



Optimisation de la sporulation de dix isolats de Côte d'Ivoire de *Metarhizium anisopliae* par la culture sur milieux à base de parches de cacao et de café, et de la mélasse.

KOUADIO Demby Laetitia Muriel^{1*}, Amani Bienvenu³, ABY N'goran², ABO Kouabenan¹, TRAORE Siaka², KOBENAN Kouman², GNONHOURI Philippe²

¹ Institut National Polytechnique Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire

² Centre National de Recherche Agronomique, Côte d'Ivoire

³ Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Agroforesterie

*auteur correspondant : email : dlnkouadio@gmail.com, téléphone : 00 225 08 05 92 32

Original submitted in on 9th January 2019. Published online at www.m.elewa.org/journals/ on 30th June 2019
<https://dx.doi.org/10.4314/jab.v138i1.4>

RÉSUMÉ

Objectif : L'étude vise à rechercher des milieux alternatifs de culture pour la production en masse de *Metarhizium anisopliae*, conditions nécessaires à la formulation d'un bio pesticide. Spécifiquement, des milieux de culture, issus de la valorisation des parches de café et de cacao) et de la mélasse ont été testés à cet effet

Méthodologie et résultats : Les parches de café et de cacao, réduits en poudre pour leur utilisation. La capacité de sporulation de chaque milieu est évaluée à l'hématimètre de Malassez. Ces milieux, complétés avec de l'antibiotique chloramphénicol, sont répartis dans des boîtes de Pétri de 11 cm de diamètre. Quatre répétitions sont réalisées par milieu. Les colonies des isolats de *Metarhizium anisopliae*, sur les milieux de cultures, abondent après repiquage, en moyenne au bout de 10 jours d'incubation (28±2°C) à l'obscurité. La réaction singulière de chaque isolat sur chaque milieu de culture a permis d'identifier le milieu adéquat, T1Camel, T11Camel, T10Camel, T8Camel ou T9Camel, au développement des isolats en remplacement des milieux conventionnels que sont le riz et le PDA.

Conclusion et application des résultats : Les milieux composés de café, de cacao et de mélasse peuvent être utilisés comme milieu de culture de *Metarhizium anisopliae* pour la formulation d'un bio pesticide contre le charançon noir du bananier.

Mots clés : *Metarhizium anisopliae*, café, cacao, mélasse, Côte d'Ivoire

ABSTRACT

Objective: The study aims to search for alternative culture media for the mass production of *Metarhizium anisopliae*, conditions necessary for the formulation of a bio pesticide. Specifically, growing media from the processing of coffee and cocoa residues and molasses were tested.

Methodology and Results: The parchment of cocoa and coffee are reduced in powder. The sporulation capacity of the media are evaluated with Malassez hematimeter. Each media are supplemented with an antibiotic, chloramphenicol. The singular reaction of each isolate on each culture medium made it possible to identify the appropriate media, T1Camel, T11Camel, T10Camel, T8Camel or T9Camel, for the development of the isolates to replace rice media and PDA.

Conclusion and application of results: Media composed of coffee, cocoa residues and molasses can be used as a media for the growing of *Metarhizium anisopliae* for the formulation of a biopesticide against black banana weevil.

Keywords: *Metarhizium*, cocoa, coffee, molasses, Côte d'Ivoire

INTRODUCTION

Les microorganismes entomopathogènes occupent une place importante parmi les méthodes alternatives de lutte contre ce bio agresseur. Ainsi, des essais réalisés en Amérique, en Australie et en Afrique ont montré des résultats concluants avec les champignons entomopathogènes des genres *Beauveria* et *Metarhizium* (Ochieng, 2001). En Côte d'Ivoire, *Metarhizium anisopliae*, a été identifié sur les aires de culture bananière (Kouadio *et al.*, 2018, Aby, 2013). Les tests préliminaires (Aby, 2013) sur les isolats obtenus ont révélé des comportements variables selon les critères tels que : l'aptitude à provoquer la mycose mortelle chez l'hôte et la réaction aux différents pesticides courants en plantation. L'efficacité de son mode d'action fait de lui un bio-insecticide par excellence. Pour l'utilisation étendu de ce bio insecticide, une production importante de sa biomasse est nécessaire, en utilisant des techniques simples et peu coûteuses. Le riz est le milieu qui

