

RAPPORT D'ACTIVITE : Septembre 1988 - Août 1989

**PRODUCTION DE SPORES DE
BEAUVERIA BASSIANA
EN REACTEUR A DISQUES**

O.R.S.T.O.M. - CALLIOPE

AUTEUR : E. GIRAUD

RESPONSABLES DE L'ETUDE : E. GIRAUD

M. RAIMBAULT

TECHNICIENNE : I. RIMBAULT

SOMMAIRE

<u>- CADRE DU TRAVAIL - OBJECTIFS</u>	p 1
<u>I. BIBLIOGRAPHIE</u>	p 3
<u>I.1. INTRODUCTION</u>	p 3
<u>I.2. <i>BEAUVERIA BASSIANA</i></u>	p 4
<u>I.3. LES DIFFERENTS PROCEDES DE PRODUCTION DE SPORES</u>	p 6
<u>II. MATERIELS ET METHODES</u>	p 8
<u>II.1. MICROORGANISME</u>	p 8
<u>II.2. MILIEUX DE CULTURE</u>	p 8
II.2.1. Milieu PDA	p 8
II.2.2. Milieu PDB	p 8
II.2.3. Milieu RIBA	p 9
II.2.4. Milieu H2	p 9
<u>II.3. TECHNIQUES DE PRODUCTION DE SPORES</u>	p 10
II.3.1. En fiole	p 10
II.3.2. En réacteur à disques	p 10
II.3.2.1. Description des réacteurs	p 10
II.3.2.2. Inoculation du milieu	p 12
II.3.2.3. Incubation	p 12

II.3.2.4. Récolte des spores	p 14
II.3.2.5. Viabilité des spores produites	p 14
II.3.2.6. Séchage des spores	p 15
<u>II.4. FERMENTATION LIQUIDE</u>	p 16
<u>II.5. ANALYSES</u>	p 17
II.5.1. Dénombrement des spores	p 17
II.5.2. Analyse des gaz	p 17
II.5.3. Dosage du glucose	p 19
II.5.4. Dosage de l'amidon	p 19
<u>III. RESULTATS ET DISCUSSION</u>	p 20
<u>III.1. VERIFICATION DES PERFORMANCES DE LA SOUCHE SUR MILIEU RIBA</u>	p 20
III.1.1. Croissance de <i>B.bassiana</i> sur milieu gélosé	p 20
III.1.2. Cinétique de sporulation	p 21
III.1.3. Rendements en nombre de spores/g de milieu et par cm ²	p 23
<u>III.2. OPTIMISATION DU MILIEU DE CULTURE</u>	p 23
III.2.1. Plan d'expériences PE1	p 24
III.2.2. Plan d'expériences PE 2	p 26
III.2.3. Conclusion et estimation des coûts des milieux	p 28
<u>III.3. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE</u>	p 30
III.3.1. Influence de la température	p 30
III.3.2. Influence de la luminosité	p 31
III.3.3. Influence de l'aération	p 31
III.3.4. Influence de l'humidité relative	p 33
III.3.5. Influence du mode d'inoculation	p 34

<u>III.4. MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE DE PRODUCTION EN REACTEUR A DISQUES</u>	p 35
III.4.1. Influence de la quantité de milieu	p 36
III.4.2. Optimisation de la quantité de milieu retenu à la surface des disques	p 37
III.4.2.1. Utilisation de nouveaux disques profilés	p 37
III.4.2.2. Utilisation de support absorbant	p 38
III.4.3. Fermentation en réacteur à disques sur support imprégné	p 41
III.4.4. Essai de réutilisation des supports	p 45
III.4.5. Fermentation liquide	p 45
III.4.5.1. Evolution de la biomasse	p 46
III.4.5.2. Evolution du pH	p 46
III.4.5.3. Evolution des substrats	p 47
III.4.6. Suivi des paramètres de fermentation	p 48
III.4.6.1. Analyse des gaz	p 48
III.4.6.2. Production de chaleur	p 50
III.4.7. Essai d'une fermentation avec une aération à 5 % d'H.R.	p 52
III.4.8. Mise au point d'un mode de récolte	p 53
III.4.8.1. Récolte en milieu liquide	p 53
III.4.8.2. Mise au point d'un mode de séchage	p 55
III.4.8.2.1. Test de viabilité	p 55
III.4.8.2.2. Essai de différents modes de séchage	p 56
III.4.8.3. Récolte à sec	p 57
III.4.9. Qualité du produit	p 58
<u>IV. RESUME - CONCLUSION</u>	p 59
<u>V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	p 61
ANNEXES	p 65

CADRE DU TRAVAIL - OBJECTIFS

L'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) a mis au point un procédé de production de spores de champignons filamenteux (brevet RAIMBAULT, ROUSSOS ; 1985 . [22]) .

La Société CALLIOPE, dans le cadre de son programme d'expansion vers le secteur des biotechnologies s'est intéressée à ce procédé pour l'adapter plus particulièrement à la production de spores de *Beauveria bassiana*. Pour la mise en oeuvre du procédé au niveau industriel , un contrat d'étude d'un an entre CALLIOPE et l'ORSTOM a été signé.

Cette étude se décompose en 4 étapes, s'attachant chacune d'une manière différente à accroître le "know-how" de la production de spores de *B.bassiana* en vue de son industrialisation.

a) Vérification des rendements de production sur milieu RIBA

Cette étape comprend :

- La mise au point et la standardisation des techniques de culture, de production et d'analyse.
- L'estimation des rendements en spores/cm² et par g de milieu.
- La détermination du temps de production.

Ces rendements de production ont servi de base aux calculs d'extrapolation du procédé.

b) Optimisation du milieu de culture

Cette étude a été conduite en utilisant des plans d'expériences factorielles 2³ afin de cerner rapidement l'influence des différents constituants du milieu.

c) Optimisation des conditions de culture

Nous avons étudié en fioles l'influence des paramètres suivants :

- Température
- Luminosité
- Aération
- Humidité relative
- Mode d'inoculation

d) Mise au point d'une méthodologie de production en réacteur à disques

Cette étape, la plus importante du programme, a été menée en parallèle avec la précédente . Elle comprend les études suivantes :

- Fermentation sur milieu gélosé
- Optimisation de la quantité de milieu retenu sur les disques
- Fermentation sur support imprégné
- Suivi des paramètres de fermentation (O_2 , CO_2 , T°)
- Mode de récolte
- Qualité du produit (pureté, viabilité)

Elle nous a permis d'acquérir le savoir faire de la fermentation en réacteur à disques au stade du laboratoire. Elle doit permettre d'évaluer l'intérêt de la poursuite de cette étude à un stade pilote.

BIBLIOGRAPHIE

I BIBLIOGRAPHIE

1.1. INTRODUCTION

Dans la nature, les insectes sont soumis à de nombreuses maladies provoquées par des microorganismes . virus, champignons, bactéries. Parmi eux, les champignons entomopathogènes présentent la particularité de pouvoir contaminer les insectes non seulement par ingestion mais également par pénétration au travers de la cuticule qui semble être le site privilégié d'infection [1].

Ces champignons sont des candidats potentiels pour la lutte microbiologique contre les insectes ravageurs de culture, et sont déjà utilisés dans certains pays..

Ainsi en U.R.S.S ., une biopréparation semi-industrielle la "boverine" à base de spores de *B. bassiana* est utilisée dans la lutte contre le coléoptère (*Leptinotarsa decemlineata*), [2].

Les chinois, en utilisant des techniques artisanales de production et d'application de ce champignon, traitent annuellement plusieurs millions d' hectares contre la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis* Hübner)[3].

Dans les pays occidentaux, plusieurs produits sont homologués ou en cours d'homologation, (Auge Jacques ; 1985. [4]) :

- MYCAR : biopréparation d' *Hirsutella thompsonii* FISHER homologuée par Abbot Laboratories en 1981 aux USA contre 2 espèces d'acariens prédateurs des citrus.

- VERTALEC, MYCOTAL et THIPTAL : 3 produits à base de spores de 3 souches distinctes de *Verticillium lecanii* exploités par Tate et Lyle Ltd (Grande-Bretagne) pour la protection des cultures florales (chrysanthèmes) et maraîchères (concombres) sous serres (insectes cibles : pucerons, aleurodes et thrips, ainsi que l'acarien phytophage *Tetranychus urticae*).

- BIOCONTROL, BIOMAX, COMBIO, METABIOL et METAPOL : 5 biopréparations de *Metarhizium anisopliae* homologuées en 1981 au Brésil pour protéger la canne à sucre et les pâturages des attaques des Cercopides.

A l'heure actuelle, aucune biopréparation à base de spores de *B.bassiana* n'est homologuée

dans les pays occidentaux. Cependant des essais expérimentaux menés en France ont démontré l'efficacité de ce champignon dans la protection de culture de maïs contre le ravageur *O. nubilalis* (Hübner) ([5], [6]).

Un projet a donc été mis en place afin de déterminer les possibilités d'industrialisation de la production de spores de *B. bassiana* en vue de sa commercialisation.

I.2. BEAUVERIA BASSIANA

a) Présentation :

B. bassiana est un champignon entomopathogène de la classe des Deutéromycètes caractérisé par une structure somatique, des hyphes septés et une absence de reproduction sexuée connue.

B. bassiana appartient à la famille des Moniliales et se multiplie par l'intermédiaire des spores asexuées : les conidiospores ou conidies. Le genre *Beauveria* est caractérisé par un conidiophore géniculé et l'espèce *B. bassiana* se distingue par la forme sphérique de ces conidies [7]. Ce champignon dont la distribution géographique est très vaste, est pathogène pour plusieurs ordres d'insectes importants en agriculture :

- Coléoptère (*Leptinotarsa decemlineata*), [8-9]
- Lépidoptère (*Ostrinia nubilalis*), [10]
- Hémiptère (*Blissus leucopterus leucopterus*)[11]

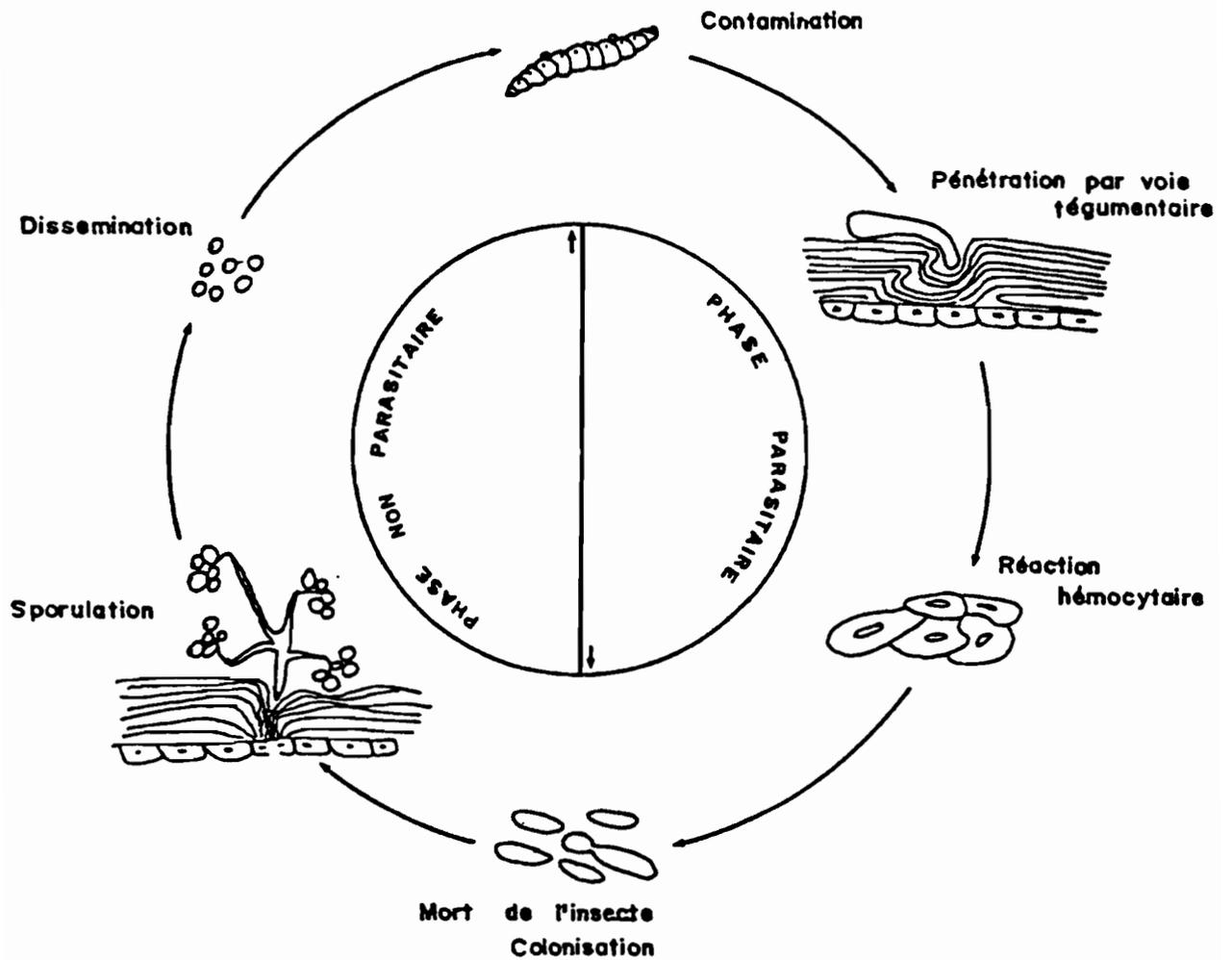
b) Cycle biologique

B. bassiana est un parasite facultatif dont le cycle comporte 2 phases (cf : FIG N°1) :

- une phase parasitaire
- une phase non parasitaire

L'entrée du champignon dans l'insecte par la voie tégumentaire semble être la cause principale d'infection. La spore germe à la surface de l'insecte en développant un tube germinatif qui traverse la cuticule par des processus physiques et enzymatiques.

Une fois la barrière tégumentaire franchie le champignon atteint l'hémolymphe. Le mycélium se fragmente alors par bourgeonnement en émettant des éléments fongiques unicellulaires



FIGN°1 : Cycle de developpement de Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin d'après Myrian tigano.[13].

allongés : les blastospores. Il doit surmonter les réactions cellulaires de l'hôte qui aboutissent à la formation d'un pseudo-tissu emprisonnant le mycélium, en constituant un granulome.

La production de toxines, telle la beauvéricine de structure cyclodepsipeptique est particulièrement importante car elle provoque une désorganisation de ces granulomes, [12] cité par (Myrian Tigano, 1985, [13]).

La mort de l'insecte semble être liée à l'activité de cette toxine ou à la colonisation de l'hémolymphe. Le champignon se développe ensuite en saprophyte, il envahit l'ensemble des tissus du cadavre, puis il retransverse le tégument et si l'humidité relative est proche de la saturation, il sporule en surface.

L'absence de septicémie au cours de cette phase saprophytaire semble être liée à la production par le champignon d'une substance antibactérienne : l'oosporéine, un pigment rouge responsable de la couleur rose-violacée du cadavre.

c) Influence de la dose de spores

Il a été démontré qu'il existait une corrélation positive très significative entre la mortalité des larves et la quantité de spores utilisées [14].

Ainsi G.Riba recommande l'utilisation d'une préparation à base de spores de *B.bassiana* sous une formulation granulée à la dose de 10^{13} spores/ha pour assurer une réduction de 96% de la population de ravageurs d'*O.nubilalis* [15].

La production d'aussi grandes quantités de spores nécessaires pour assurer un effet biopesticide efficace ne peut être résolue qu'à l'échelle industrielle.

I.3) LES DIFFERENTS PROCEDES DE PRODUCTION DE SPORES

La plupart des hyphomycètes pathogènes produisent 2 types de propagules infectueuses.

- Les conidiospores ne sont obtenues que par sporulation du champignon à la surface du milieu.

- Les blatospores (organe de multiplication obtenu par bourgeonnement des hyphes) sont

facilement produits en milieu liquide et aéré.

La parfaite maîtrise des techniques de fermentation liquide depuis une vingtaine d'années ont orienté les recherches vers la production de ces blastospores [16, 17, 18]. Cependant ces propagules ont l'inconvénient majeur d'être peu persistantes dans la nature [16, 19]. Les difficultés rencontrées au niveau de leur conservation sont telles que la technique de production en milieu liquide a pratiquement été abandonnée.

Différentes techniques de culture en surface pour la production de conidiospores sont connues [20] :

- La plus artisanale consiste à cultiver le champignon sur milieu gélosé soit en boîte de Pétri, soit en fioles de Roux. Cette technique est difficilement transposable à l'échelle industrielle en raison des manipulations nombreuses qu'elle nécessite, de son rendement assez faible et surtout de la place indispensable au stockage de nombreux vases de culture.

- La technique de production de spores en plateaux consiste elle , à cultiver le champignon sur des substrats végétaux tels que : son de blé, paille ou résidus amylacés, disposés en couches de quelques centimètres d'épaisseur et placés dans des étuves d'incubation.

Cependant, le produit obtenu est constitué non pas de spores pures mais d'un mélange de spores, mycélium et résidus végétaux. De plus, la récolte des spores et le maintien des conditions aseptiques sont particulièrement délicats. Ce procédé a été néanmoins retenu en U.R.S.S. et en Chine [21,3], à défaut d'une technique plus aisée.

- Un nouveau procédé original de culture en surface (fermenteur à disques) a été breveté par l'O.R.S.T.O.M. (RAIMBAULT, ROUSSOS ;1985. [22]). Ce procédé permet :

- . d'optimiser le rapport surface de culture/volume de réacteur,
- . d'assurer des conditions d'aseptie strictes ,
- . de récolter facilement les spores par simple lavage des surfaces.

Il résoudrait ainsi les problèmes rencontrés par les autres procédés décrits précédemment .

Ce procédé prometteur a été retenu pour l'étude de la production de spores de *B.bassiana* au stade laboratoire. Cette étude a pour objet d'évaluer les avantages et inconvénients ainsi que les possibilités d'extrapoler un tel procédé à l'échelle pilote ou industrielle.

MATERIELS ET METHODES

II MATERIELS ET METHODES

II.1. MICROORGANISME

Nous avons utilisé la souche *B.bassiana* (B.b. 147) de la mycothèque I.N.R.A. de la station La Minière, qui nous a été fournie par CALLIOPE. Cette souche isolée d'une chenille de pyrale en état de diapause récoltée en Beauce durant l'automne 1980, a été sélectionnée en raison de sa virulence élevée à l'égard d'*O.nubilalis* [10]. Elle est cultivée sur milieu Riba en tube de gélose inclinée à 25°C ± 1 et à l'obscurité.

Après 7-10 jours d'incubation, elle est conservée à 4°C pendant plusieurs mois.

II.2.MILIEUX DE CULTURE

Ils sont stérilisés par autoclavage à 110°C pendant 30 mn.

II.2.1. Milieu PDA

Le Potato Dextrose Agar (PDA.Difco) est constitué des éléments suivants :

II.2.2. Milieu PDB

- | | |
|------------------------------|---------|
| - Dextrose | : 20 g |
| - Infusion de pomme de terre | : 200 g |
| - Agar | : 15 g |
| - Eau distillée | : 1 l |

Le potato Dextrose Broth (PDB . Difco) a la même composition que le PDA à l'exception de l'agar.

II.2.3. Milieu Riba

- KH ₂ PO ₄	: 0,4 g
- Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	: 1,75 g
- MgSO ₄ ·7H ₂ O	: 0,6 g
- KCl	: 1 g
- NH ₄ NO ₃	: 0,7 g
- Glucose	: 10 g
- Extrait de levure	: 5 g
- Chloramphénicol	: 0,5 g
- Eau distillée	: 1l

pH = 7

Remarque : Suivant le procédé de production de spores, on est amené à rajouter de l'agar à une concentration de 16 g/l.

