. Mémoire de Master, Université du Québec, Canada, p. 151.
- Biego GMH, Coulibaly A, Koffi KM, Chatire KO, Kouadio PL. 2009. Niveaux de résidus de pesticides organochlorés dans les produits du cacao en Côte d'Ivoire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **3**(2): 297-303.
- Brar SK. 2007. Effets des propriétés rhéologiques sur la fermentation des

- eaux usées et des boues d'épuration par *Bacillus thuringiensis* var. *kurstakiet* sur le développement des biopesticides en suspensions aqueuses concentrées. Thèse de PhD, Université du Québec, Canada, p. 730.
- Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valéro JR, Surampalli RY. 2005. Sludge based *Bacillus thuringiensis* biopesticides: viscosity impacts. *Water Res.*, **39**(13): 3001-3011.
- CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec). 2014. Détermination de l'azote total Kjeldahl et du phosphore total : digestion acide-méthode colorimétrique automatisée. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, MA. 300 – NTPT 2.0, Rév. 2, 16 p.
- CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec). 2005. Détermination des solides totaux et des solides totaux volatils : méthode gravimétrique. Ministère de l'Environnement du Québec, MA. 100 – S.T. 1.0, p. 12.
- CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec et Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec). 2003. Détermination du pH à l'eau dans les sols agricoles, MA. 1010 – pH 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, p. 8.
- Dilhon GS. 2012. Valorisation de déchets agro-industriels par bioproduction fongique d'un important produit de plate-forme (l'acide citrique) avec extraction simultanée de chitosane. Thèse de PhD, Université du Québec, Canada, p. 487.
- Djeke DM, Angui TKP, Kouadio YJ. 2011. Décomposition des broyats de coques de cacao dans les sols ferrallitiques de la zone d'Oumé, Centre-ouest de la Côte d'Ivoire : effets sur les caractéristiques chimiques des sols. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **15**(1): 109-117.
- Maffeja F, Njifutié N, Manjeli Y, Tchoumboué J, Tchakounté J. 2009. Digestibilité comparée des rations contenant de la drêche ensilée des brasseries, du tourteau de palmiste ou des coques de cacao chez le porc en croissance finition au Camérout, p. 17.
- Krishna C. 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **25**(1-2): 1-30.
- Manpreet S, Sawraj S, Sachin D, Pankaj S, Banerjee UC. 2005. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Mal. J. Microbiol.*, **1**(2): 1-9.
- Martinez-Chois CJ. 2012. Réhabilitation des sols pollués par les éléments traces métalliques grâce aux bactéries du sol associées à la rhizosphère de *miscanthus x giganteus*. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France, p. 167.
- Mawussi G. 2008. Bilan environnemental de l'utilisation de pesticides organochlorés dans les cultures de coton, café et cacao au Togo et recherche d'alternatives par l'évaluation du pouvoir insecticide d'extraits de plantes locales contre le scolyte du café (*Hypothenemus hampei* Ferrari). Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France, 154 p.
- Mpika J. 2010. Isolement et identification de microorganismes indigènes et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) en Côte d'Ivoire. Thèse de

- Doctorat, Université de Cocody, Côte d'Ivoire, p. 277.
- Oddoye EOK, Rhule WA, Agyente-Badu K, Anchirinah V, Ansah FO. 2010. Fresh cocoa pod husk as an ingredient in the diets of growing pigs. *Sci. Res. Essays*, **5**(10): 1141-1144.
- Pohé J. 2012. Action du dosage en cuivre des sels cupriques et de la périodicité de leur application sur la pourriture brune des cabosses de cacao en Côte d'Ivoire. *J. Anim. Plant Sci.*, **15**(3): 2243-2251.
- Rani-Singhania R, Kumar PA, Soccol CR, Pandey A, 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **44**: 13-18.
- Sachdeva V, Tyagi RD, Valero JR, 2000. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Sci. Technol.*, **42**: 211-216.
- Sahoré AD, Afferi JK, Oka L, Abouattier JL, Boua KB. 2015. Contribution to the study of the cocoa pod cortex valorisation. *Journal of Global Biosciences*, **4**(8): 3201-3206.
- Vu KD. 2009. Développement de stratégies pour la production d'un biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*HD-1 avec une forte activité insecticide en utilisant les eaux usées d'industrie d'amidon comme matière première. Thèse de PhD, Université du Québec, Canada, p. 274.
- Vu KD, Tyagi RD, Valéro JR, Surampalli RY. 2009a. Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **32**: 511-519. DOI 10.1007/s00449-008-0271-z (first online)
- Vu KD, Yan S, Tyagi RD, Valéro JR., Surampalli RY. 2009b. Induced production of chitinase to enhance entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* employing starch industry wastewater as a substrate. *Bioresour. Technol.*, **100**(21): 5260-5269.
- Yezza A. 2005. Conception d'une stratégie de production opérationnelle de biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation. Thèse de PhD, Université du Québec, Canada, p. 287.