s'est révélé être le plus performant pour la production en milieu solide sur substrat naturel (Latifian *et al.*, 2014). Cependant, la production du riz en Afrique reste déficitaire et l'importation est nécessaire pour couvrir la demande. 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 pour 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 sporulation de dix isolats locaux de *Metarhizium anisopliae* sur des milieux naturels solides issus de l'industrie agroalimentaire qui sont les parches de café et de cacao, de la mélasse et du sucre de canne.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Matériel fongique : Le matériel fongique est issu d'une collecte réalisée en 2008 dans différentes aires de production bananière des régions des Grands Ponts, de l'Agneby-tchassa et du Sud Comoé en Côte d'Ivoire. Il se compose de dix isolats de *Metarhizium* spp auxquels des noms de code ont été attribués selon la région de provenance. Les isolats : Bas6, Bme2, et Bme5 ont été récoltés dans la région des grands ponts, dans la plantation Batia. Deux autres isolats D23 et D24 sont issus de la plantation SAKJ Diby, dans la région Sud Comoé. Les isolats Dme1, Elima A7 et Mete sont issus de la plantation Elima, dans la région Sud Comoé. Les isolats Egl1, Egl2 sont issus

respectivement des plantations d'Eglin Azaguié et d'Eglin Agboville.

Milieux de cultures : Les substrats des différents milieux naturels seront constitués des sous-produits du café, du cacao et de sucre de canne/Mélasse. Leur efficacité en tant que substrat de base pour la production en masse est comparée à celle du milieu riz, qui jusque-là, a prouvé son efficacité, et au milieu PDA.

Méthodes

Préparation des milieux de culture à base de parche de cacao, de parche de café et de mélasse/ sucre de canne : Les substrats des différents milieux intermédiaires et organiques sont constitués des sous-produits de café, de cacao et de sucre de canne ou de

mélasse de la canne à sucre. Leur efficacité en tant que substrat de base pour la production en masse de *Metarhizium* sp est comparée à celle du milieu à base de grain de riz qui, jusque-là, a prouvé son efficacité. Après stérilisation à l'autoclave, les substrats ont été ensemencés par des rondelles de 0,5 cm de diamètre de culture pure de *Metarhizium*. Ils ont, ensuite, été mis en incubation à l'étuve 28 ± 2 °C. Les parches de café et de cacao, réduits en poudre pour leur utilisation, sont

considérés comme la source principale de protéine en négligeant les autres apports (glucides, lipides). La canne à sucre et la mélasse seront considérées comme la source de glucides (Tableau 1). La capacité de sporulation de chaque milieu est évaluée à l'hématimètre de Malassez. Ces milieux, complétés avec de l'acide citrique, ont été répartis dans des boîtes de Pétri de 11 cm de diamètre.

Tableau 1 : composition des traitements pour 125 ml d'eau distillée

Traitements	Composition (%)
T0	5g riz +5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T1	100% Ca/Cf + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T2	90% Ca/Cf + 10% S/M+ 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T3	75% Ca/Cf + 25% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T4	50% Ca/Cf + 50% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T5	25% Ca/Cf + 75% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T6	10% Ca/Cf + 90% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T7	100% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T8	Ca + M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T9	Ca + M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T10	Ca+M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol
T11	Ca + M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol

Ca : cacao, Cf : café, S : sucre, A : agar, R : riz, P : semoule de pomme de terre, G : glucose, M : mélasse

Etude de la sporulation : Les isolats ont été cultivés sur les différents milieux dans des boîtes de Pétri pendant 21 jours. La colonie formée dans chaque boîte de Pétri a été ensuite raclée avec une spatule stérile et agitée à 150 Tr/min pendant 30 min dans 10 ml d'eau distillée stérile. L'évaluation de la capacité à sporuler a été réalisée par numération à l'aide d'un hématimètre de Malassez, selon la méthode décrite par Aby (2013).

Analyse statistique : Les résidus des données obtenues ont d'abord subi un test de normalité. Les valeurs des paramètres évalués ont été soumises à des analyses de variance en utilisant les modèles linéaires généralisés. Les concentrations ont subi une transformation logarithmique népérienne préalable avant leur analyse.