II.2.4. Milieu H2

- Glucose	: 50 g
- Amidon	: 40 g
- Extrait de levure	: 10 g
- (NH ₄) ₂ SO ₄	: 3,5g
- NaNO ₃	: 4,5 g
- KH ₂ PO ₄	: 3 g
- Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	: 13,12 g
- MgSO ₄ ·7H ₂ O	: 1,8 g
- KCl	: 1g
- Alanine	: 1 g
- Chloramphénicol	: 0.25 g
- Eau distillée	: 1l

pH = 7

Remarque : le glucose et les phosphates sont stérilisés séparément du milieu afin d'éviter la formation de précipité et les réactions de Maillard. Selon les expériences, on ajoute à ce milieu 16 g/l d'agar.

II.3. TECHNIQUES DE PRODUCTION DE SPORES

II.3.1. En fiole

Les fioles et les milieux sont stérilisés séparément. Après refroidissement à 40-45°C, les milieux sont répartis dans des fioles de 250 ml à raison de 25 ml/fiole, puis rapidement inoculés en masse ($1,25 \cdot 10^7$ spores/fiole) avant gélication.

Les fioles sont mises alors à incuber dans une étuve à $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ$. L'aération des cultures se fait par simple diffusion de l'air par le bouchon légèrement dévissé.

Après 7 jours, les spores sont récoltées dans 100 ml d'eau distillée additionnée de Twen 80 (0,1 ml) à l'aide d'un barreau aimanté, de cinquante billes de verre de diamètre de 4 mm et par agitation pendant 20 mm. Les spores produites en surface sont ainsi mises en suspension puis dénombrées.

II.3.2. En réacteur à disques

2 modes opératoires ont été utilisés :

- sur milieu gélosé comme cela a été décrit par M^r RAIMBAULT [22]
- sur support absorbant imprégné de milieu de culture liquide.

II.3.2.1. Description des réacteurs

- Fermenteur de 1,7 l (cf : photo N°1)

Le fermenteur est constitué d'une cuve cylindrique en pyrex et à une de ses extrémités, d'une platine en inox.

La cuve est munie d'une sortie basse afin de permettre l'évacuation du milieu excédentaire, et d'une sortie haute pour permettre l'évacuation de l'air.

La platine est équipée de dispositifs d'alimentation en air et de contrôle de la température, elle possède un axe rotatif supportant un empilement de disques d'un diamètre légèrement inférieur au diamètre de la cuve. Les disques espacés de 10 mm par des entretoises sont constitués selon les cas :

- de 2 grilles en inox
- d'un support absorbant pris entre 2 grilles.

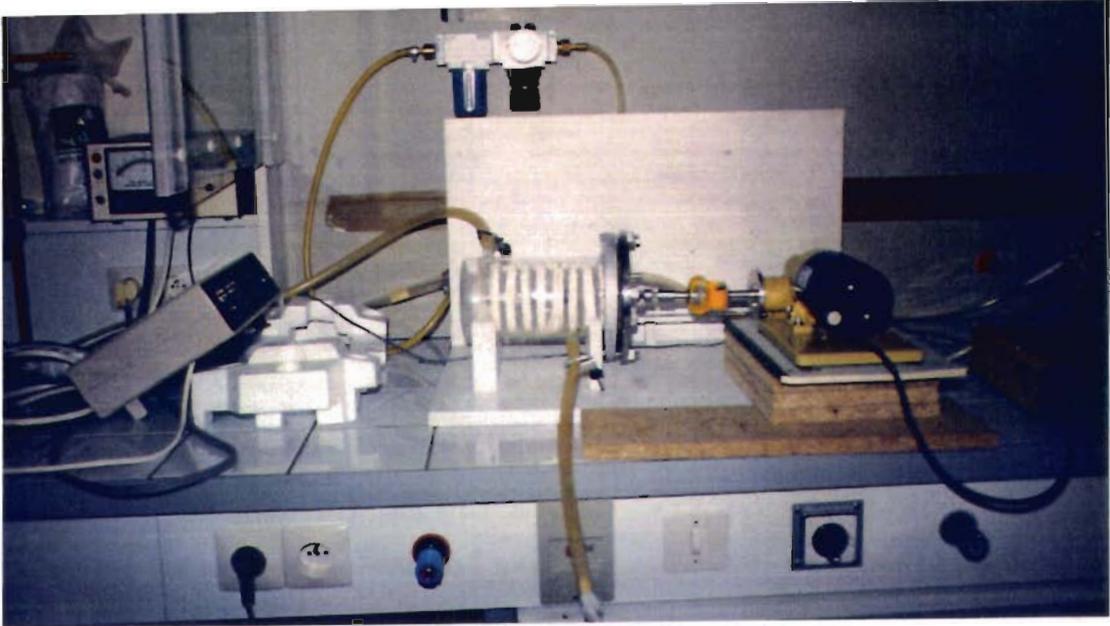


PHOTO N° 1 : Fermenteur à disques de 1.7l

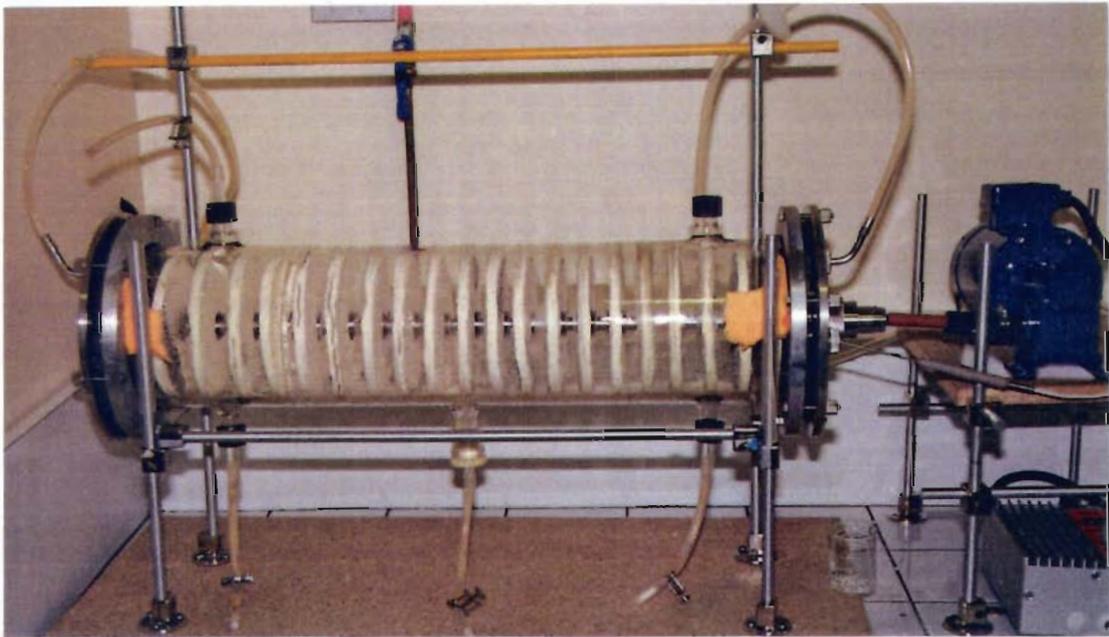


PHOTO N° 2 : Fermenteur à disques de 12.4l

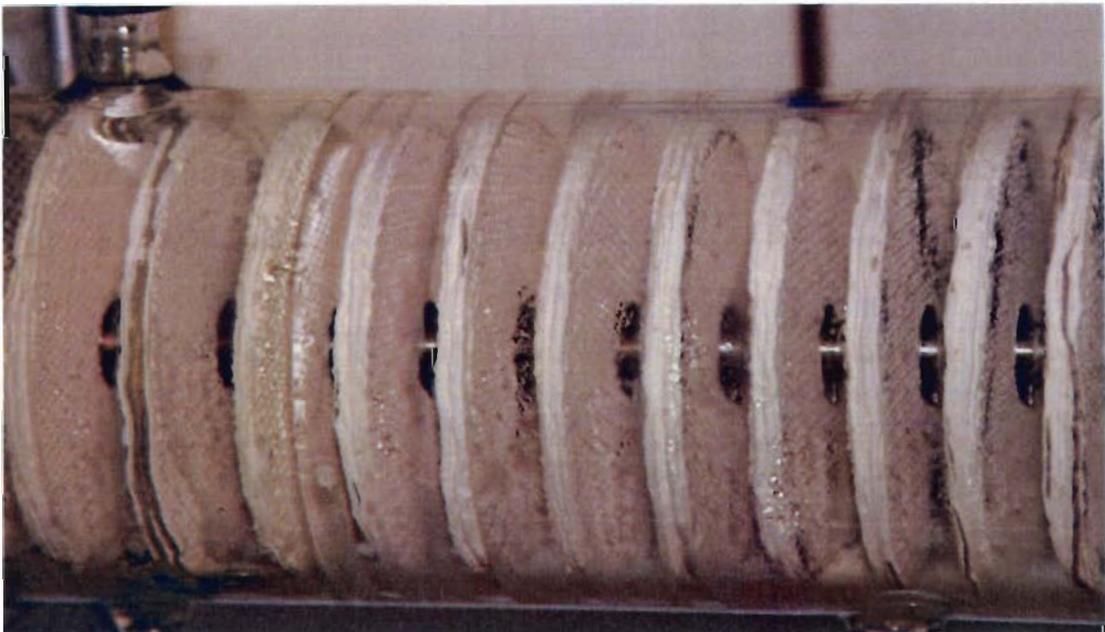


PHOTO N° 3 : Detail des disques du fermenteur de 12.4l

Le nombre de disques pouvant être empilés dans ce fermenteur est de 8, soit une surface utile de 1080 cm².

- Fermenteur de 12,4 l (cf : FIG N°2 et photo N°2 et 3)

Ce fermenteur est une extrapolation du réacteur de 1,7 litres. A la différence de celui décrit précédemment, il est constitué d'une cuve en verre fermée hermétiquement par deux platines en inox. Cette cuve est munie de deux entrées hautes et trois sorties basses. Les platines sont équipées de façon à permettre le contrôle de la température, et à assurer l'entrée et la sortie de l'air. Le nombre de disques empilés dans ce réacteur est de 30, soit une surface utile de 9 900 cm².

II.3.2.2. Inoculation du milieu

Le milieu préalablement stérilisé dans un flacon, est refroidi à 40-45°C puis inoculé avec une suspension de conidiospores à une concentration connue (3 10⁸ spores/l de milieu). Il est ensuite transvasé stérilement dans la cuve du réacteur préalablement stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 mm.

Remarque : dans le cas d'une fermentation sur milieu gélosé, il est possible de stériliser directement le milieu dans le réacteur

Une rotation des disques à faible vitesse 10t/mn permet de retenir le milieu à la surface des disques. Le milieu excédentaire est ensuite évacué par les sorties basses du réacteur avant la gélification du milieu.

II.3.2.3. Incubation

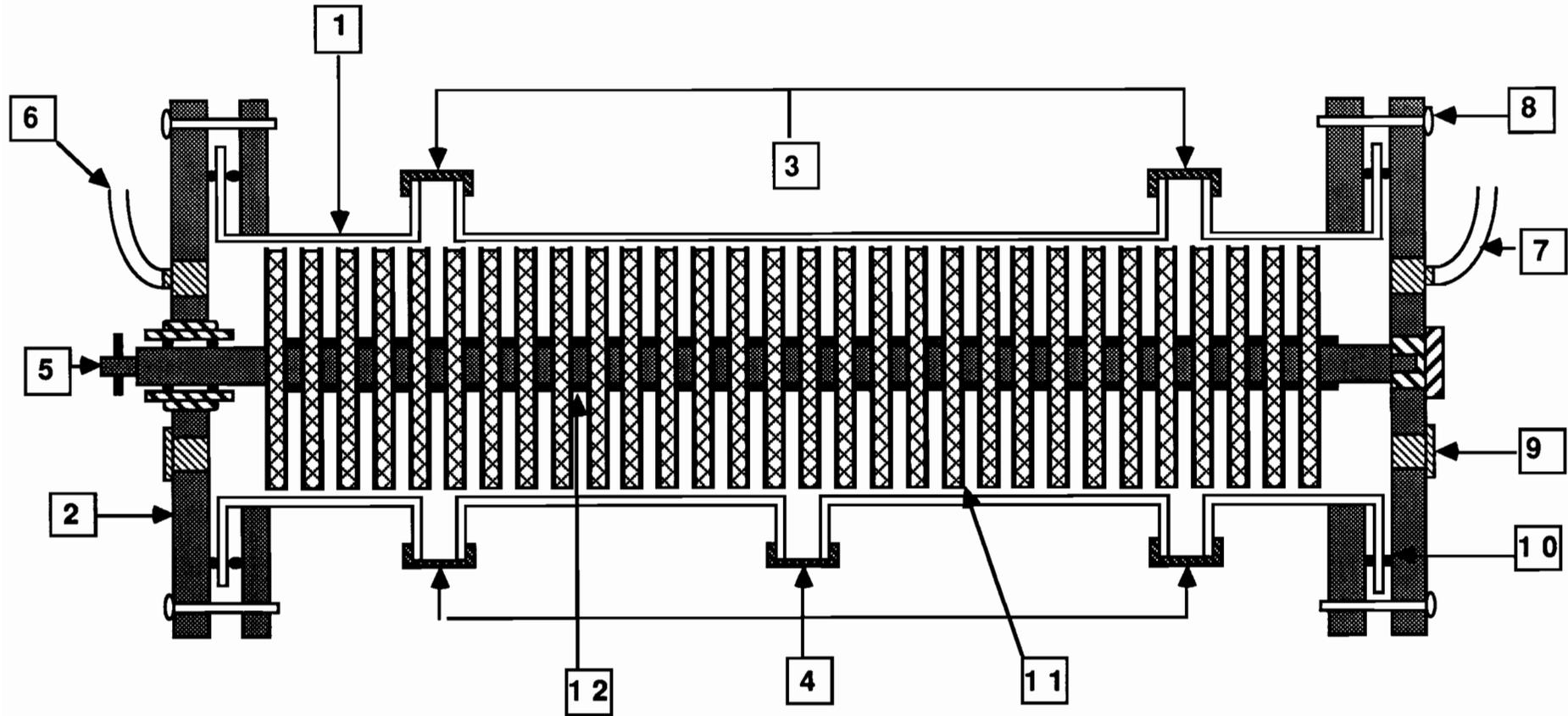
Le réacteur est placé dans une enceinte thermostatée à 25°C. Le temps d'incubation est de 7 jours sur milieu gélosé et de 8 jours sur support absorbant . Dans ce dernier cas, il est nécessaire de maintenir une lente rotation des disques pour assurer une bonne homogénéisation du milieu sur les supports.

L'aération de la culture est réalisée par passage d'un flux d'air stérile et humidifié par barbotage dans de l'eau. Le débit d'aération est de :

- 50 ml/mn à 70ml/mn pour le réacteur de 1,7 l.

- 500 ml/mn à 4,5 l/mn pour le réacteur de 12,4 l

FIG N°2 : SCHEMA DU FERMENTEUR A DISQUES DE 12.4 L



- | | | |
|-------------------------|---------------------|-------------------|
| 1: Cuve en pyrex | 5: Axe | 9: Bouchon plasma |
| 2: Platine en inox | 6: Entrée d'air | 10: Joint torique |
| 3: Entrée du milieu | 7: Sortie d'air | 11: Disque |
| 4: Evacuation du milieu | 8: Ecrou de serrage | 12: Entretoise |

Remarque : dans certains cas, nous avons analysé les pourcentages d'O₂ et de CO₂ dans les gaz de sortie des réacteurs au cours de la fermentation.

II.3.2.4. Récolte des spores

Les spores produites à la surface des disques sont récoltées par 5 lavages successifs en introduisant dans le réacteur de 300 ml à 3 l (suivant la taille du réacteur) d'eau distillée additionnée de Tween 80 à 1% et en maintenant une rotation rapide (500t/mn) des disques pendant 30 mn.

Les spores mises ainsi en suspension sont ensuite dénombrées.

II.3.2.5. Viabilité des spores produites

Pour vérifier que les spores produites dans le réacteur à disques étaient viables, c'est à dire qu'elles étaient capables de germer, nous avons utilisé les 2 techniques suivantes :

- Estimation de la viabilité sur boîte de Pétri

Après extraction des spores par lavages, on réalise un dénombrement direct à la cellule de Malassez de façon à connaître le titre exacte en spores de la suspension. On procède ensuite à des dilutions successives de façon à obtenir un nombre de colonies par boîte de Pétri compris entre (30-100). L'utilisation d'une solution de Tween 80 à faible concentration (0,05 %) est nécessaire pour obtenir des suspensions homogènes. 100µl de la dilution choisie sont étalés sur milieu PDA à l'aide de billes de verre stérilisées.

Les colonies sont dénombrées après 48 h d'incubation à 25°C.

- Estimation de la viabilité sur cellule de Malassez

Pour cette technique, nous avons réalisé dans un premier temps une cinétique de germination. Trois erlens contenant 25 ml de milieu liquide PDB sontensemencés de façon à obtenir 20 10⁵ spores/ml et mis à incuber à 25°C dans un agitateur rotatif

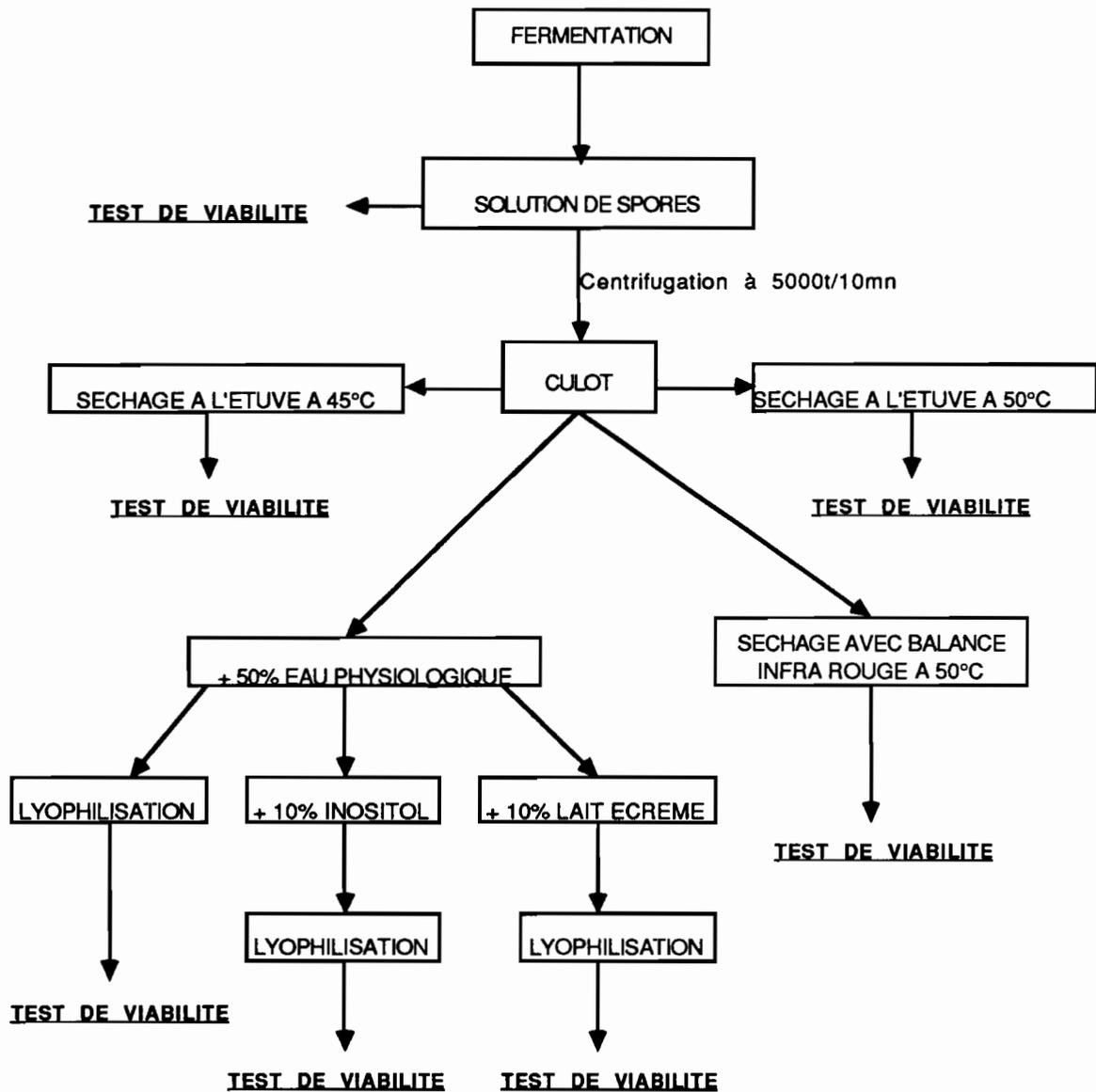
Les observations au microscope sur cellule de Malassez sont effectuées sur des prélèvements réguliers de chaque erlen afin d'établir le pourcentage de germination. Nous avons considéré qu'une spore avait germé lorsque la taille du tube germinatif était supérieure ou égale au dia-

mètre le plus grand de la spore. Nous avons pu en déduire ainsi le temps T où le pourcentage de germination atteint un maximum. La viabilité des spores produites est ainsi estimée par comptage direct des spores germées et non germées à la cellule de Malassez, de façon à déterminer le pourcentage de germination après un temps T d'incubation.