RÉSULTATS

Les colonies des isolats de *Metarhizium* sp sur les milieux de cultures se développent après repiquage, en moyenne au bout de 10 jours d'incubation (28 ± 2 °C) et à l'obscurité. Les différents milieux de culture favorisent la germination et la sporulation des différents isolats de *Metarhizium* sp. Tous les milieux de culture utilisés permettent le développement de tous les isolats, mais avec un degré d'évolution différent en fonction de l'isolat et de la composition du milieu.

- Sur les milieux PDA et riz, tous les isolats ont donnés des colonies de couleur blanc cotonneux devenant verdâtre foncée après 21 jours (figure 1C).
- Sur les milieux à base de cacao, les isolats ont présenté en début de croissance un mycélium d'aspect blanc cotonneux. A 21 jours, un léger changement, d'aspect jaunâtre apparait au centre de la colonie tandis que tout le reste de la colonie demeure blanc (figure 1B).

- Sur les milieux à base de café et de 100% et plat en début de croissance et à maturité (figure 1A).
mélasse, le mycélium des isolats est blanc cotonneux

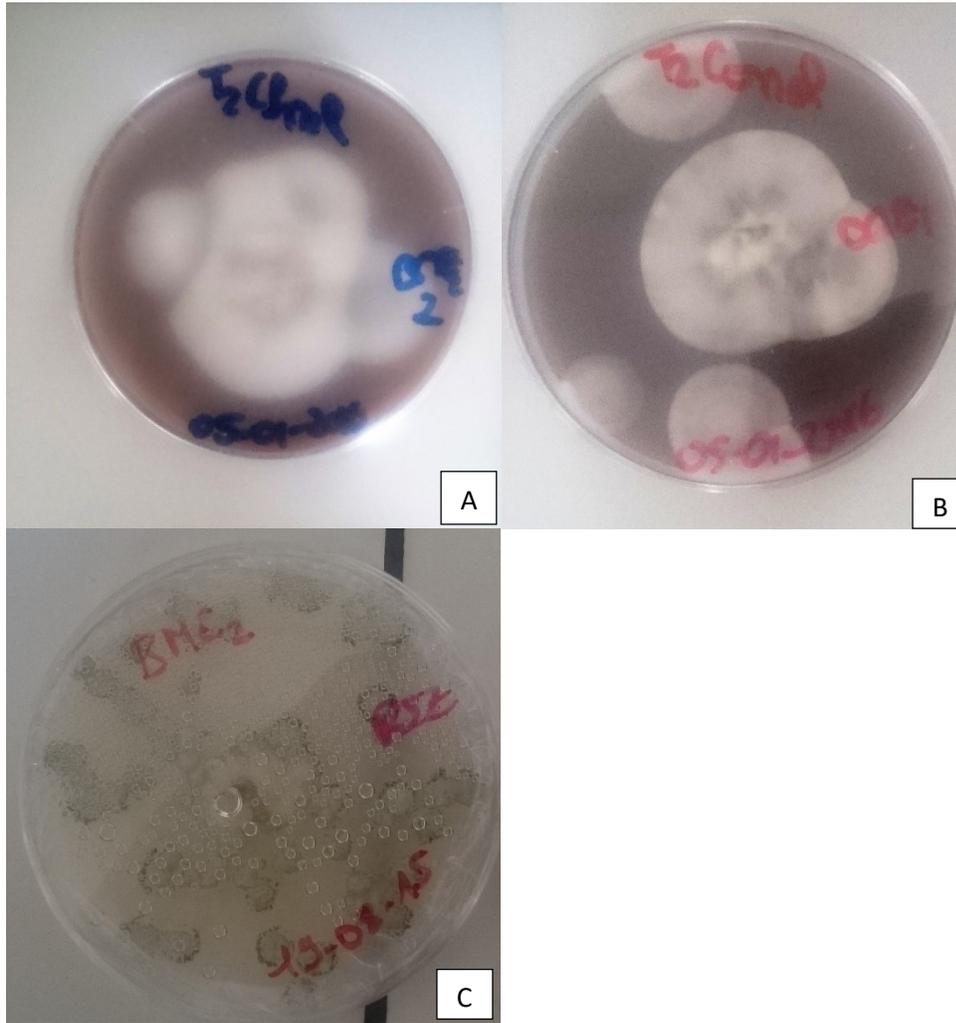


Figure 1 : Aspect macroscopique des isolats de *Metarhizium* sp de 21 jours sur les milieux de culture, A : café et mélasse, B : cacao, C : riz