II.3.2.6. Séchage des spores

Après récolte des spores par lavages, nous avons testé différents modes de séchage.

Le protocole opératoire est le suivant :



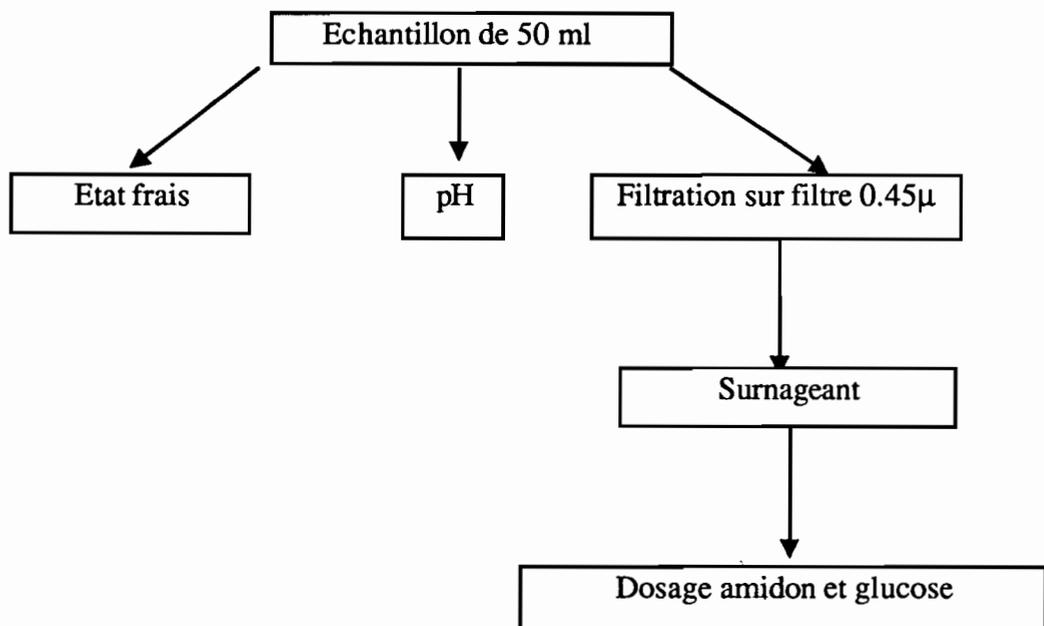
II.4. FERMENTATION LIQUIDE

Une fermentation liquide a été réalisée afin d'observer la croissance de *B. bassiana* en milieu liquide H₂. Un fermenteur biolafitte de 2 l contenant 1 500 ml de milieu liquide H₂ est stérilisé à 110 °C pendant 30 mn et inoculé avec une suspension de spores de *B. bassiana* à raison de 5 10⁸ spores/l de milieu. Pendant la fermentation, la température est maintenue à 25°C, l'agitation à 500t/mn et le % d'O₂ dissous à son maximum. Le pH n'est pas régulé, mais sa valeur a été enregistrée.

Au cours de la fermentation des prélèvements à intervalles réguliers sont effectués afin de suivre les paramètres suivants :

- Glucose et amidon résiduels
- pH
- Evolution de la croissance au microscope.

Le protocole utilisé est décrit ci-dessous :



II.5 ANALYSES

II.5.1. Dénombrement des spores

Une suspension homogène de spores est convenablement diluée afin d'obtenir entre 30-60 spores par unité de comptage d'un hématimètre type Malassez . Le comptage a été réalisé en calculant le nombre moyen (n) à partir de 20 unités de comptage . Le nombre de spores (N) contenues par ml d'une suspension est ensuite calculé en utilisant la formule suivante :

$$N = n \cdot (1/D) \cdot 10^5$$

N = nombre de spore/ml de la suspension concernée

n = nombre moyen de spores dans une unité de comptage

D = facteur de dilution

II.5.2. Analyse des gaz

Le dosage des sucres résiduels, de la biomasse ainsi que la mesure du pH n'étant pas accessibles au niveau des réacteurs à disques, nous avons suivi la fermentation en analysant l'O₂ consommé et le CO₂ produit. Ils sont mesurés en continu dans le flux d'air sortant des réacteurs, dont le débit est connu et constant .

Les appareils utilisés sont :

- Un Beckman LB2 (Medical CO₂ analyseur) comportant une cellule infrarouge
- Un Beckman OM11 (Medical O₂ analyseur) comportant une électrode polarographique.

L'air sortant des réacteurs est séché en passant dans une colonne de condensation à 2°C puis par passage à travers une colonne de silicagel (sel hydrophile). Une partie de ce flux d'air séché est aspiré vers les sondes des analyseurs.

Les appareils sont reliés à un enregistreur afin de visualiser directement les pourcentages d'O₂ et de CO₂ du flux d'air sortant.

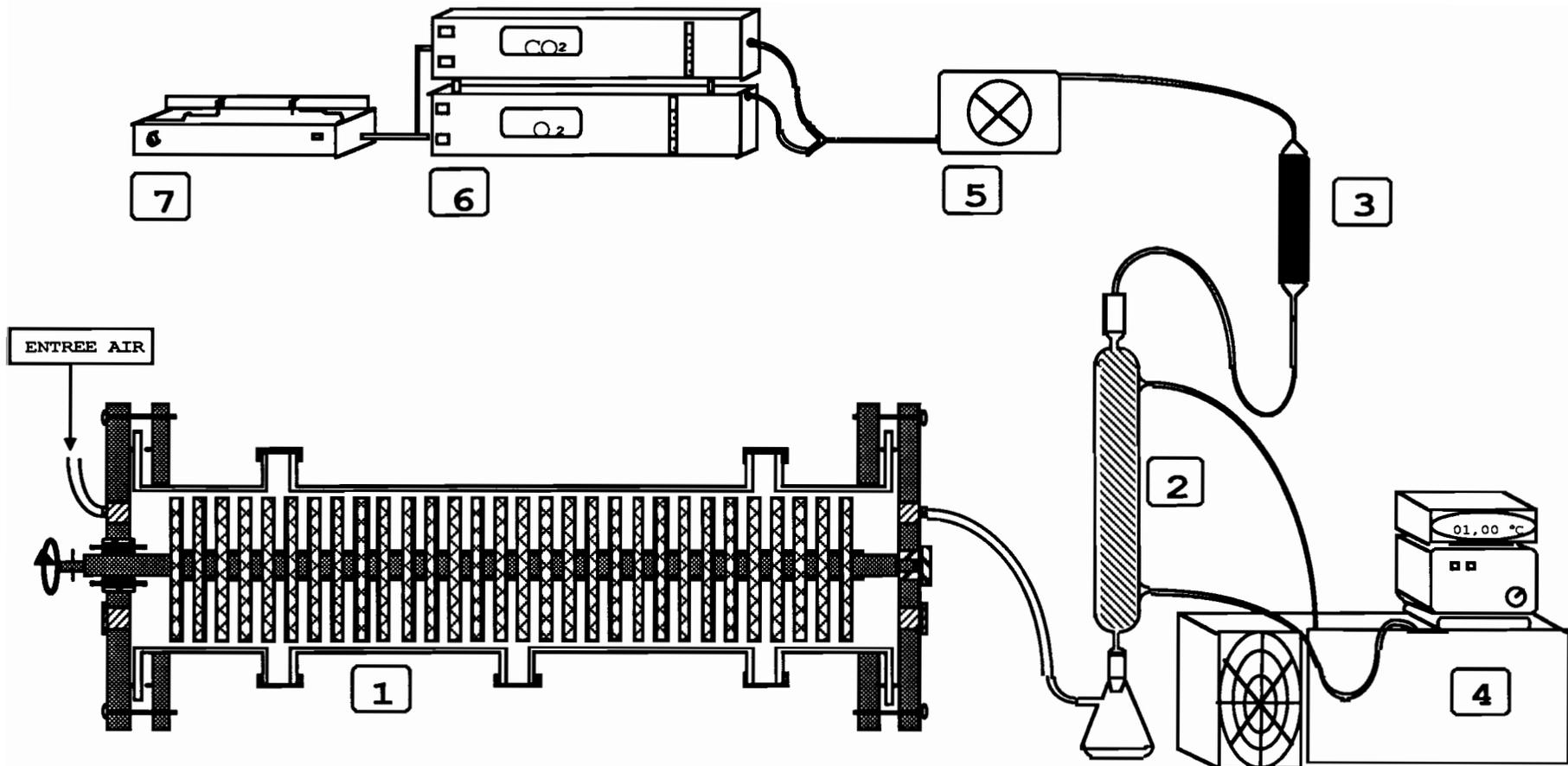


FIG N° 3 : DISPOSITIF D'ANALYSE DES GAZ

1. Fermenteur de 12.4l
2. Colonne de condensation
3. Colonne de silicagel
4. Système de refroidissement
5. Pompe
6. Analyseurs
7. Enregistreur

II.5.3. Dosage du glucose

Il est dosé suivant la méthode du kit UV Boehringer. Le glucose n'absorbant pas à une longueur d'onde caractéristique, on le dose par l'intermédiaire du NADPH₂ apparu par le jeu des 2 réactions suivantes :



La concentration en NADPH₂ est déterminée par spectrophotométrie à 340nm

II.5.4. Dosage de l'amidon

Il est dosé suivant une méthode colorimétrique à l'iode. On mesure à 620 nm la formation du complexe amidon-iode. Le réactif iodo-ioduré est préparé en diluant à 4 % une solution contenant :

- KI : 15g
- I₂ : 1,5g
- H₂O : 500ml

La réaction colorée est obtenue en ajoutant 0,1 ml de l'échantillon à 2,4 ml de réactif iodo-ioduré. Une gamme a été établie pour des concentrations en amidon soluble comprises entre 0.5g/l et 10g/l pour lesquelles il y a proportionnalité.

RESULTATS ET DISCUSSION

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. VERIFICATION DES PERFORMANCES DE LA SOUCHE SUR MILIEU RIBA

Afin de déterminer les perspectives financières que pouvait lui offrir la mise en vente sur le marché d'un biopesticide à base de spores de *B.bassiana*, la société CALLIOPE avait déjà réalisé une première évaluation économique[23].

Au cours de cette étude, le scaling up avait été envisagé sur la-base des critères suivants :

- Dose nécessaire pour traiter un ha : 10^{13} spores
- Superficie de fermenteur nécessaire : $3m^2/ha$
- Cycle de production : 8 jours

Ces critères ont été déterminés à partir de résultats d'essais en champs et des rendements obtenus en boîtes de Pétri sur milieu RIBA.

Il était nécessaire dans un premier temps de vérifier ces deux derniers critères d'extrapolation, ce qui nous a permis également de nous familiariser avec les différentes techniques d'analyses et de culture.

III.1.1. Croissance de *B.bassiana* sur milieu gélosé

Environ 48 h après l'ensemencement, une légère pellicule blanchâtre recouvre toute la superficie de la boîte, le mycélium s'est développé.

A 72 h, la culture est beaucoup plus dense : on note au microscope l'apparition de cellules conidiogènes ainsi que la formation de spores.

Après 5 jours d'incubation, la pellicule devient poudreuse et atteint au maximum 0,5 à 1 mm d'épaisseur. On observe alors uniquement des spores à l'examen microscopique.

A partir de ce stade, l'aspect de la boîte ne change plus à l'exception d'une légère modification de la couleur (le blanc vire au beige très clair) due au vieillissement de la culture.

Les principales observations décrites ici sont illustrées par les photographies de la page suivante .

III.1.2. Cinétique de sporulation

L'objectif de cette étude est de déterminer le temps d'incubation nécessaire à l'obtention de l'optimum de sporulation. Le dénombrement des spores produites en fonction du temps a été réalisé à partir de cultures en fioles âgées de 3, 5, 7, 10, 13 et 15 jours.

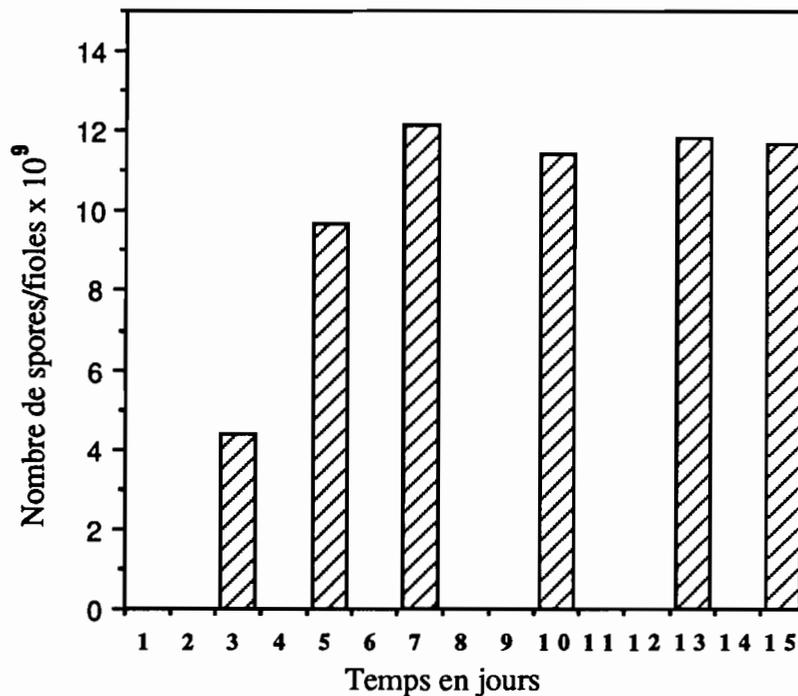


FIG N°4 : Cinétique de sporulation de *B. bassiana* sur milieu RIBA

La productivité est optimale après un temps de culture de 7 jours. La poursuite de l'incubation au delà de ce temps conduit à une chute de productivité car le nombre de spores n'augmente plus.

Remarque : il est ressorti de plus de cette première étude, qu'il est préférable d'effectuer chaque test sur au moins trois fioles afin d'affiner les résultats obtenus.

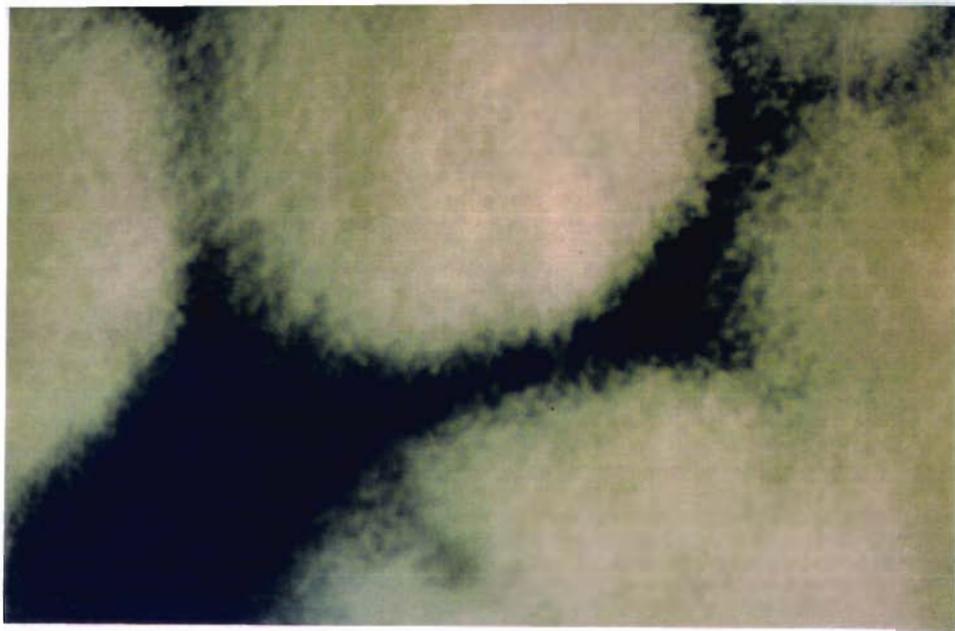


PHOTO N°4 : Colonie de *Beauveria bassiana* (x 10)

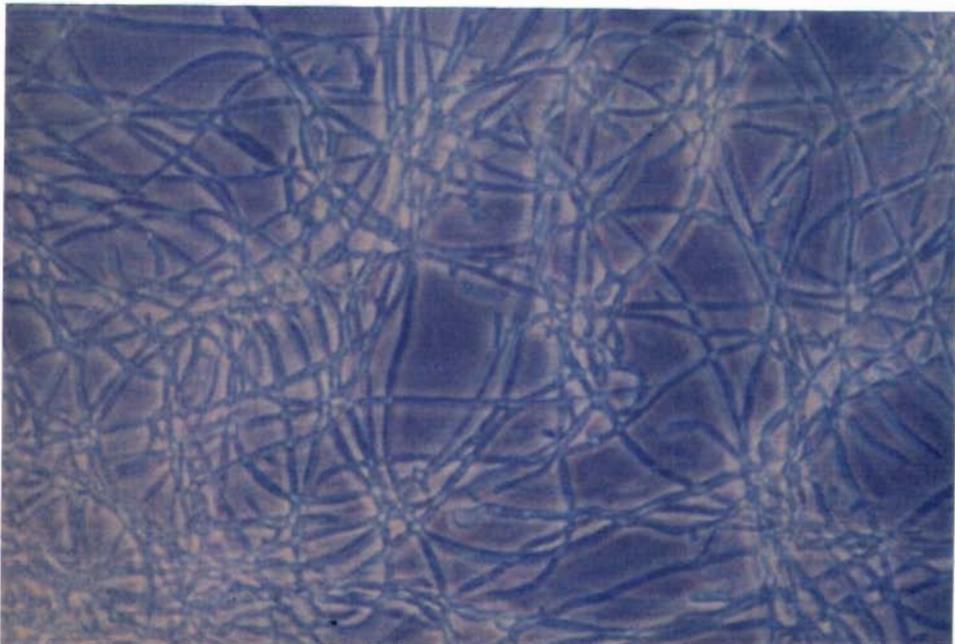


PHOTO N° 5 : Mycélium de *Beauveria bassiana* (x 400)

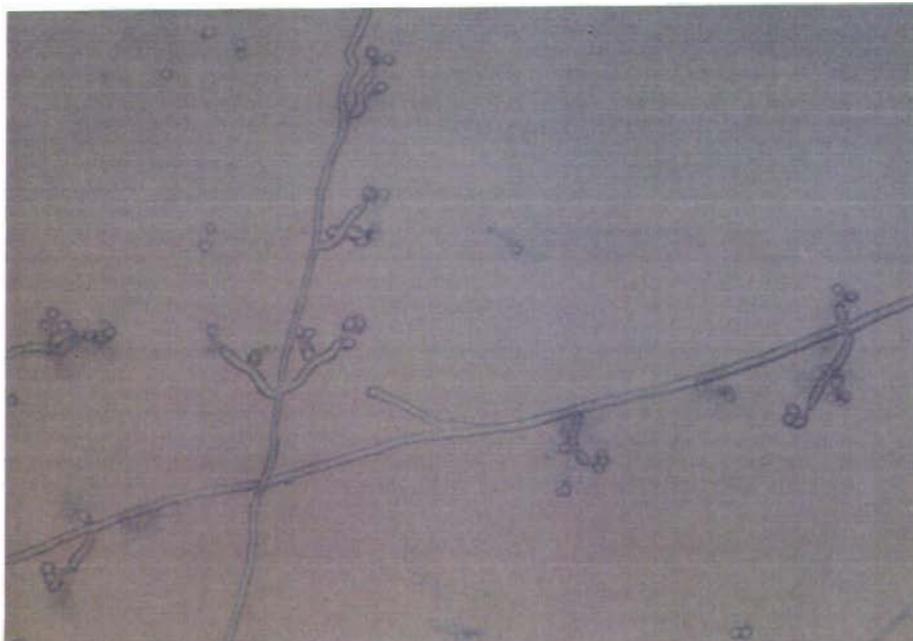


PHOTO N° 6 : Structures sporifères de *Beauveria bassiana* (x 400)

III.1.3. Rendements en nombre de spores/g de milieu et par cm².