La maturation des isolats se manifeste après 21 jours d'incubation. Cela se matérialise par l'apparition d'un nombre important de spores de couleurs vertes sur les milieux de culture. Ces pigments verts ne sont

observables que sur les milieux PDA et riz. La concentration en spore des isolats diffère selon le milieu de culture (de cacao ou de café et/ou de mélasse ou de canne à sucre).

Tableau 2: Analyse de variance univariée pour les facteurs milieu et isolat.

Source	Somme des carrés de type III	Ddl	Moyenne des carrés	des	Sig.
Modèle corrigé	752,099 ^a	329	2,286		,000
Ordonnée à l'origine	33316,813	1	33316,813		,000
ISOLATS	37,411	9	4,157		,000
TRAITEMENT	384,715	32	12,022		,000
ISOLATS * TRAITEMENT	330,792	288	1,149		,000

La composition du milieu de culture influence hautement la concentration en spore des isolats ($p < 0,001$). Le milieu riz a été celui qui a permis de manière générale une meilleure expression de la capacité de sporulation. Cinq groupes homogènes se sont dégagés des milieux testés. Deux groupes se sont

montré les plus adaptés par leur composition à l'expression de la capacité de sporulation des isolats (tableau 3). Le milieu riz forme le premier groupe. Un deuxième groupe est composé de : PDA, T1Camel, T11Camel, T10Camel, et T9Camel.

Tableau 3 : Classement de Student Newman et Skeuls du log de la concentration en spore des isolats de *Metarhizium* sp sur les milieux de culture

Traitements	Log Concentration	
T6Camel	4,93	a
T7CaS	4,97	a
T6CfS	5,00	a
T5CfS	5,27	a
T6CaS	5,27	a
T4CfS	5,37	b
T6Cfmel	5,53	b
T3Cfs	5,60	b
T2Cfmel	5,63	b
T5Camel	5,67	b
T5CaS	5,67	b
T3Cfmel	5,69	b
T4Cfmel	5,77	b
T3CfS	5,90	c
T5Cfmel	5,90	c
T7Camel	5,90	c
T4Camel	5,97	c
T4CaS	6,00	c
T2CfS	6,03	c
T3Camel	6,10	c
T2CaS	6,13	c
T3CaS	6,13	c
T2Camel	6,30	d
T8Camel	6,30	d
T1Cfmel	6,48	d
T9Camel	6,77	e
T10Camel	6,83	e
T11Camel	6,86	e
T1Camel	6,93	e
PDA	6,97	e
RIZ	7,40	f

Les valeurs dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes

Chaque isolat a réagi de manière significativement différente ($p < 0,001$) sur les différents milieux sur

lesquels il était mis en culture. Trois groupes ont été formés. Par ordre croissant de leur capacité de sporulation, ils sont composés de :

Groupe 1 : Egl2 ;

Groupe 2 : Dme1, Elima A7, Egl2, Bas6 D24, Egl1, Bme2;

Groupe 3 : Bme5, Bas6 ;

La sporulation de chaque isolat varie significativement ($p < 0,001$) en fonction du milieu sur lequel il est mis en culture. En effet, chaque isolat répond de manière singulière à un milieu donné. Les isolats Bas6, Bme2,

Bme5, Egl2 et Elima a7 ont atteint leur concentration maximale avec le milieu riz. Les isolats D24 et Mete se sont montrés plus sporulant sur le milieu PDA. Le milieu T10Camel a permis une meilleure expression de la capacité de sporulation de l'isolat Dme1. L'isolat D23 a quant à lui obtenu une meilleure réponse sur le milieu T1Ca. Le milieu T8Camel a été le milieu le plus sporulant pour l'isolat Egl1. Les trois meilleurs milieux ayant permis au mieux la sporulation des isolats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Classement par ordre décroissant de l'efficacité des milieux de culture par isolat

ISOLATS	MILIEUX	CONCENTRATION MOYENNE EN SPORE/ml	RANG
BAS6	RIZ	1,71E+07	1
	T10Camel	1,60E+07	2
	T3Camel	1,09E+07	3
BME2	RIZ	3,54E+07	1
	T8Camel	2,08E+07	2
	T9Camel	1,72E+07	3
BME5	RIZ	4,32E+07	1
	PDA	1,89E+07	2
	T8Camel	1,06E+07	3
D23	T1Camel	8,50E+07	1
	T10Camel	2,48E+07	2
	RIZ	2,38E+07	3
D24	PDA	3,42E+07	1
	RIZ	1,70E+07	2
	T10Camel	4,93E+06	3
DME1	T10Camel	2,52E+07	1
	T9Camel	2,07E+07	2
	T8Camel	1,63E+07	3
EGL1	T8Camel	1,12E+07	1
	RIZ	1,03E+07	2
	T9Camel	7,86E+06	3
EGL2	RIZ	4,76E+07	1
	PDA	1,21E+07	2
	T1Camel	1,14E+07	3
ELIMA A7	RIZ	6,00E+07	1
	T10Camel	1,14E+07	2
	PDA	1,11E+07	3
METE	PDA	4,60E+07	1
	RIZ	3,82E+07	2
	T8Camel	6,28E+06	3

DISCUSSION

La sporulation de cet entomopathogène a été observée sur tous les milieux testés au cours de l'étude. Parmi les milieux, le riz a produit significativement plus de conidies ($2,99.10^7$ spores par millilitres) suivi du milieu PDA ($1,56.10^7$ spores par millilitres). Une valeur nutritive élevée du riz et une teneur plus élevée en amidon favorisaient probablement une meilleure production de spores. Cette performance du substrat à base de riz a été mise en évidence par Aby (2013) et Latifian *et al.* (2014). Les autres milieux à base de parches de café ou de cacao et/ou mélasse ou de saccharose, ont montré des efficacités diverses quant à leur capacité à favoriser la sporulation des isolats. Les milieux riches en saccharose commercial ont été ceux qui ont été les moins sporulants, notamment les milieux T6Cfs ($2,11.10^5$ spores par millilitres), T7s ($2,28.10^5$ spores par millilitres), T5Cfs ($9,51.10^5$ spores par millilitres), et T6Cas ($4,70.10^5$ spores par millilitres). Le saccharose commercial ne constitue donc pas une source de carbone suffisante pour le développement des dix souches de *Metarhizium anisopliae*. Quelles que soient les proportions auxquelles il est ajouté au café ou au cacao, il induit une baisse de la sporulation. Les milieux cafés dans les mêmes proportions additionnées de mélasse ou de saccharose commercial, ont été moins sporulants que les milieux cacaos dans les mêmes conditions. Le milieu T1Cf (100% café) ayant été le plus sporulant des milieux cafés. La différence de concentration en spore des milieux cafés et cacaos dans les mêmes proportions peut s'expliquer par leur composition. La composition en méthylxanthines contenues dans le cacao (théobromine 0,5 à 2,7%, caféine 0,25 à 0,5%) et café (caféine 1 à 3%) peut en être l'une des causes. Cette différence pourrait expliquer la réaction. L'étude biochimique du catabolisme de la caféine chez des champignons filamenteux n'a pas fait l'objet de nombreux travaux. Par contre, plusieurs études ont porté sur la décaféination de la pulpe de café par voie biologique, et notamment sur la sélection de souches de champignons aptes à éliminer cet alcaloïde contenu dans ce sous-produit. Sans être a priori exceptionnelle, cette propriété n'est donc pas commune à un grand