Cette manipulation est réalisée sur 3 boîtes de Pétri (surface de 70 cm²) contenant chacune 25ml de milieu RIBA. Nous obtenons après 8 jours d'incubation : $1,67 \cdot 10^{10} \pm 0,32 \cdot 10^{10}$ spores/boîte, soit des rendements de :

- $2,38 \cdot 10^8 \pm 0,46 \cdot 10^8$ spores/cm²
- $6,68 \cdot 10^8 \pm 1,28 \cdot 10^8$ spores/g de milieu de culture

Ainsi pour obtenir 10^{13} spores sur milieu RIBA :

- la surface nécessaire est de : $4,2 \pm 0,81$ m²
- la quantité de milieu est de : $1,5 \pm 0,29$ Kg

Les résultats obtenus au cours de cette première étape montrent que :

- la production de spores de *B.bassiana* sur milieu gélosé est aisée
- le cycle de production sur milieu RIBA peut être réduit à 7 jours de culture
- la surface de fermenteur nécessaire pour produire 10^{13} spores est de $4,2 \pm 0,8$ m², donc légèrement supérieure à celle retenue pour le calcul du scaling up.

III.2 OPTIMISATION DU MILIEU DE CULTURE

La démarche classique d'optimisation d'un milieu de culture consiste à faire varier successivement chaque facteur, en maintenant les autres constants, ceci conduit naturellement à un nombre élevé d'expériences.

L'utilisation de plans d'expériences permet de déterminer l'influence des paramètres étudiés dans une même série d'expériences avec un nombre minimum d'essais [24,25]. C'est cette deuxième approche qui a été choisie.

Deux plans d'expériences ont été réalisés :

- Le premier pour trier rapidement parmi les différents constituants du milieu RIBA ceux qui ont un effet sur la réponse
- Un deuxième pour affiner la réponse et étudier l'influence de nouveaux constituants.

Les matrices d'expériences utilisées sont des matrices factorielles 2^3 avec $N = 8$.

MILIEU	NIVEAU DES FACTEURS							RESULTAT
	1	2	3	4	5	6	7	
A	-	-	-	+	+	+	-	Y1
B	+	-	-	-	-	+	+	Y2
C	-	+	-	-	+	-	+	Y3
D	+	+	-	+	-	-	-	Y4
E	-	-	+	-	-	-	+	Y5
F	+	-	+	-	+	-	-	Y6
G	-	+	+	-	-	+	-	Y7
H	+	+	+	+	+	+	+	Y8

TAB N°1 : Matrice d'expériences 2^3

Chaque facteur est étudié à deux niveaux noté -1 et +1. Dans notre cas, la réponse Y à un milieu testé est le nombre de spores produites par erlen. La moyenne des résultats des 8 expériences est notée b_0 .

$$b_0 = \sum_{i=1}^8 Y_i / 8 \quad Y_i = \text{réponse à l'expérience } i$$

L'effet de chaque constituant est noté b_j

$$b_j = \sum_{i=1}^8 X_i Y_i \quad X_i = \text{niveau du facteur } j$$

exemple de calcul :

$$\text{effet } b_1 \text{ du facteur 1} = [-1x(Y1) + 1x(Y2) - 1(Y3) + 1(Y4) - 1(Y5) + 1(Y6) - 1(Y7) + 1(Y8)]$$

III.2.1. Plan d'expériences PE1

Dans cette première série d'expériences nous avons fait varier la concentration des constituants du milieu RIBA à l'exception de la gélose et du chloramphénicol qui sont maintenus respectivement à la concentration de 16g/l et 0.5g/l. Par ailleurs, nous testons également l'effet de l'ajout d'amidon.

FACTEURS	CONCENTRATION EN g/l AU NIVEAU	
	- 1	+ 1
Glucose	10	30
Extrait de levure	1	5
NH ₄ NO ₃	0,7	2,1
KH ₂ PO ₄	0,4	1,2
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	1,75	5,25
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,6	1,8
KCl	0	1
Amidon	0	20

TAB N2 : Domaine expérimental des facteurs étudiés du Plan d'expériences PE1

RESULTATS EXPERIMENTAUX

MILIEU	Nbre DE SPORES PAR ERLÉN x 10 ⁹
A1	7,8 ± 0,3
B1	19,7 ± 0,7
C1	35,8 ± 4,1
D1	37,8 ± 2,1
E1	22,1 ± 2,1
F1	17,6 ± 2,1
G1	16,7 ± 0,4
H1	54,7 ± 7,1

EFFET DES DIFFERENTS CONSTITUANTS

- Glucose	b ₁ = 5.92
- Extrait de levure	b ₂ = 9.72
- NH ₄ NO ₃	b ₃ = 1.26
- Phosphate	b ₄ = 4.06
- MgSO ₄ ,7H ₂ O	b ₅ = 2.44
- KCl	b ₆ = 1.79
- Amidon	b ₇ = 6.53
	b ₀ = 26.54

Les résultats expérimentaux obtenus sont très variables allant de $7,8 \cdot 10^5$ spores pour le milieu A1 à $54,7 \cdot 10^9$ spores pour le milieu H1. Ils démontrent clairement l'influence de certains constituants sur le nombre de spores produites, et que le milieu RIBA n'est pas optimisé.

En effet nous observons que :

- 4 facteurs ont une influence fortement positive (glucose, ajout d'amidon, extrait de levure et phosphate)
- 2 facteurs ont une influence faiblement positive ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et KCl)
- le $NH_4 NO_3$ a un effet nul.

En conséquence, le $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et le KCl seront maintenus au niveau +1 pour la suite des expériences. Le $NH_4 NO_3$ sera remplacé par une autre source d'azote.

III.2.2. Plan d'expériences PE2

Ce plan a pour but de préciser les valeurs des 4 facteurs dont les coefficients sont fortement positifs. Par ailleurs, on veut étudier l'influence de l'azote sous la forme nitrate et ammonium, ainsi que l'ajout de D-L alanine dont il a été montré dans la bibliographie un effet positif sur la sporulation [26, 27].

FACTEURS	CONCENTRATION EN g/l AU NIVEAU	
	-1	+1
Extrait de levure	3	10
Amidon	15	40
Glucose	25	50
KH_2PO_4	0,8	3
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	3,5	13,12
$(NH_4)_2SO_4$	1,15	3,5
$NaNO_3$	1,5	4,5
DI Alanine	0	1

TAB N°3 : Domaine expérimental des facteurs étudiés du plan d'expériences PE2

RESULTATS EXPERIMENTAUX

MILIEU	Nbre DE SPORES PAR ERLLEN x 10 ⁹
A2	37,7 ± 2,3
B2	64,8 ± 3,4
C2	55,4 ± 4,8
D2	61,1 ± 3,3
E2	51,7 ± 4,6
F2	72,2 ± 7,1
G2	62,5 ± 5,1
H2	78,8 ± 1,8

EFFET DES DIFFERENTS CONSTITUANTS

- Extrait de levure	$b_1 = 8.69$
- Amidon	$b_2 = 3.86$
- Glucose	$b_3 = 5.7$
- Phosphate	$b_4 = -3.2$
- NH ₄ NO ₃	$b_5 = 0.49$
- NaNO ₃	$b_6 = 0.35$
- Alanine	$b_7 = 2.14$
	$b_0 = 60.4$

Nous observons :

- Une amélioration sensible du nombre de spores produites : $78,8 \pm 1,8 \cdot 10^9$ spores par erlen sur le milieu H2, soit une augmentation d'un facteur 5 par rapport au milieu RIBA.
- Un effet positif important de l'extrait de levure et du glucose
- Un effet positif faible de l'alanine et de l'amidon
- Un effet nul de la source d'azote minéral sous forme de nitrate et d'ammonium.
- Un effet négatif du phosphate

Des essais complémentaires ont été envisagés afin d'améliorer cette production en étudiant:

- l'influence de la source de carbone
- l'influence de l'azote minéral
- l'influence du manganèse
- la diminution de la quantité de phosphate

Aucune amélioration n'a pu être apportée aux rendements précédemment obtenus, nous avons cependant observé que l'azote minéral bien qu'ayant un effet non significatif est nécessaire. Aussi nous avons conservé le milieu H2 pour la suite du programme.

A ce stade, il s'avérait nécessaire de vérifier que le temps d'incubation pour atteindre l'optimum de sporulation sur le milieu H2 était également de 7 jours. Nous avons pour cela réalisé une nouvelle cinétique de sporulation.

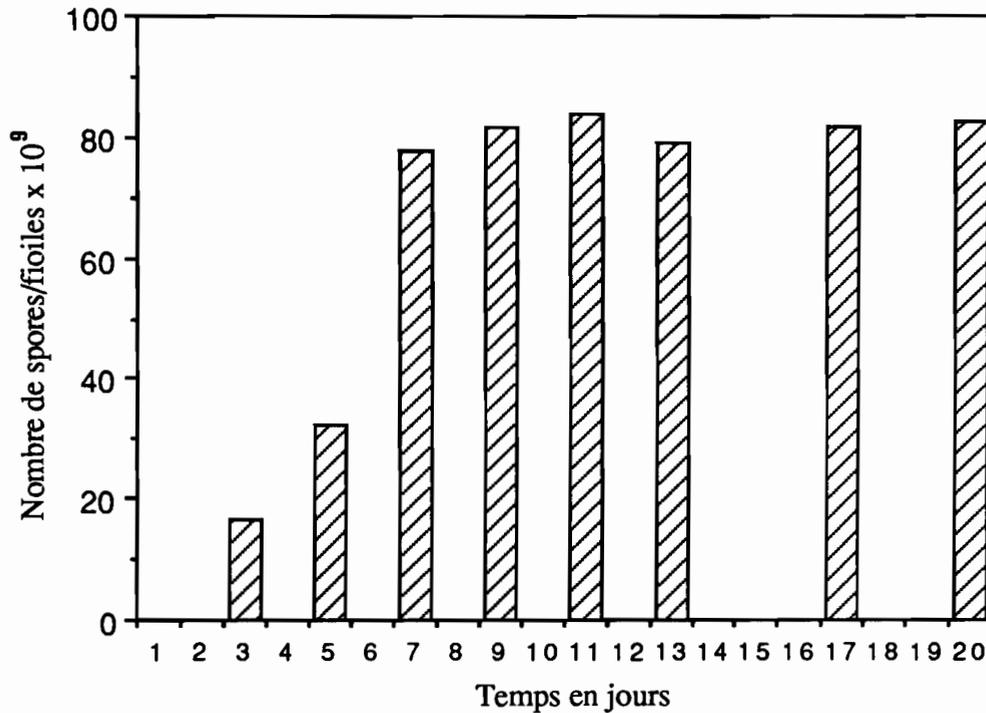


FIG N°5 : Cinétique de sporulation de B.bassiana sur milieu H2

Comme sur le milieu RIBA, l'optimum du nombre de spores produites sur milieu H2 est atteint après 7 jours de culture. Il reste constant jusqu'à plus de 20 jours d'incubation .

III.2.3. Conclusion et estimation des coûts des milieux

L'utilisation de plans d'expériences factorielles 2^3 nous a permis :

- de déterminer rapidement les constituants essentiels jouant un rôle important sur la production de spores (extrait de levure, glucose, ajout d'amidon, phosphate).
- de proposer un nouveau milieu (H2) permettant d'améliorer la production d'un facteur 5 par rapport au milieu RIBA. La surface nécessaire pour produire 10^{13} spores est réduite à $0,8 \text{ m}^2$ sur ce milieu.

Cependant l'optimisation d'un milieu industriel doit tenir compte de l'aspect économique. Aussi nous avons effectué une première estimation des coûts des principaux milieux en nous basant sur le prix des réactifs chimiques disponibles sur le marché (ref : annexe 1).

MILIEU	RIBA	H1	H2
NBRE SPORES/cm ² x 10 ⁸	2.11±0.26	8.7±1.15	11.1±1
NBRE SPORES/g x 10 ⁹	0,55	2,26	2,89
SURFACE NECESSAIRE pour 10 ¹³ spores	4.7m ²	1.15m ²	0.9m ²
PRIX/L(avec agar)	4.13F	4.4F	5.13F
PRIX POUR 10 ¹³ SPORES (avec agar)	75F	19.5F	17.8F
PRIX/L(sans agar)	0.29F	0.56F	1.29F
PRIX POUR 10 ¹³ SPORES (sans agar)	5.26F	2.48F	4.47F

TAB N⁴ : Comparaison des milieux RIBA, H1 et H2

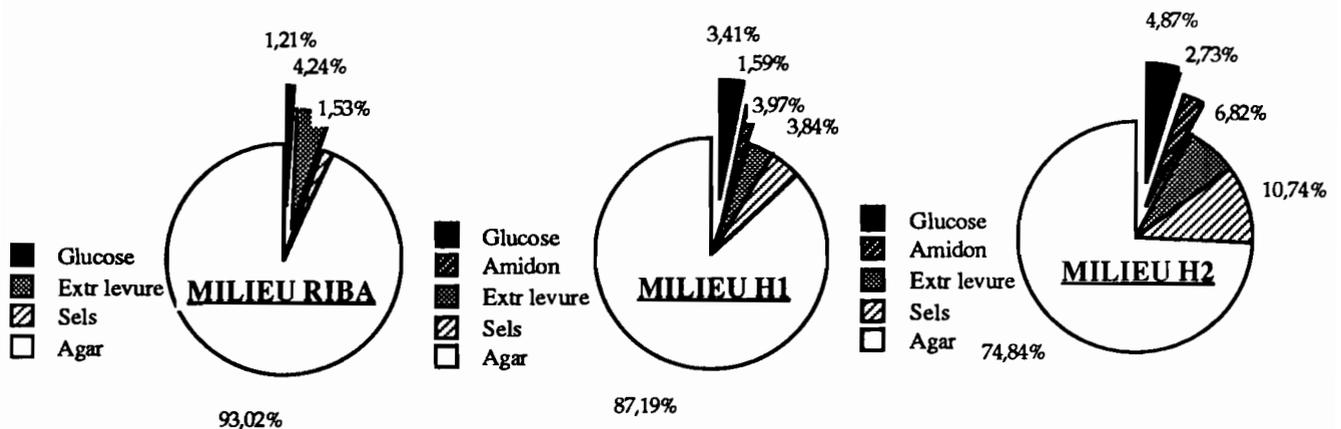


FIG N⁵ : Repartition des coûts des milieux

Nous remarquons que :

- Le prix du milieu nécessaire à la production de 10¹³ spores sur le milieu optimisé H2 reste inférieur à celui du milieu RIBA, malgré une concentration en réactifs chimiques plus importante.
- 75 à 95 % du coût du milieu est représenté par l'agar : l'optimisation du coût des autres constituants n'influera donc que très légèrement sur le prix global du milieu.

Nous en déduisons que la diminution du prix de revient du milieu nécessite soit :

- de trouver un produit de remplacement de l'agar.
- de proposer un nouveau procédé de production de spores ne nécessitant pas l'utilisation de gélose.

III.3. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE

Après l'optimisation de la composition du milieu de culture, il était indispensable de connaître également les conditions optimales de production.

Pour cela, nous avons étudié l'influence de certains paramètres. Cette étude a été effectuée en fioles en faisant varier chacun des facteurs pris séparément, les autres étant maintenus constants. Cette méthode est critiquable car elle est longue et ne tient pas compte des interactions éventuelles entre les différents facteurs. Cependant c'était la seule méthode praticable, et elle nous a permis de progresser assez rapidement.

Cette étape aurait dû être préliminaire à l'étude de la mise au point d'une méthodologie de production en réacteur à disques, cependant des contraintes de temps et de matériel nous ont obligé de mener ces deux étapes de front, certains résultats cités dans ce paragraphe n'ont pu pour cette raison être confirmés en réacteur.

III.3.1. Influence de la température

La température peut jouer un rôle prépondérant sur la croissance, la germination et la sporulation des champignons. La température d'incubation préconisée dans la bibliographie pour la culture de *B. bassiana* varie de 24°C à 28°C , [18, 16].

La température de sporulation pouvant être légèrement différente de celle nécessaire à la croissance mycélienne, différentes températures d'incubation ont été testées.

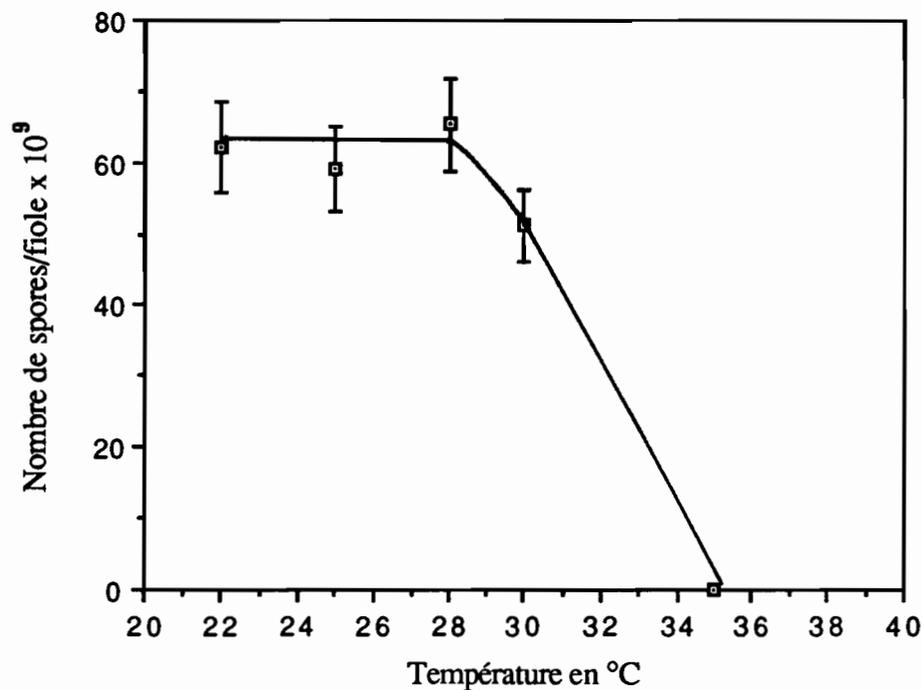


FIG N°7 : influence de la température sur la sporulation de B.bassiana

Nous n'observons pas de différences significatives sur le nombre de spores produites pour des températures situées entre 22°C et 28°C. Pour des températures supérieures, la production chute, et elle est nulle à 35°C. Cet hiver, nous avons pu également constater que le champignon poussait difficilement à une température proche de 15°C.

Une température de 25°C \pm 3°C est donc nécessaire pour permettre une bonne sporulation.

III.3.2. Influence de la luminosité

Ce paramètre, parfois négligé, peut avoir une influence déterminante sur la production de spores. Ainsi Ely Nahas observe qu'un cycle lumineux alterné permet de doubler la production de spores de *B.bassiana* [28]. Il était donc intéressant de vérifier ce résultat. Nous avons réalisé une expérience au cours de laquelle 3 fioles sont maintenues à l'obscurité et 3 autres sont soumises à la lumière du jour.

	NBRE DE SPORES PRODUITES PAR FIOLES x 10⁹
OBSCURITE	62.2 \pm 4.52
LUMIERE DU JOUR	54.4 \pm 5.65

TAB N°5 : Influence de la luminosité sur la sporulation de B.bassiana

Contrairement à Ely Nahas, nous n'observons pas d'influence significative de la lumière sur la production de spores. Ce paramètre ne sera pas considéré comme déterminant pour la suite de notre étude.

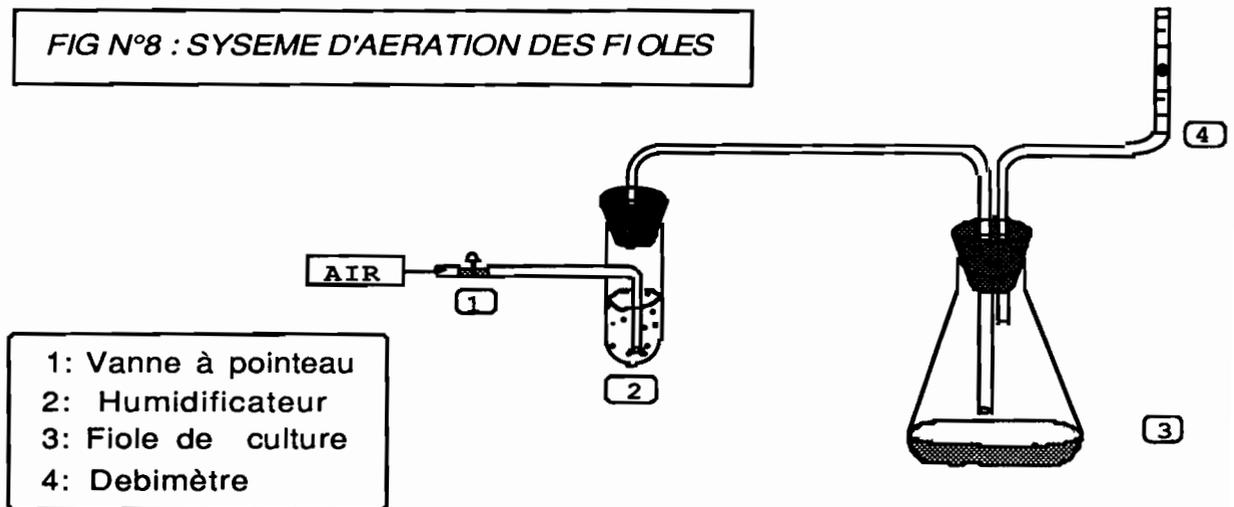
III.3.3. Influence de l'aération

La quantité d'O₂ mise à la disposition du champignon est un facteur important pour son développement. Cette quantité doit être suffisante pour ne pas limiter sa croissance.

Pour les expériences menées jusqu'à ce stade de l'étude, l'aération des cultures se faisait par simple diffusion de l'air au niveau du bouchon, ce qui a permis d'atteindre de bons rendements de production. Au niveau des réacteurs à disques, l'aération est assurée par le passage d'un flux d'air

forcé à travers celui-ci. Aussi nous avons voulu savoir si les débits d'air que nous avons fixé arbitrairement au niveau des réacteurs (cf : II.3.2.3) étaient suffisants pour apporter l'oxygène nécessaire à la croissance du champignon. Dans cet optique, nous avons mis au point le dispositif suivant :

FIG N°8 : SYSEME D'AERATION DES FIOLES



Il permet d'aérer chaque fiole à un débit précis. Les spores produites sont dénombrées après une semaine de culture.

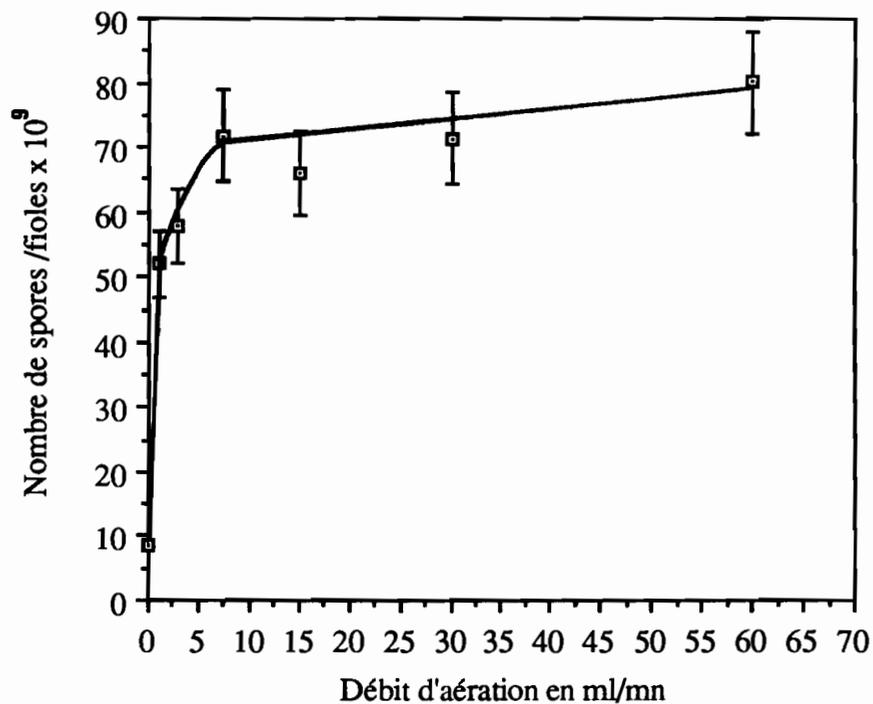


FIG N°9 : Influence de l'aération sur la sporulation de *B. bassiana*

Une bonne sporulation est obtenue dans les fioles dont le débit est supérieur à 8 ml/mn. Une aération plus importante n'augmente pas de façon sensible la sporulation dans les conditions de cette expérience, mais tendrait à augmenter les coûts de production .

Les fioles qui n'ont pas été aérées présentent une production très faible mais non nulle. Cette constatation bien que surprenante puisque que le champignon est aérobic stricte, peut être expliquée en considérant que la quantité d'air emprisonnée dans la fiole (≈ 300 ml) est suffisante pour assurer cette légère production.

Nous retiendrons ainsi qu'un débit de 15 ml/mn/fiole est largement suffisant pour permettre une bonne sporulation. Lors de l'extrapolation de ce résultat obtenu en fiole, pour les réacteurs à disques, plusieurs critères peuvent être pris en compte :

- Aération par unité de surface constante, soit : 2,3 l/mn/m² de surface utile
- Aération par volume de réacteur constant, soit : 0,05 l/mn/l de réacteur
- Aération par g de milieu constant, soit : 0,6 l/mn/Kg de milieu

La sporulation du champignon ne s'effectuant qu'à la surface des disques, le critère d'extrapolation qui nous a semblé le plus important concerne l'aération par unité de surface.

III.3.4. Influence de l'humidité relative

Il est rapporté dans la bibliographie qu'une humidité relative proche de la saturation est nécessaire pour assurer une bonne croissance et sporulation de *B.bassiana* [1] .

Aussi nous avons recherché qu'elle pouvait être l'influence de l'humidité relative (H.R.) sur la production de spores.

En utilisant le système mis au point précédement, les fioles ont été aérées à un débit fixé de 30 ml/mn à des H.R. différentes. Pour cela nous avons effectué un barbotage de l'air dans différentes solutions salines saturées donnant chacune une H.R. bien déterminée.

Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau N°6 :

SEL	H.R. THEORIQUE	H.R. MESUREE A L'ENTREE	H.R. MESUREE A LA SORTIE	NBRE DE SPORES $\times 10^9$	PERTE D'EAU en g
EAU	100%	100%	95-100%	58.66±6.1	---
KCl	86%	91%	95-100%	57.73±3.34	---
NaCl	76%	75.7%	95-100%	65.23±3.88	2,42
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	56%	51.6%	95-100%	57.7±4.07	3,95
CaCl ₂ ·6H ₂ O	31%	28.5%	95-100%	68.6±11.7	5,57
Silica-gel	0%	0%	95-100%	68.06±0.85	6,47

TAB N°6 : Influence de l'humidité relative sur la sporulation de B.bassiana

Nous observons que :

- Quelque soit le degré d'humidité de l'air passant à travers la fiole, l'H.R. est proche de 100% à la sortie. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'air au contact de la gélose saturée en eau se charge en humidité. Nous ne pouvons donc, dans ce système, étudier véritablement l'influence de l'H.R. atmosphérique sur la sporulation.

- L'H.R. de l'air dans cette expérience n'a pas d'influence notable sur le nombre de spores produites.

- La perte d'eau du milieu est d'autant plus importante que l'H.R. de l'air diminue.

Nous pouvons cependant conclure à partir de cette étude qu'il n'est pas nécessaire de pré-humidifier l'air avant son passage dans le réacteur, à condition d'avoir une distribution homogène dans tout le réacteur .

III.3.5. Influence du mode d'inoculation

Au cours de l'étape d'optimisation du milieu, nous avons établi que le coût de celui-ci pouvait être réduit à condition de trouver un produit de remplacement de l'agar. Nous avons pour cela testé différents gels (cf : Tab N°8 , p : 38) . Ceux susceptibles de remplacer l'agar ont l'inconvénient majeur d'avoir un point de gélification élevé de 45°C à 60°C. Il n'est alors plus possible d'envisager un ensemencement en masse de *B.bassiana* sans risquer de détruire le champignon par la chaleur.

Dans le procédé de production de spores en réacteur à disques tel qu'il est décrit dans le brevet [22], l'inoculation du milieu se fait en masse. Aussi, il nous a paru intéressant de vérifier si le mode d'inoculation (en masse ou en surface) avait une influence sur la production de spores.

	NBRE DE SPORES PRODUITES PAR FIOLES x 10 ⁹
INOCULATION EN MASSE	54.6±5.5
INOCULATION EN SURFACE	59.9±5

TAB N°7 : Influence du mode d'inoculation sur la sporulation de B.bassiana

Le mode d'inoculation n'a pas d'influence notable sur le nombre de spores produites. Ainsi l'inoculation en surface pourrait être envisagée dans le cas où l'on utiliserait un gel dont le point de gélification est élevé.

III.4. MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE DE PRODUCTION EN REACTEUR A DISQUES

Après la mise en place des réacteurs de 1,7 l et 12,4 l, plusieurs fermentations ont été réalisées suivant le procédé décrit dans le brevet [22], afin de déterminer les points où il serait nécessaire d'apporter des améliorations.

A la suite de cette étude préliminaire, il ressort que :

- l'étape de répartition de la gélose sur les disques est particulièrement délicate :
 - . problème d'évacuation du milieu excédentaire
 - . problème d'homogénéisation du milieu à la surface des disques,
- la quantité de milieu retenu par unité de surface est faible (0,11 g à 0,13 g/cm²)
- les rendements en spores/unité de surface sont de 50% à 70% inférieurs à ceux obtenus en fioles
- Le système tel qu'il est conçu ne permet pas le suivi de la croissance du champignon

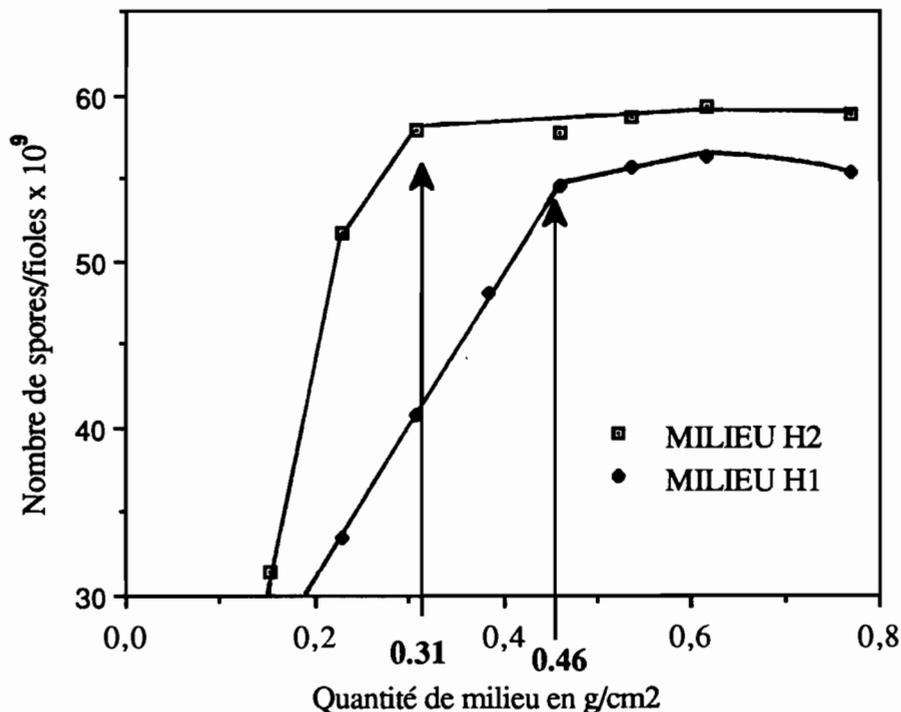
Par la suite, nous nous sommes donc attachés à apporter des solutions à ces différents problèmes dans le but de proposer un procédé global de production de spores en réacteur à disques

III.4.1. Influence de la quantité du milieu

Une des étapes limitantes du procédé au niveau du réacteur à disques est la répartition du milieu à la surface des grilles. Les essais réalisés lors de la mise en route des réacteurs de 1,7 l et 12,4 l ont montré que les quantités de milieu retenu étaient très faibles.

Aussi nous avons réalisé une étude afin de déterminer s'il existait une corrélation entre le nombre de spores produites et la quantité de milieu retenu par unité de surface.

Cette étude a été menée en fioles car la surface est standardisée : 65 cm^2 . Des quantités variables (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 et 50 ml) des milieux H1 et H2 pré-ensemencés ont été réparties sur le fond des fioles. Après 7 jours d'incubation, les spores produites sont dénombrées.



*FIG N°10 : Influence des quantités de milieu H1 et H2 sur la sporulation de *B. bassiana**

Nous observons que le nombre de spores produites est directement proportionnel à la quantité de milieu retenu par unité de surface jusqu'à $0,31 \text{ g/cm}^2$ pour le milieu H2 et $0,46 \text{ g/cm}^2$ pour le milieu H1. Dans les deux cas, des quantités de milieu supérieures ne permettent pas d'améliorer la production. Il apparaît ainsi qu'au stade fermenteur, la rétention du milieu sur les disques est un facteur essentiel à optimiser et à contrôler pour obtenir de bons rendements de production.

Pour cela deux voies ont été envisagées :

- Utilisation de nouveaux disques profilés
- Utilisation de supports absorbants

III.4.2. Optimisation de la quantité de milieu retenu à la surface des disques

III.4.2.1. Utilisation de nouveaux disques profilés

Afin d'améliorer la rétention de la gélose sur les grilles, de nouveaux disques ont été conçus. Ils sont constitués de 2 grilles en inox d'une maille de 1 mm² enserrant une ou deux hélices comportant 6 arcs en inox délimitant ainsi des compartiments sur le disque. La géométrie de ce système est similaire à celui d'une roue à aube. Son but est de prendre un maximum de milieu, de le concentrer ensuite au centre du disque pour le répartir finalement de façon homogène sur l'ensemble de la surface des grilles.

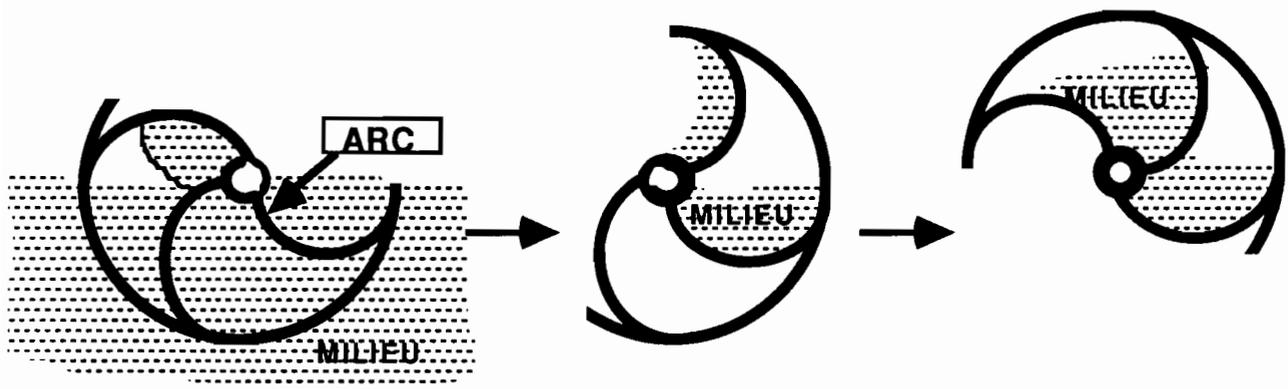


FIG N°11 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DES DISQUES PROFILES

3 types de disques ont été testés :

- 2 disques classiques
- 2 disques + hélice entre
- 2 disques + 2 hélices entre

Nous avons déterminé dans ces trois cas les quantités de milieu retenu en g/cm^2 pour différents gels :

- Agar
- Agar + caroube 4 g/l
- Agar + caroube 6 g/l
- Flanogen 523
- Flanogen XL 11
- Kelgum
- Satiagel MR200
- Satiagel 780BF
- Aubysel TKS

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n°8. Nous observons que :

- L'ajout d'une hélice entre les deux grilles permet d'améliorer considérablement la quantité de milieu retenu par unité de surface.
- Le meilleur résultat est obtenu en utilisant deux disques + 2 hélices avec de l'Aubysel TKS à 15g/l. Dans ces conditions la quantité de milieu retenu est de $0,25\text{g/cm}^2$.

Conclusion :

L'utilisation des nouveaux disques profilés permet de retenir des quantités de milieu plus importantes, proches dans un cas de la quantité de milieu nécessaire pour obtenir l'optimum du nombre de spores produites. Cependant, nous constatons dans tous les cas, des problèmes d'homogénéisation, d'évacuation du milieu excédentaire et de répétabilité des résultats.

III.4.2.2. Utilisation de support absorbant

3 supports, vendus dans le commerce, ont été choisis en raison de leur forte propriété absorbante :

- Support Viléda (serpillère, épaisseur 1,5 mm)
- Support spontex 1 (toile éponge, épaisseur 5 mm)
- Support spontex 2 (éponge, épaisseur 1 cm)

Leur capacité d'absorption a été testée sur milieu gélosé et milieu liquide. Pour cela, la même épaisseur de support (1 cm) a été placée entre 2 grilles afin d'assurer leur rigidité.

GELIFIANT	2 DISQUES en g/cm2	2DISQUES + 1 HELICE en g/cm2	2 DISQUES + 2 HELICES en g/cm2	VISCOSITE A 70°C en CPS	T° DE GELIFICATION	POUVOIR GELIFIANT
AGAR 16 g/l	0,056	0,153	0,157	187	>35°C	++
AGAR 16g/L	0,099	0,174	0,183	187	>35°C	++
AGAR 16g/L + CAROUBE 4g/l	0,091	0,116	0,151	4170	>35°C	+++
AGAR 16g/L + CAROUBE 6g/l	0,087	0,172	0,24	---	>35°C	+++
FLANOGEN 523 A 15g/L	0,09	0,118	0,198	92,2	>45°C	+++
FLANOGEN XL11 A 15g/l	0,084	0,22	0,248	4580	>55°C	+
SATIAGEL MR200 A 15g/l	---	---	---	30	---	-
SATIAGEL 780BF A 15g/l	---	---	---	55	---	-
AUBYGEL TKS A 15g/l	0,098	0,156	0,27	17,5	>42°C	+++
AUBYGEL TKS A 20g/l	0,116	0,156	0,19	25	>47°C	+++
KELGUM A 15 g/l	TROP VISQUEUX	TROP VISQUEUX	TROP VISQUEUX	9900	>55°C	+++

TAB N°8 : Comparaison de l'efficacité de 3 types de disques sur la rétention de différents gels

Après 30 mn d'imprégnation, le milieu excédentaire est évacué. La quantité de milieu retenu en g/cm² est déterminée par simple pesée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

	VILED A	SPONTEX 1	SPONTEX 2
MILIEU LIQUIDE	0.42g/cm ²	0.31g/cm ²	0.14g/cm ²
MILIEU GELOSE	0.41g/cm ²	0.35g/cm ²	---

TAB N°9 : Quantité de milieu retenu par différents supports

Nous observons que l'utilisation de support absorbant permet :

- de retenir les quantités de milieu nécessaires pour obtenir l'optimum de sporulation
- d'utiliser un milieu liquide, d'où une diminution considérable du coût du milieu (ref : TAB N°4).
- de faciliter l'étape de répartition du milieu.