CONCLUSION

Les milieux composés de café, de cacao et de mélasse peuvent être utilisés comme milieu de culture de *Metarhizium anisopliae* pour la formulation d'un bio-pesticide contre le charançon noir du bananier. Mis à

nombre de souches fongiques. La plupart des champignons filamenteux étudiés pour leur capacité à dégrader la caféine, appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Perraud-Galme, 1995). Les spores de 6 jours d'*Aspergillus tamaritii* sont capables de dégrader la caféine en fermentation solide (Hakil *et al.*, 1999). La caféine peut être utilisée comme unique source d'azote par les champignons qui la dégradent (Kurtzman & Schwimmer, 1971). En effet l'ajout de source exogène de Carbone, saccharose commercial et mélasse, a engendré une baisse 3 à 16 fois la concentration obtenue avec le café à 100%. Cette remarque a été également observée sur une souche de *Penicillium crustosum* qui dégrade la caféine contenue dans une infusion de café en absence de source exogène de carbone, mais beaucoup plus lentement qu'en présence de saccharose ou de glucose (Kurtzman & Schwimmer, 1971). De même, plusieurs souches de *Penicillium* et d'*Aspergillus* dégradent la caféine de la pulpe de café, sans apport exogène de carbone ou d'azote (Perraud-Galme, 1995). En plus de leur capacité à apporter de l'azote par la matière sèche qu'elles contiennent les parches de cacao présentent l'avantage de fournir du carbone pour le développement des isolats. En effet, les coques de cacao stimulent l'activité microbienne par leur apport en carbone (C) labile, support énergétique des microorganismes (Barry, 2006). Sa plus faible proportion en caféine pourrait expliquer sa capacité à accepter l'ajout d'autre source de carbone, notamment la mélasse. La mélasse sous forme solide a présenté une capacité de sporulation inférieure à celle du riz, du PDA mais également des parches de café et de cacao utilisés à 100%. Latifian *et al.*, 2014 firent le même constat sur la forme solide de la mélasse. Ils démontrèrent par contre l'efficacité de la mélasse sous sa forme liquide, comparativement à plusieurs céréales dont le riz, pour la production et la germination des spores de *M. anisopliae*. Son ajout pour certains milieux à base de parches de cacao a permis d'accroître la capacité de sporulation sur le cacao notamment pour les isolats Dme1, D23, D24 et Egl1.

part les milieux riz et PDA, les milieux à forte concentration en cacao sont les plus adaptés à la culture des isolats. Ces sucres constituent une source de carbone indispensable au développement du

champignon. L'étude du preferendum cultural montre que les différents milieux naturels à base de parches de cacao et de mélasse pour certains isolats. Les taux de sporulation de *Metarhizium anisopliae*, sur les milieux constitués majoritairement de parches de cacao, 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 milieux à base de saccharose commerciale se sont montrés les moins sporulants pour le développement de l'ensemble des isolats. La projection de notre essai à grande échelle permettra de concrétiser les résultats obtenus au sein du laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

- Aby N, Kehe, M, Kobenan K. and Gnonhour P: 2008. Recherche de souches locales de champignons parasites des charançons du bananier dans les principaux bassins de production de banane dessert en Côte d'Ivoire, Premier rapport d'étape Projet FIRCA/CNRA, 22p.
- Aby N: 2013. Lutte biologique contre le charançon noir du bananier *Cosmopolites sordidus* Germar (Coléoptère, Curculinodae) en Côte d'Ivoire : Caractéristiques entomopathologiques d'isolats locaux de *Metarhizium* sp. sur les populations au laboratoire et en bananeraie, mémoire de thèse de Doctorat présentée à l'UFR biosciences de l'université de Cocody, p169,
- Barry Y: 2006. La transformation des apports organiques dans le sol (modèle TAO) : cas des apports riches en azote. Master Recherche CGSE : UHP, Nancy, France, 31p.
- Kouadio DLM, Kouabenan AK, Kouadjo ZC, Kobenan K, Traore S. and Gnonhour: 2018. Caractérisation d'isolats locaux de *Metarhizium* spp, champignon entomopathogène de *Cosmopolites sordidus* germar, isolés des bananeraies en Côte d'Ivoire, European Scientific Journal, vol.14, No.19, No.20, et No.21.
- Kurtzman Rh. and Schwimmer S: 1971. Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experientia*, 27 (4), 481-482.
- Latifian M, Rad B. and Amani M: 2014. Mass production of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* by using agricultural products based on liquid- solid diphasic method for date palm pest control, *International Journal of Farming and Allied Sciences*
- Ochieng VO: 2001. Genetic biodiversity in banana weevil *Cosmopolites Sordidus* populations in banana growing regions of the world, Ph.D. Thesis, University of Nairobi, 139p.
- Perraud-Galme : 1995. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, 210 p.