Les problèmes de rétention du milieu ayant été ainsi résolus, il s'averait nécessaire de vérifier que la croissance du champignon était possible sur de tels supports. Des essais de culture sur supports ont donc été réalisés. Les supports ont tout d'abord été autoclavés, rincés et séchés afin de supprimer l'activité antifongiques de certains constituants rajoutés par le fabricant dans le but d'améliorer la conservation du support. Ils sont ensuite placés au fond d'une fiole dont la surface est standardisée puis imprégnés de 25 ml de milieu H2 liquide ou gélosé pré-ensemencés. Après 7 jours d'incubation, les spores produites sont dénombrées. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

	NBRE DE SPORES/ FIOLES x 10 ⁹	NBRE DE SPORES/ cm ² x 10 ⁹	NBRE DE SPORES/ g x 10 ⁹	% PAR RAPPORT AUTE MOIN
TEMOIN H2	77.1±7	1,18	3,084	---
VILED A	61.7±6	0,94	2,44	80%
SPONTEX 1	54±4	0,84	2,16	70%
SPONTEX 2	54.7±6	0,84	2,16	71%

TAB N°10 : Comparaison de la sporulation de B.bassiana sur différents supports imprégnés de milieu H2 gélosé

	NBRE DE SPORES/ FIOLES x 10 ⁹	NBRE DE SPORES/ cm ² x 10 ⁹	NBRE DE SPORES/ g x 10 ⁹	% PAR RAPPORT AU TEMOIN
TEMOIN H2	77.1±7	1,18	3,084	---
VILED A	61.7±6	0,94	2,44	80%
SPONTEX 1	43,9	0,68	1,76	57%
SPONTEX 2	30,77	0,47	1,23	40%

TAB N°11 : Comparaison de la sporulation de B.bassiana sur différents supports imprégnés de milieu H2 liquide

Nous notons que :

- la croissance et la sporulation du champignon sur support imprégné de milieu H2 liquide ou gélifié est possible.
- le support viléda permet d'obtenir les meilleurs rendements (80% par rapport au témoin).

Remarque : une cinétique de sporulation réalisée sur le support viléda avec le milieu H2 a montré qu'il est préférable d'attendre 8 jours d'incubation pour obtenir l'optimum de sporulation.

III.4.3. Fermentation en réacteur à disques sur support imprégné

Afin de vérifier que l'amélioration apportée par l'utilisation de support absorbant au niveau de la rétention du milieu permettait d'obtenir également de bons rendements de production en réacteur à disques, plusieurs fermentations ont été réalisées en réacteur de 1,7l et 12,4l. Les résultats obtenus ainsi que les conditions opératoires sont présentés sur la courbe et le tableau suivants :

	FERMENTATION A	FERMENTATION B	FERMENTATION C
TYPE DU REACTEUR	1.7l	12.4l	12.4l
MILIEU	H2 LIQUIDE	H2 LIQUIDE	H2 LIQUIDE
SUPPORT	VILED A 6EPAISSEURS	VILED A 6EPAISSEURS	VILED A 6EPAISSEURS
NBRE DE DISQUES	8	20	30
SURFACE UTILE	1080cm ²	6600cm ²	9900cm ²
QUANTITE DE MILIEU RETENU	400g	2080g	4040g
DEBIT D'AERATION	200ml/mn	4.5l/mn	4.5l/mn
TEMPERATURE D'INCUBATION	25°C	25°C	25°C
TEMPS D'INCUBATION	8 JOURS	8 JOURS	8 JOURS
NBRE DE SPORES PRODUITES	0.113x 10exp13	0.696x 10exp13	1.27x 10exp13

TAB N°12 : Résultats et conditions des fermentations réalisées en réacteur à disques de 1.7l et 12.4l sur support viléda imprégné de milieu H2 liquide

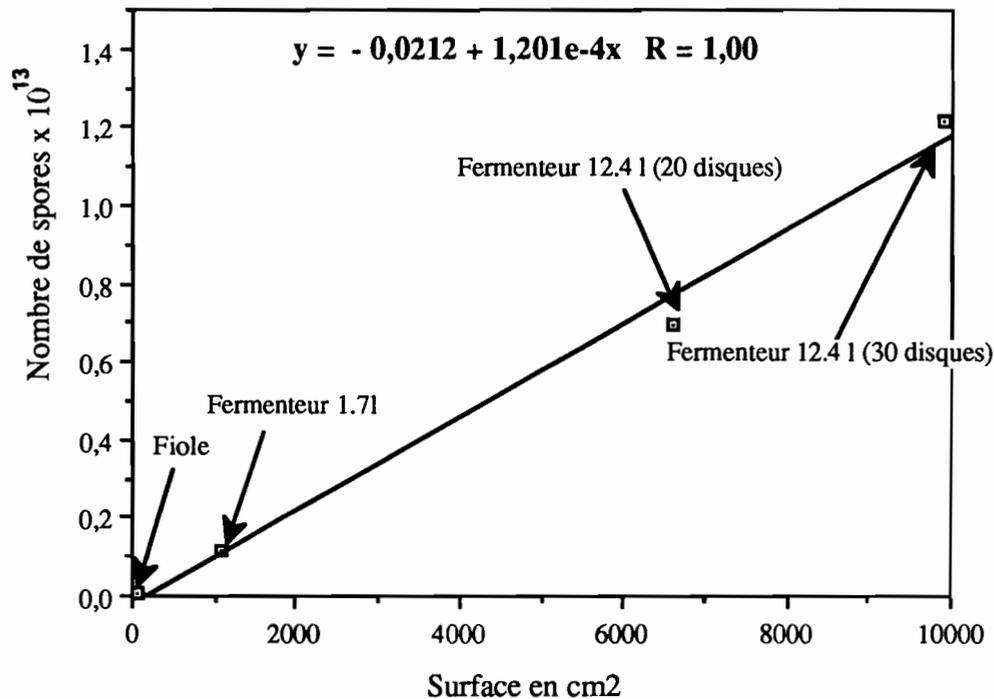


FIG N° 12 : Influence de la surface utile sur le nombre de spores produites (support vileda, milieu H2 liquide)

Il ressort de cette étude que la quantité de spores produites est importante, elle est directement proportionnelle à la surface utile disponible du réacteur, et extrapolable selon l'équation de la droite.

Le nombre maximum de disques admis dans le réacteur de 12,4 l est de 30, soit une surface de 1 m².

Dans ces conditions, la production est de 1,27 10¹³ spores. Nous en déduisons qu'en réacteur à disques, la surface utile nécessaire pour traiter 1 ha est de 0,8 à 0,9 m². Cette surface déterminée ici par l'expérimentation avait déjà pu être calculée grâce à l'extrapolation des rendements obtenus en fiole sur le milieu H₂. En effet si nous faisons une étude comparative des résultats obtenus en fioles et en réacteur à disques (cf : TAB N°13), nous remarquons que les rendements en spores/cm² et en spores/g sont sensiblement égaux en fiole et en réacteur.

	FIOLE	FERMENTEUR 1.7 L	FERMENTEUR 12.4 L	
SURFACE EN CM ²	65	1080	6600	9900
QUANTITE MILIEU EN g	25	400	2080	4040
NBRE SPORES X 10 ¹³	0.007	0.113	0.696	1.217
SPORES/CM ² X 10 ⁹	1.11	1.045	1.05	1.23
SPORES/g X 10 ⁹	2.89	2.82	3.34	3

TAB N°13: Comparaison des résultats obtenus sur milieu H2 en fiole et en fermenteur sur support viléda

L'utilisation de support absorbant nous a permis ainsi d'obtenir une parfaite extrapolation des résultats obtenus en fiole au stade fermenteur de laboratoire.

La simplicité du procédé proposé ici laisse également envisager la possibilité d'une bonne extrapolation à un stade pilote.

Un tableau comparatif est réalisé entre le procédé sur milieu gélosé et celui sur support absorbant sur milieu liquide (cf : TAB N°14). Nous notons que ce dernier permet d'apporter des solutions aux problèmes précédemment soulevés.

La rentabilité d'un tel procédé reste cependant à démontrer .

La société Vileda a estimé que le coût approximatif du support était de 100 - 110 F/m² (Ref : annexe 2) soit un prix de revient de 110 F à 120 F/10¹³ spores. Ce prix est très supérieur au prix de revient de 12 F/ha estimé par la société CALLIOPE [23] .

Ainsi pour être rentable, ce procédé sera envisageable uniquement si le support est réutilisé sur au moins 10 cycles de fermentation.

	FERMENTATION SUR MILIEU GELOSE	FERMENTATION SUR SUPPORT IMPREGNE
MATERIEL SUPPLEMENTAIRE	Gélose	Support : type non tissé
PREPARATION DU REACTEUR		Nécessité de pouvoir charger et décharger les supports après un ou plusieurs cycle de fermentation
STERILISATION DU MILIEU	Dans le réacteur	Dans une cuve annexe
IMPREGNATION DES DISQUES	Etape limitante du procédé, peu de matériel reste fixé sur les disques. De plus le contrôle de cette étape est particulièrement délicate	Aucun problème. possibilité de retenir les quantités de milieu désirées
FERMENTATION		Nécessité d'assurer une légère rotation des disques pour une bonne homogénéisation du milieu
RECOLTE	Par lavages successif avec de l'eau +tween 80 à 1%, puis centrifugation ou filtration et séchage. Impossible de récolter à sec	
RESULTAT	Rendements obtenus en réacteur 50% à 60% plus faibles que ceux obtenus en fioles	Très bonne extrapolation des résultats obtenus en fioles au stade fermenteur de laboratoire.

TAB N°14 : Comparaison du procédé sur milieu gélosé et sur support imprégné de milieu liquide

III.4.4. Essai de réutilisation des supports

Il est à noter que la surface des disques après extraction des spores est en général très sale (le mycélium ainsi qu'une partie des spores produites restent accrochés sur le support).

Avant leur réutilisation, nous avons donc du procéder à plusieurs cycles de lavage avec de la lessive. Ce traitement n'a cependant pas permis de nettoyer parfaitement les disques en surface.

Malgré cela, deux fermentations ont été relancées avec ces supports. On observe que la croissance du champignon est bonne dans ces conditions, le nombre de spores produites est sensiblement le même que pour une fermentation classique. Néanmoins, le pourcentage d'extraction des spores en milieu liquide s'est révélé très faible, seulement 30% à 50% d'extraction.

Nous avons alors envisagé de réaliser un troisième cycle de fermentation sur ces mêmes supports mais en effectuant un glaçage préalable de la surface des disques avec de la gélose (cf : III.4.8.1). Cette technique nous a permis de conserver de très bons rendements d'extraction (90%), de plus nous avons pu constater que la surface des disques restait relativement propre, favorisant ainsi leurs réutilisations.

Il apparaît donc que les supports peuvent être réutilisés sur 3 cycles de fermentations, cependant des essais complémentaires sont à prévoir afin de confirmer ce résultat et d'étudier la possibilité de les réutiliser sur au moins 10 cycles de fermentation.

III.4.5. Fermentation liquide

Le fermenteur à disques a été conçu dans le but de produire des spores de champignons. Or dans le réacteur on observe une première phase de croissance de 70 heures suivie d'une phase de sporulation de 120 heures.

Ainsi afin d'améliorer la productivité, il nous a paru intéressant d'essayer d'effectuer un découplage croissance-production de spores. La croissance serait réalisée en fermenteur liquide classique et la production de spores dans le réacteur à disques.

Il nous serait alors possible de suivre dans le fermenteur liquide les évolutions des paramètres classiques de fermentation (biomasse, substrat, pH) ce qui n'est pas actuellement réalisable dans le réacteur à disques.

Pour un problème de temps et de matériel nous n'avons pu effectuer qu'une expérience de croissance du champignon en fermenteur liquide. Il est malgré tout intéressant d'exposer les résultats obtenus.

III.4.5.1. Evolution de la biomasse

On observe au microscope une phase de germination de 20 heures suivie d'une phase de croissance du mycélium entre 20 et 40 heures, puis une phase de formation des blaspores de 40 à 75 heures.

On note également, à partir de la 60^{ième} heure, l'apparition d'un pigment rouge dont le pic d'absorption se situe à 521 nm.

D'après les données bibliographiques [1], il semblerait que ce pigment corresponde à un antibiotique produit par le champignon : l'oosporéine. Il est à noter que ce pigment n'apparait pas en milieu solide.

D'après ces observations, si le découplage croissance-production est effectivement réalisé, il devrait se faire avant la formation de blastospores, soit avant la 40^{ième} heure.

III.4.5.2. Evolution du pH

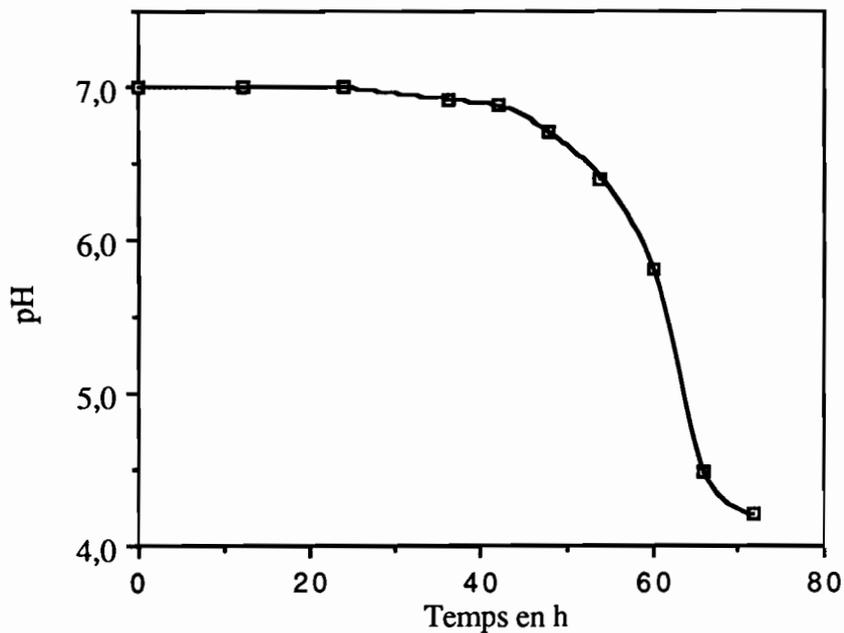


FIG N°13 : Evolution cinétique du pH au cours de la croissance de *B. bassiana* en milieu liquide

On observe une chute brusque du pH à partir de la 50^{ième} heure correspondant à l'étape de formation des blastospores jusqu'à un pH final de 4,2.

D'après la bibliographie [21], cette valeur n'est pas limitante pour la croissance du champignon, il semblerait ainsi que le milieu soit suffisamment tamponné.

III.4.5.3 Evolution des substrats

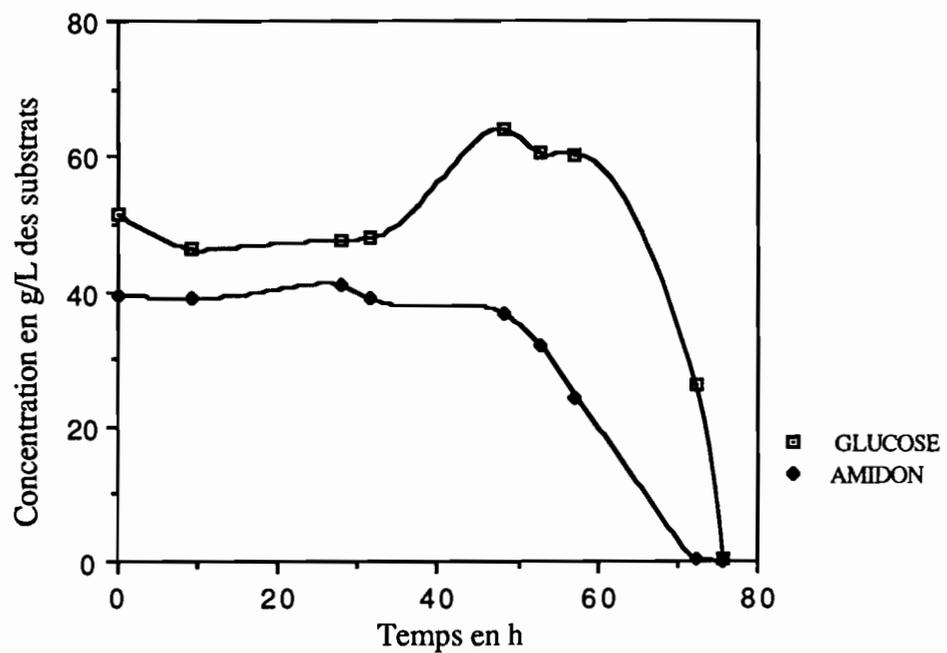


FIG N°14 : Evolution cinétique de l'amidon et du glucose au cours de la croissance de B.bassiana cultivé en milieu liquide

On observe une diminution des concentrations de glucose et d'amidon à partir de la 25^{ième} heure. A partir de la 45^{ième} heure, on note une brusque augmentation de la concentration en glucose qui peut s'expliquer par une vitesse d'hydrolyse de l'amidon supérieure à la vitesse de consommation de glucose. Les sucres sont totalement consommés au bout de 70 heures. Cette valeur correspond à la fin de la phase de croissance observée en réacteur à disques, à partir de l'analyse des gaz de sortie (cf : III.4.6.1) . Nous pouvons donc conclure que l'arrêt de la croissance est dû à une limitation par les sucres .

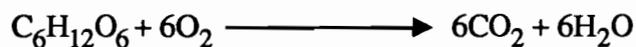
III.4.6. Suivi des paramètres de fermentation

La conception du réacteur à disques ne permet pas d'accéder aux paramètres classiques de fermentations (pH, biomasse, sucre....).

En effet, pour réaliser ces analyses, il faudrait pouvoir à intervalles réguliers retirer des disques du fermenteur, ce qui n'est pas prévu techniquement et poserait des problèmes de stérilité et de dispersion des spores dans le laboratoire. Les seuls critères accessibles restent l'aspect visuel de la culture ainsi que le suivi des gaz de sortie et de la production de chaleur.

III.4.6.1. Analyse des gaz

L'équation de la respiration du glucose démontre que du gaz carbonique est produit tandis que de l'oxygène est consommé et ce dans les mêmes proportions, selon le bilan :

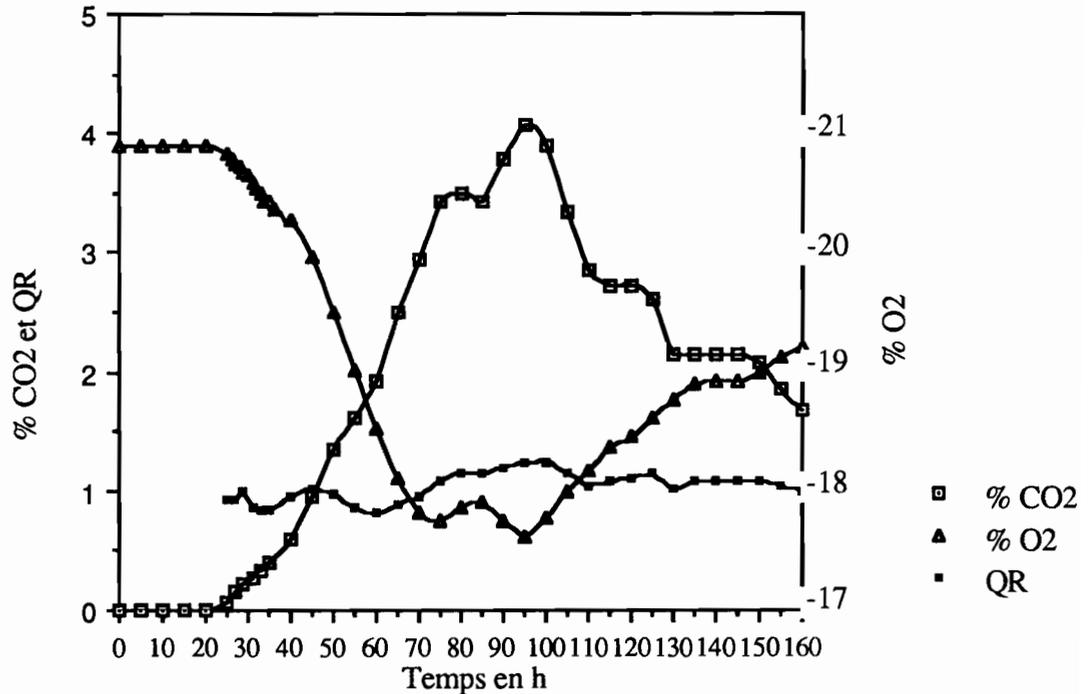


D'autre part, il a été démontré que la croissance peut être corrélée à la consommation d'O₂ et à la production de CO₂, pendant la phase de croissance végétative du mycélium [31]

Dans cet optique, des fermentations ont été réalisées en fermenteur de 1,7l et de 12,4 l au cours desquelles une analyse des gaz a été faite.

Bien que ces expériences aient été conduites dans des réacteurs de taille différente, les profils de consommation d'O₂ et de production de CO₂ sont sensiblement identiques.

La figure suivante représente le profil d'analyse des gaz obtenu au cours d'une fermentation type sur le réacteur de 12,4 l.



*FIG N°15 : Evolution des %O₂ et CO₂ ainsi que du coefficient respiratoire dans les gaz de sortie (débit : 500ml/mn), au cours de la croissance de *B.assiana* cultivée en réacteur à disques sur support imprégné de milieu H₂*

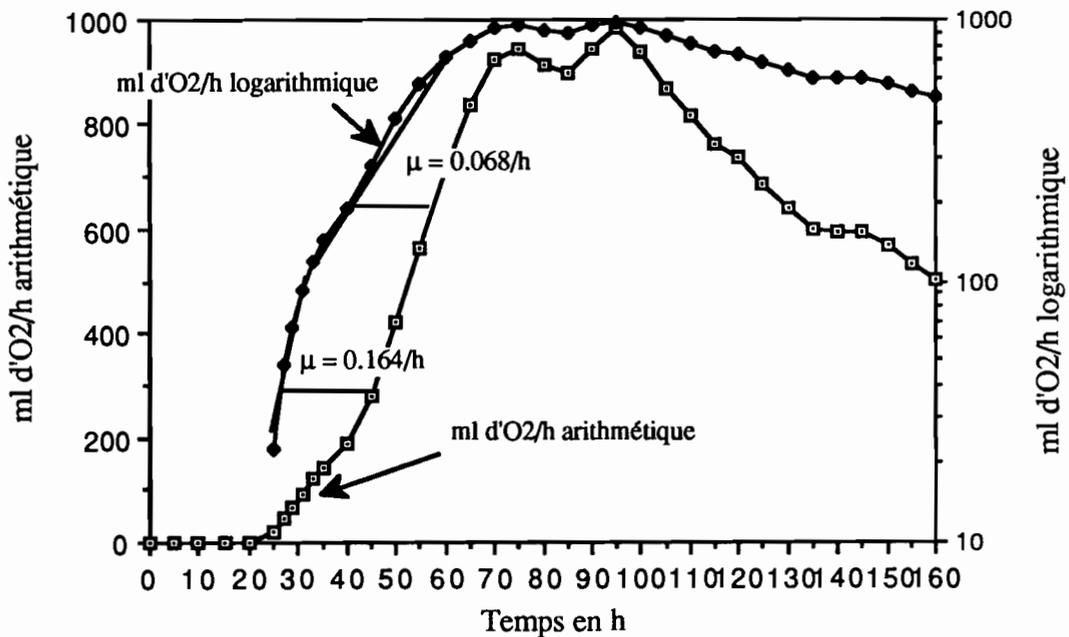
A partir de la courbe précédente, nous pouvons calculer la vitesse de consommation de l'O₂ en utilisant la relation suivante.

$$r_{O_2} = \% O_2 / 100 \times D$$

r = vitesse de consommation d'O₂ en ml/h

D = débit d'aération en ml/h

% O₂ = mesure donnée par l'appareil



*FIG N°16 : Vitesse de consommation de l'O₂ au cours de la croissance de *B.bassiana* rapportée sur une échelle logarithmique et arithmétique*

Les figures n°15 et 16 permettent de mettre en évidence plusieurs phases au cours de la fermentation :

- une phase de latence de 20 h. Cette période correspond à l'étape de germination des spores (cf : cinétique de germination)
- une phase de croissance exponentielle de 25 h à 35 h avec un temps de doublement de 4,2 heures ($\mu = 0,164 \text{ h}^{-1}$)
- une phase de ralentissement de 35 h à 70 h avec un temps de doublement de 10 h ($\mu = 0,068 \text{ h}^{-1}$)
- une dernière phase de 100 h au cours de laquelle on observe un ralentissement de la consommation d'O₂ et de la production de CO₂. Cette phase correspond à l'étape de production de spores.

Il est à noter que le coefficient respiratoire ($Q.R. = \%CO_2 / \%O_2$) reste proche de 1 tout au long de la fermentation.

Ainsi à partir de l'analyse des gaz de sortie, il nous a été possible de suivre la croissance du champignon au cours de la fermentation.

Des expériences complémentaires seraient à prévoir afin d'établir un profil type de consommation d'O₂ et de production de CO₂, à partir desquels on pourrait estimer le bon déroulement d'une fermentation, et établir sur cette base un contrôle de la production .

III.4.6.2. Production de chaleur

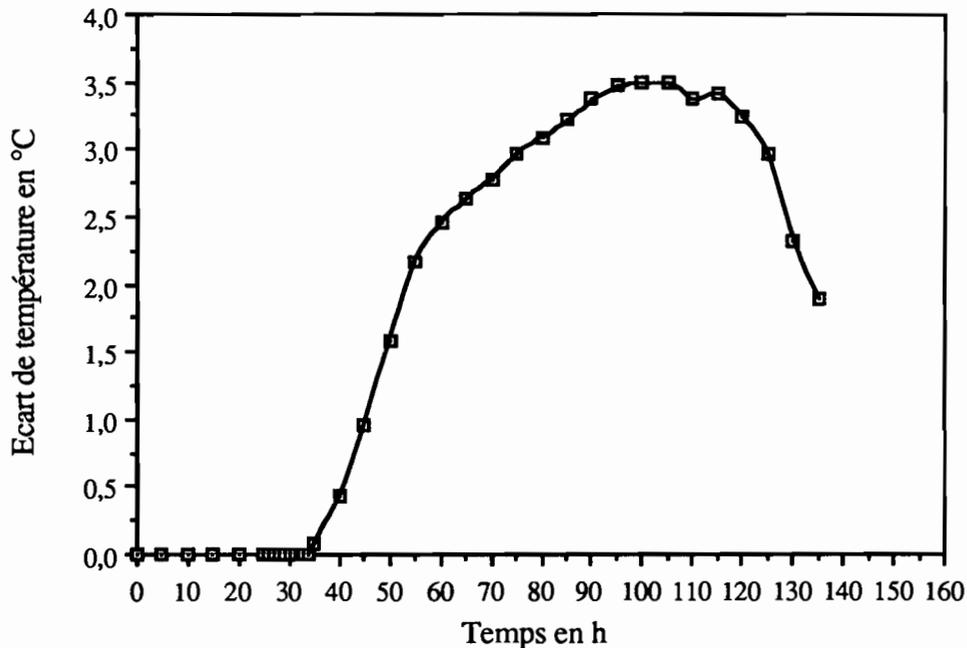
Selon différents auteurs [29, 30] cités par Raimbault [31], il existe un rapport constant entre la demande en O₂ et la production de chaleur.

$$dQ / dt = K . dO_2 / dt$$

Les résultats rapportés par ces différents auteurs montrent que la quantité de chaleur par mole d'oxygène consommée est constante pendant toute la durée de la fermentation. Il est donc possible, grâce au suivi de la quantité de chaleur dégagée d'estimer théoriquement l'évolution de la croissance du champignon.

Afin de mettre en évidence d'une façon pratique ce dégagement de chaleur, nous avons effectué un suivi de la température au cours d'une fermentation, en mesurant la différence de température entre une sonde placée à l'intérieur du réacteur et une sonde placée à l'extérieur.

Le profil d'évolution de la température ainsi obtenu est représenté sur la figure ci-dessous :



*FIG N°17 : Evolution de la température dans le réacteur au cours de la croissance de *B. bassiana* cultivée sur support imprégné de milieu H2*

Nous observons une certaine similitude entre le profil de température mesurée et la vitesse de consommation d'O₂. Nous vérifions ainsi que la quantité de chaleur dégagée est corrélée à la respiration. Il serait donc possible, à partir de la mesure de température, d'estimer l'évolution de la croissance du champignon.

Cependant, il faut souligner que la mesure est peu précise. En effet le réacteur n'étant pas calorifugé et la température de la pièce de fermentation n'étant pas parfaitement régulée, les températures mesurées sont soumises à des variations. On notera toutefois que l'élévation de température peut atteindre 4°C. Il serait donc utile de développer une méthode d'extrapolation pour savoir si il sera nécessaire de prévoir un système de refroidissement et de contrôle de la température dans le réacteur (cf : Etude MONTALTI et al ; 1989, [32])

III.4.7. Essai d'une fermentation avec une aération à 5 % d'HR

Afin de confirmer les résultats obtenus au cours de l'étude sur l'influence de l'H.R. (cf chap III.3.4), nous avons effectué une fermentation sur le réacteur à disques de 1,7 litres en faisant passer un flux d'air sec (8 % d'HR à 500 ml/mn).

Nous pouvons noter :

- un gradient de croissance à la surface des disques (la croissance du champignon est faible sur les disques situés près de l'arrivée d'air, par contre elle est importante sur les disques situés à l'autre extrémité).
- Une H.R. de 100 % à la sortie du réacteur
- Une diminution de 50 % des rendements de production

Cette observation va à l'encontre des résultats obtenus en fiole, elle peut cependant s'expliquer, en considérant que le débit d'air élevé nécessaire à l'aération de la culture s'humidifie lors du passage à travers les premiers disques, entraînant une perte d'eau telle que le champignon ne peut plus se développer à la surface des premiers disques.

Nous en déduisons donc que ce système d'aération ne permet pas d'assurer une bonne homogénéisation de l'atmosphère à l'intérieur du réacteur. Pour résoudre ce problème, nous préconisons l'utilisation du système d'aération présenté sur le schéma ci-dessous, permettant une meilleure distribution de l'air .

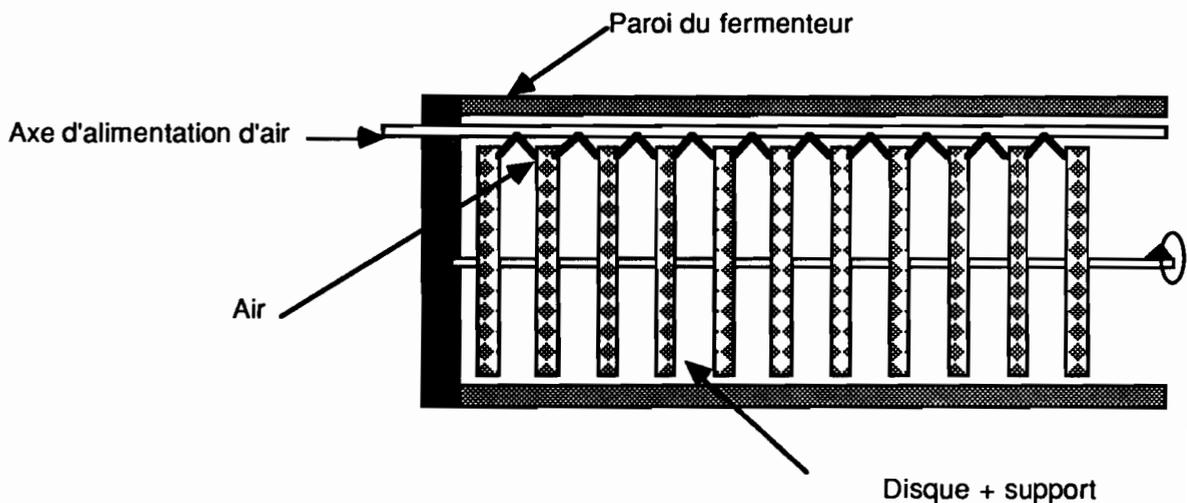


FIG N° 18 : Schema d'un nouveau système d'aération

III. 4.8. Mise au point d'un mode de récolte

III.4.8.1. Récolte en milieu liquide

Jusqu'à présent, les spores ont été récoltées par 5 lavages successifs avec de l'eau déminéralisée + du Tween 80 à 1%. Cependant une quantité non négligeable des spores produites ne sont pas récoltées par ce procédé. Aussi, afin d'estimer la quantité totale de spores produites et analyser les rendements réels de production, nous avons été amenés à récolter manuellement par grattage les spores restant fixées à la surface des disques.

Les % d'extraction obtenus au cours des lavages sont présentés sur le schéma suivant :

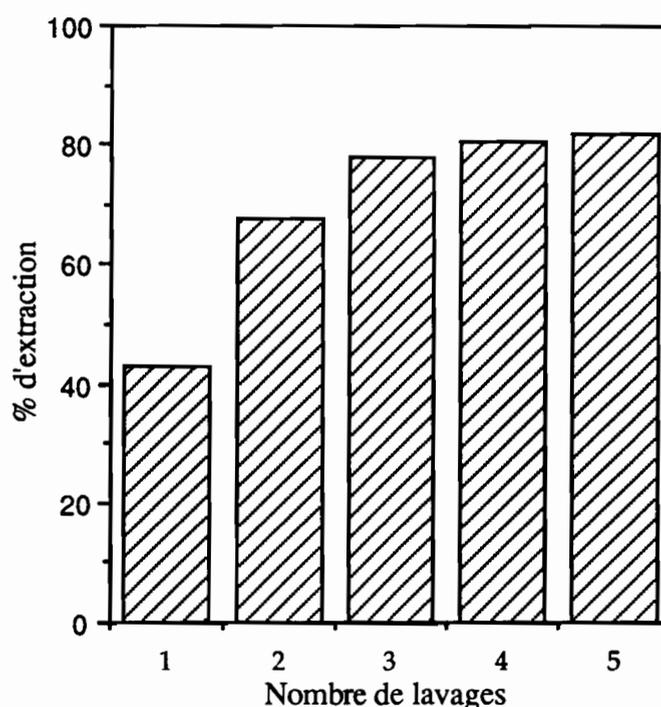


FIG N°19 : Récolte des spores par lavage

Nous observons que :

- le pourcentage d'extraction maximum obtenu par lavage est de 80 %
- au delà de 3 lavages, ce pourcentage ne varie pratiquement plus.

Dans le but d'améliorer l'extraction des spores en milieu liquide nous avons essayé le glaçage de la surface de culture selon le protocole suivant :

Après imprégnation des disques et évacuation du milieu excédentaire, de la gélose à 20g/l en surfusion à 45°C est rajoutée jusqu'à la moitié du réacteur. Les disques animés d'une

rotation lente, se recouvrent alors d'une fine pellicule de gélose. Après 5 mn, la gélose excédentaire est évacuée. Cette manipulation nous permet de réaliser un glaçage de la surface des disques. L'incubation de la culture et la récolte se font de la même façon que précédemment.

Nous pouvons comparer à l'aide de la figure ci dessous, l'efficacité de la récolte avec et sans glaçage de la surface des disques.

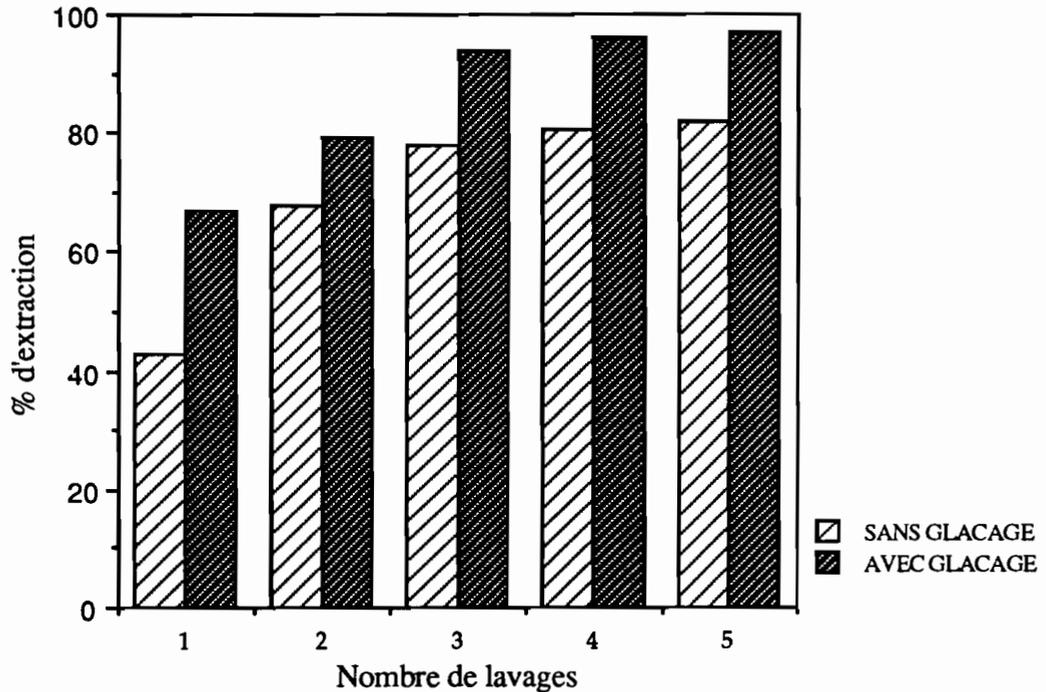


FIG N°20 : Comparaison de la récolte par lavage avec et sans glaçage de la surface des disques

Bien que les rendements de production avec ou sans glaçage de la surface des disques soient similaires, le glaçage seul permet d'atteindre des pourcentages d'extraction proche de 100%.

Ainsi suivant ce dernier procédé, il est possible de récolter la quasi-totalité des spores produites en effectuant 3 lavages successifs avec de l'eau + du Tween 80 à 1 %. En conclusion, la récolte en milieu liquide semble être une solution à la récupération des spores, elle présente néanmoins quelques inconvénients :

- Utilisation de grands volumes d'eau (9 litres pour la récolte du réacteur de 12, 4 l).
- Une étape de concentration (par filtration ou par centrifugation) suivie d'une étape de séchage sont indispensables à l'obtention d'un produit formulable.

III.4.8.2. Mise au point d'un mode de séchage

Nous avons mis au point dans un premier temps un test de viabilité afin d'évaluer la résistance des spores aux différents modes de séchage testés.

III.4.8.2.1. Test de viabilité

Deux techniques ont été utilisées :

a) Estimation de la viabilité sur boîtes de Pétri

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

NOMBRE DE COLONIES PREVUES	NOMBRE DE COLONIES VIABLES		MOYENNE	% DE COLONIES VIABLES
	ESSAI 1	ESSAI 2		
34	20	19	19,5	57
67	50	40	45	67
101	53	64	58,4	58

TAB N°15 : Détermination du nombre de spores viables sur boîte de Pétri

On observe d'importantes variations entre les résultats obtenus et les résultats attendus. Différentes explications peuvent être proposées [19] :

- certaines colonies correspondent à un amas de 2 ou 3 spores non dissociées.
- certaines spores germées n'aboutissent pas toujours à la formation d'une colonie.

b) Estimation de la viabilité sur cellule de Malassez

Nous posons comme hypothèse de départ, qu'une spore germée est une spore viable. Il est alors possible d'estimer le pourcentage de viabilité à partir du pourcentage de germination.

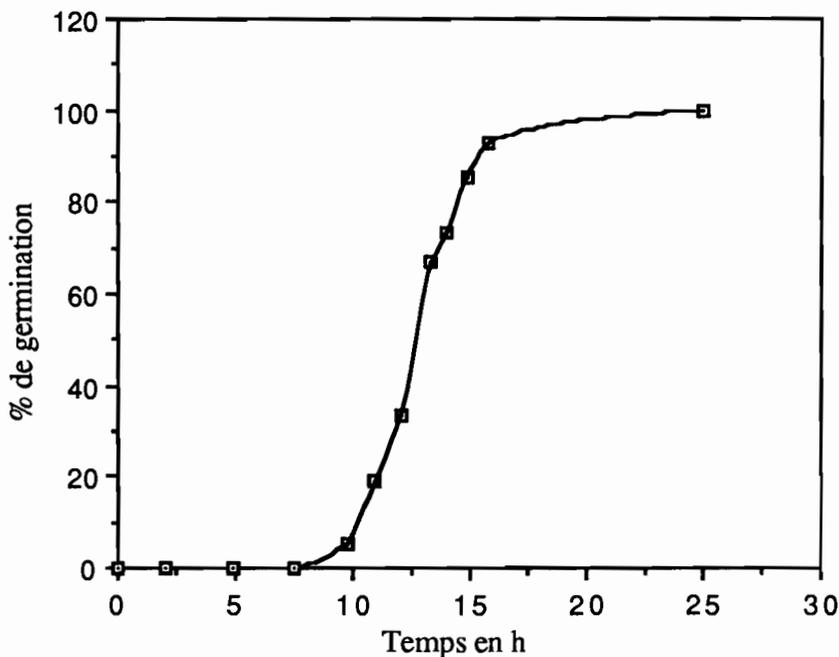


FIG N°21 : Cinétique de germination de *B. bassiana* sur milieu P.D.B

Le pourcentage de germination atteint 95 à 100% après 20 h d'incubation. Ce résultat a pu être vérifié et confirmé au cours de manipulations ultérieures. Cette méthode de détermination de la viabilité sur cellule de Malassez sera celle retenue pour la suite de notre étude en raison de sa fiabilité.

Ainsi pour estimer la viabilité des spores, nous déterminerons le pourcentage de germination entre 20 et 25 h.

III.4.8.2.2. Essai de différents modes de séchage

Les différents modes de séchage disponibles au laboratoire ont été testés :

- lyophilisation
- lyophilisation + 10 % de lait écrémé
- lyophilisation + 10 % d'inositol
- Séchage avec une balance à infra rouge Mettler à 50°C
- Séchage à l'étuve à 45°C
- Séchage à l'étuve à 50 °C

Un test de viabilité est réalisé sur les différents échantillons immédiatement après séchage et également après 3 mois de conservation à 4°C.

MODE DE SECHAGE	SPORES GERMEES x 10 ⁹	SPORES NON GERMEES x 10 ⁹	% VIABILITE A T=0	% VIABILITE A T= 3MOIS
SOLUTION DE LAVAGE	13,1	0,55	96%	---
LYOPHILISATION	7,55	2,5	75%	50,95
LYOPHILISATION + LAIT ECREME	21,9	7,85	74%	56,7
LYOPHILISATION + INOSITOL	14,32	5,1	74%	51,8
ETUVE A 45°C	15,4	1,05	94%	92%
ETUVE A 50°C	12,25	10,35	54%	44,4
INFRA ROUGE A 50°C	10,35	0,25	99%	96%

TAB N°16 : Comparaison de la viabilité des spores après différents modes de séchage à T=0 et T=3mois

Les résultats de ces tests montrent que :

- il est possible de conserver 95 à 100 % des spores viables par séchage à l'infra-rouge ou à l'étuve à 45°C même après trois mois de conservation à 4°C.
- Au cours de la lyophilisation, 25 % des spores sont tuées. L'ajout d'adjuvant protecteur (lait écrémé ou inositol) n'améliore pas la conservation.
- Une température de séchage trop élevée (étuve à 50°C) a un effet négatif sur la viabilité des spores

Remarque : il est guère envisageable d'utiliser un procédé de séchage tel que l'étuve ou la balance à infra rouge pour des quantités industrielles ou même pilotes. L'objectif de cette étude est de donner quelques éléments de comparaison, afin de faciliter le choix du procédé de séchage à retenir pour traiter des quantités de spores importantes.

III.4.8.3. Récolte à sec

Lors de cultures réalisées en fiole, nous avons pu remarquer qu'après 2 à 3 semaines d'incubation, il était possible de décrocher les spores de la surface de la gélose en appliquant plusieurs chocs à la fiole. Nous avons donc cherché à exploiter ce phénomène au niveau du réacteur à disques de 1,7 litres en vue de limiter les étapes d'extraction et de séchage qui interviennent lors de la récolte en milieu liquide.

Pour cela, nous avons réalisé trois types de fermentation :

- sur milieu gélosé classique
- sur support imprégné de milieu liquide
- sur support imprégné avec glaçage de la surface des disques

Après 8 jours d'incubation les disques sont séchés en faisant circuler dans le réacteur un fort débit d'air chaud et sec. Au bout de 24 heures, les disques sont parfaitement secs. Le réacteur est alors fixé sur une table vibrante et soumis à de très fortes secousses. Le traitement dans chacun des cas, n'a pas permis de décrocher les spores.

A défaut d'un procédé de récolte à sec efficace, nous avons conservé jusqu'à présent la récolte en milieu liquide. Cependant, toute autre possibilité de récolter les spores à sec devra être prise en considération en raison de l'intérêt certain que présente un tel procédé.

III.4.9. Qualité du produit

Dans tout procédé de fabrication il faut établir des critères d'appréciation de la qualité du produit.

Dans le cas présent, le premier critère à prendre en compte est l'efficacité de la spore, c'est à dire son pouvoir pathogène à l'égard d'*O.nubilalis*. Cependant seul des essais en champ permettraient d'évaluer ce critère, ce qui n'est pas envisageable au niveau du laboratoire.

Nous avons donc basé notre estimation de la qualité du produit sur deux autres critères :

- la détermination de la viabilité
- la pureté des spores produites

Le test de viabilité que nous avons mis au point a permis de mettre en évidence que 100% des spores conservaient leur capacité germinative (cf : III.4.8.2.1.)

La pureté quant à elle, a été estimée en recherchant dans les solutions de lavage du réacteur, la présence d'éventuels contaminants. Un aliquot de ces solutions a été étalé sur des milieux favorisant la croissance des champignons (PDA) et de la plupart des bactéries (nutriment Agar). Aucun contaminant n'a pu être mis en évidence au cours de ces tests.

Sur la base de ces deux critères, il est possible de conclure que la qualité des spores produites est très satisfaisante.

RESUME - CONCLUSION

IV. RESUME - CONCLUSION

L'objectif de cette étude était : l'adaptation d'un procédé de production de spores de cham-pignons filamenteux en réacteur à disques mis au point à l'O.R.S.T.O.M, à la production de spores de *Beauveria bassiana* en vue de son industrialisation par la société CAL-LIOPE.

Dans un premier temps, les résultats des expériences définies selon un plan d'expériences factorielles 2^3 nous ont permis :

- de déterminer les constituants essentiels jouant un rôle important sur la production de spores (extrait de levure, glucose, amidon, phosphate).
- de formuler un nouveau milieu (H2) permettant de multiplier par facteur 5 les rendements de production qui avaient servi aux calculs de base de l'extrapolation du procédé.

En ce qui concerne la recherche des conditions optimales de culture, il a été démontré que :

- une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 3$, ainsi qu'un débit d'aération de $2,3 \text{ l/m}^2$ de surface utile, sont nécessaires pour obtenir l'optimum de sporulation.
- la quantité de spores récoltées est dépendante de la quantité de milieu retenu par unité de surface sur les disques.
- le mode d'inoculation (en masse ou en surface), la luminosité et le degré d'humidité relative du flux d'aération n'ont pas d'influence significative sur le nombre de spores produites.

La plus grande partie de cette étude a été consacrée à la mise au point d'une méthodologie de production en réacteur à disques.

Il a été mis en évidence que la rétention du milieu gélosé sur la surface des disques constituait l'étape limitante du procédé.

L'utilisation de support absorbant s'est révélée être une solution intéressante à ce problème car elle permet :

- de retenir les quantités de milieu désirées
- de faciliter l'étape de répartition du milieu sur les disques.
- d'obtenir une parfaite extrapolation des résultats obtenus en fioles au stade fermenteur de laboratoire.

Cependant 10 cycles successifs de fermentation sont nécessaires pour que le procédé soit rentable, la durée limitée du contrat ne nous a pas permis d'avancer notre étude jusqu'à ce stade.

Le suivi de la croissance du champignon peut être réalisée par l'analyse des pourcentages d'O₂ et de CO₂ dans le flux d'air sortant du réacteur. Un nouveau système d'aération est proposé afin de permettre une meilleure homogénéité de l'atmosphère dans le réacteur.

Des essais de récolte des spores à sec et en milieu liquide ont été également conduits. A défaut d'un procédé à sec efficace, nous préconisons un glaçage de la surface des disques avec de la gélose qui permet une bonne récolte en milieu liquide. Dans ces conditions, il est alors possible de récolter 95 % des spores produites au bout de trois lavages, de plus les supports restent relativement propres.

Sur la base de ces résultats, une étude de l'extrapolation du réacteur de 12.4l à un pilote de 1M³ a été réalisé par (MONTALTI et al ; 1989 , [32]). La simplicité du procédé tel qu'il est décrit laisse envisager la possibilité d'une bonne extrapolation des rendements de production à ce stade pilote.

Les avantages que présentent ce nouveau procédé :

- grande surface de culture
- récolte aisée des spores par simple lavage des surfaces
- conditions d'aseptie strictes
- simplicité

ainsi que les résultats encourageants obtenus ici, confirment l'intérêt certain de poursuivre cette étude à un stade supérieur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

V . REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] - FERRON P. (1978) : Biological control of insect pests by entomogenous fungi .
Ann . Rev . Entomol ., **23**, 409-442.
- [2] - LISANSKY S.G. & HALL R.A. (1983) : Fungal control of pest . In : The filamentous fungi . IV., Ed . by SMITH J.E., BERRY D.R. and KRISTIANSEN B; Arnold Ltd, 327-347.
- [3] - RIBA G. & SILVY C. (1989) : In : Combattre les ravageurs des cultures, enjeux et perspectives . Ed. I.N.R.A., 230p.
- [4] - AUGÉ J. (1985) : Influence de l'infection de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sur l'activité des larves et sur le potentiel biotique des adultes de *Leptinotarsa decemlineata* SAY . Thèse . Entomologie Paris XI ORSAY, 60p.
- [5] - RIBA G., MARCANDIER S., RICHARG G. & LARGET L. (1983) : Sensibilité de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) [Lep : *pyralidae*] aux hyphomycètes entomopathogènes . Entomophaga ., **26(1)**, 55-64.
- [6] - GUERIN A . (1986) : Etude de l'efficacité d'une préparation à base de spores de *Beauveria bassiana* contre la pyrale du maïs dans la Vienne . Les colloques de l' I.N.R.A., **34**, 141-147. Ed. I.N.R.A.
- [7] - BRETON A. (1985) : Identification des moisissures . In : Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle . Ed. by MASSON , 34- 208.
- [8] - ANDERSON T.E., ROBERTS D.W. & SOPER R.S. (1988) : Use of *Beauveria bassiana* for suppression of Colorado potato beetles population in New York state (*Coleoptera* : *Chrysomelidae*). Environ . Entomol ., **17(1)**, 140-145.

- [9] - VLCEK V. & KYBAL J. (1981) : Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations . Journal of Invertebrate Pathology., **38**, 169-174 .
- [10] - RIBA G. (1984) : Application en essais parcellaires de plein champ d'un mutant artificiel du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Hymophycète) contre la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* [Lep : pyralidae] . Entomophaga ., **29**(1), 41- 48.
- [11] - RAMOSKA W.A. & TOD T. (1985) : Variation in efficacy and viability of *Beauveria bassiana* in the chinch bug (*Hemiptera* : *Lygaeidae*) as a result of feeding activity on selected host plants . Environ . Entomol ., **14**(2) , 146-148.
- [12] - VEY A., QUIOT J.M. & VAGO C. (1973) : Mise en évidence et étude de l'action d'une mycotoxine, la beauvéricine, sur des cellules d'insectes cultivées in vitro . C.R. Acad. Sci., Paris, Ser.D, **276**, 2489-2492 .
- [13] - TIGANO M. (1985) : Contribution à l'étude de la variabilité génétique de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, hyphomycète entomopathogène . Thèse Paris V1,170p.
- [14] - FERRON P. (1967) : Les possibilités de lutte microbiologique contre *Melolontha melolontha* L. au moyen de la mycose à *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemaszko . In : Insect pathology and microbial control . Proceed . Intern . Colloq . Insect . Pathol . Microbiol . Control . Wageningen . 1966. North Holland Publish . Co. 204-209.
- [15] - RIBA G. (1986) : Perspectives offertes par le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. dans la lutte contre les ravageurs de grandes cultures . Les colloques de l'I.N.R.A., **34**, 131-140. Ed. I.N.R.A.
- [16] - JUNG G. : Lutte biologique - obtention de préparation active à base de blatospores de *Beauveria bassiana* (entomopathogène) et de *Pseudomonas syringiae* . Rapport d'étude . Centre de recherche de la Croix de Berny.

- [17] - BIDOCHKA M.J., PFEIRFER T.A. & KHACHATOURIANS G.G. (1987) : Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures . Mycopathologia ., **99**, 77-83.
- [18] - RIBA G. & GLANDARD A. (1980) : Mise au point d'un milieu nutritif pour la culture profonde du champignon *Nomurae rileyi* . Entomophaga ., **25(3)**, 317- 322.
- [19] - FARGUES J., ROBERTS P.H. & REISINGER O. (1979) : Formulations des productions de masse de l'hyphomycète entomopathogène *Beauveria* en vue des applications phytosanitaires . Ann . Zool . Anim ., **11(2)**, 247-257.
- [20] - VEZINA C. & SINGH K . (1983) : Transformation of organic compounds by fungal spores . In : The filamentous fungi . I., Ed . by SMITH J.E., BERRY D.R. and KRISTIANSEN B; Arnold Ltd,158-192 .
- [21] - CATROUX G., CALVEZ A., FERRON P. & BLACHERE . (1970) : Mise au point d'une préparation à base de blatospores de *Beauveria tenella* (Delacr.) SIE-MASZKO pour la lutte microbiologique contre le ver blanc (*Melolontha melolontha* L.) . Ann . Zool . Ecol . Anim ., **2(2)**, 281-294 .
- [22] - RAIMBAULT M. & ROUSSOS S. (1985) : Procédé de production de spores de champignon filamenteux . Brevet français N° 85.08555.
- [23] - Rapport interne Société CALLIOPE : Développement industriel et marketing d'un nouveau biopesticide à base de spores d'un champignon entomopathogène (*Beauveria bassiana* .bals. Vuillemin) .
- [24] - DE MEO M., LAGET M., PHAN-TAN-LUU R., MATHIEU D. & DUMENIL G (1985) : Application des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture en fermentation . Bio-Sciences ., **4 (4)**, P ?.
- [25] - FARGIN E., SERGENT M., MATHIEU D. & PHAN-TAN-LUU R. (1985) : Approche méthodologique de la recherche expérimental . Bio-Sciences., **4 (4)**, 77-82.

- [26] - PANDIT N.C. & SOM D. (1988) : Culture of *Beauveria bassiana* and its pathogenicity to insect pest of jute (*Corchorus capsularis* and *C. olitorius*) and mesta (*Hibiscus cannabinus* and *H. sabdariffa*) . Indian Journal of Agricultural Sciences., **58**(1),75-76.
- [27] - SMITH R.J. & GRULA E.A. (1981) : Nutritional requirements for conidial germination and growth of *Beauveria bassiana* . Journal of Invertebrate Pathology., **37**, 222-230.
- [28] - NAHAS E. & NEUZA NAOMI SHIOMATSU ARAI . (1987) : Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* in different media and culture conditions . Rev . Microbiol., **18**(1) , 77-82.
- [29] - COONEY C.L., WANG D.I.C. & MATELES R.I. (1968) : Measurement of heat evolution and correlation with oxygen consumption during microbial growth. Biotechnol . Bioeng., **11**, 269-281.
- [30] - ERIKSSON R. & HOLME T. (1973) : The use of microcalorimetry as an analytical tool for microbial processes . Biotechnol . Bioeng. Symp ., **4**, 581-590.
- [31] - RAIMBAULT R. (1981) : Fermentation en milieu solide . Travaux et documents de l' O.R.S.T.O.M. N° 127, 291p.
- [32] - MONTALTI P. & NICAUD I. (1989) : Faisabilité de l'industrialisation d'un procédé de production de spores de *Beauveria bassiana* . Rapport de stage interne, 48p.

ANNEXES

ANNEXE 1

PRIX DES REACTIFS

REACTIF	PRIX (F/Kg)	QUANTITE (ORDRE DE GRANDEUR)	FOURNISSEUR
Extrait de levure	35	25Kg	FOULD SPRINGER
Corn steep liq(AST)	5.5	20 T	ROQUETTES
Amidon de maïs	3.5	20 T	ROQUETTES
Amidon de maïs	6.5	1T	INTERCHIM
Glucose (Nutriose L99)	3.9	20T	ROQUETTES
roférose(gluc poudre)	5	1T	ROQUETTES
Sorbitol (liq)	6-7	1T	ROQUETTES
Glucose	9	1T	INTERCHIM
Agar	240	25Kg	?
Satiagel MR200	83	1T	M.R.S.
Aubygel TKS	57.5	1T	M.R.S
Flanogene 523	56.5	1T	M.R.S
Caroube	4	25Kg	M.R.S
KH ₂ PO ₄	24	100Kg	INTERCHIM
NA ₂ HPO ₄	16	100Kg	INTERCHIM

REACTIF	PRIX (F/Kg)	QUANTITE (ORDRE DE GRANDEUR)	FOURNISSEUR
Urée	7	100Kg	INTERCHIM
KCl	10	50Kg	PROLABO
MgSO ₄ .7H ₂ O	13	100Kg	INTERCHIM
Alanine	121	100Kg	INTERCHIM
(NH ₄) ₂ SO ₄	12	100Kg	INTERCHIM
NaNO ₃	16.2	50Kg	PROLABO
NH ₄ NO ₃	10.8	50kg	PROLABO

Centre ORSTOM / CALLIOPE
Unité de Bio-Technologie
2051 Avenue du Val de Montferrand

F - 34032 Montpellier

France

Vileda GmbH
6940 Weinheim

Postfach 10 11 47

Telex 465 564

Telefon (06201) Sammel-Nr 80-1

Telefax (06201) 12991

Banken

Bezirkssparkasse Weinheim Nr 00026999

Biz 670 523 85

Volksbank Weinheim Nr 1226509 Biz 670 923 00

Deutsche Bank Weinheim Nr 58/50300 Biz 670 700 1

Postgirokonto Karlsruhe Nr 40 56-753

Durchwahl 80-

Sachbearbeiter

Ihr Zeichen	Ihre Nachricht	Unsere Abt	Unser Zeichen	Datum
		Export	PF/bi	28 avril 1989

Monsieur Giraud,

Récemment nous vous avons informé que nous vous avons envoyé un échantillonnage des essais nos. 1 et 2, désirés par vous.

Il s'agit ici d'une fabrication absolument spéciale dans notre usine pour utilisation scientifique. Veuillez tester avec de nouveaux essais si notre matériel est adapté, et éventuellement nous sommes prêts de faire de nouveaux essais selon vos propositions.

Pour ces qualités spéciales nous vous soumettons notre offre comme suit:

qualité no. 1: FF 110,20/m² franco Montpellier
=====

qualité no. 2: FF 96,50/m² franco Montpellier
=====

Nous attendons avec grand intérêt votre commentaire et sommes aussi prêts de vous rendre visite à Paris à court terme, afin d'avoir des entretiens concernant l'évolution future.

Veuillez agréer, Monsieur Giraud, l'expression de nos salutations distinguées.

V I L E D A GMBH.


(Franzen)