

ISSN 0330 - 7956



# REVUE DES REGIONS ARIDES

Numéro spécial

Éditée par l'Institut des Régions Arides - Médenine - TUNISIE

**Actes du 3<sup>ème</sup> Meeting International sur  
l'Aridoculture et les Cultures Oasiennes sous  
le thème:**

**Gestion et valorisation  
des ressources et applications  
biotechnologiques  
dans les agrosystèmes arides  
et sahariens**

**Jerba, Tunisie 15-17 Décembre 2009**

**Volume 3**

**Caractérisation et optimisation des conditions de croissance d'un biopesticide bactérien**

Jemni Monia<sup>(a)</sup>, Maaroufi Abderrazek<sup>(b)</sup>, Mejri Slah<sup>(c)</sup>

**Novembre 2010**

## Caractérisation et optimisation des conditions de croissance d'un biopesticide bactérien

Jemni Monia<sup>(a)</sup>, Maaroufi Abderrazek<sup>(b)</sup>, Mejri Slah<sup>(c)</sup>

<sup>(a)</sup> [jennimoniam@yahoo.fr](mailto:jennimoniam@yahoo.fr)

<sup>(b)</sup> Institut Pasteur de Tunisie

<sup>(c)</sup> Institut National Agronomique de Tunisie

### Résumé :

La première partie de l'étude a été consacrée à l'identification de deux bactéries par des tests microbiologiques et biochimiques qui ont montré que ces deux souches appartiennent à l'espèce *Bacillus subtilis*. Leur effet antifongique a été testé sur des champignons phytopathogènes tels que *Alternaria alternaria*, *Botrytis cineria* et *Fusarium sp.* Cet essai a montré qu'elles ont manifesté une activité antifongique. L'étude moléculaire du produit de fermentation a montré que *Bacillus subtilis* produit une protéine antibiotique de 63 kilodaltons ayant une activité contre les bactéries Gram positif et les champignons. L'optimisation des conditions de croissance de ces bactéries a donné les résultats suivants : pH =7, température de 30°C, [sucres]=20g/l, [extrait de levure]=3g/l, [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=2g/l, [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]=1g/l, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]=2g/l et [MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O]=0,5g/l.

**Mots clés :** biopesticides, effet antifongique, optimisation, conditions de croissance.

### Abstract:

This study is focused in first part on identification of bacteria by microbiological and biochemical tests shows that the two bacteria belong to *Bacillus subtilis* species. Then, their antifungal effect is tested on some fungi like *Alternaria alternaria*, *Botrytis cineria* and *Fusarium*. This assay has proved the antifungal activities of these bacteria. In the other hand, the molecular study of fermentation product shows that *Bacillus subtilis* produce an antibiotic protein with a molecular mass of 63 kilodaltons having an activity against Gram positive bacteria and fungi. In the second part, optimization of bacteria growth conditions was investigated. The following results were found: pH =7, temperature of 30°C, [sugar] =20g/l, [yeast extract] =3g/l, [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] =2g/l, [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] =1g/l, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] =2g/l and [MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O] =0,5g/l.

**Keywords:** biopesticide, antifungal effect, optimization, growth conditions.

## 1.Introduction

*Bacillus subtilis* est une bactérie du sol, à Gram positif, mobile par des flagelles peritriches, aérobie, mais dans le cas de la présence de glucose et de nitrate, une croissance anaérobie peut se produire. Cette bactérie est capable de produire une endospore ayant une haute résistance aux conditions défavorables (Priest et al,1987). *Bacillus subtilis* est connue par sa production abondante de protéines (Ling *et al.* ; 2007). Elle produit des lipopeptides bioactifs tels que : l'iturine, la surfactine et la fengycine avec un haut potentiel d'application en biotechnologie et en pharmacie. Cette bactérie est considérée comme une alternative à l'utilisation de surfactants chimiques dans la protection des végétaux. Les molécules comme la mycosubtiline est un membre de la famille d'iturine et a un haut potentiel comme un antifongique (Guez *et al.* ; 2007).

La production de biopesticide à partir d'une bactérie du genre *Bacillus* nécessite l'isolement de souches efficaces contre certaines pathologies des plantes. Dans notre étude, deux souches appartenant au genre *Bacillus* ont été gracieusement fournies par l'Institut de l'Olivier de Sfax. Dans cette étude, on a entrepris l'identification de ces deux bactéries et la confirmation de leurs propriétés biopesticides. La deuxième étape a été consacrée à la détermination les valeurs optimales des facteurs physicochimiques de la croissance de ces microorganismes (pH, température,...).

## 2. Matériel et méthodes

### Identification des souches

Les souches ont été identifiées en testant certaines caractéristiques générales telles que les caractères morphologiques sur milieu gélose nutritif ordinaire (Peptone de gélatine 5 g, extrait de viande de bœuf 3g, eau 1l), la forme des cellules sous microscope, le type respiratoire sur gélose viande foie, la capacité de sporulation par méthode de Bartholomew et Mittwer (1953), l'assimilation de certains sucres (Galerie API 50 CH/B) et électrophorèse sur gel SDS PAGE (Laemmli, 1970).

### Activité antifongique de deux bactéries

On a testé les champignons phytopathogènes les plus répons dans la nature tels que : *Penicillium italicum*, *Botrytis cineria*, *Alternaria alternaria*, *Aspergillus niger* et *Fusarium* (gracieusement fournie par le laboratoire de Phytopathologie de l'INAT). L'étude de l'activité antifongique de deux bactéries a été effectuée par deux méthodes:

### Première méthode

La bactérie isolée a été étalée sous forme d'une ligne droite passant par le centre d'une boîte de pétri de 9 cm. Deux disques de 5mm de diamètre ont été prélevés à partir du front de croissance d'une culture fongique âgée de 7 jours. Ces disques ont été par la suite placés à une distance de 2,5 cm de la bactérie. La boîte contenant les deux microorganismes a été incubée à 25°C pendant une semaine. Le pourcentage d'inhibition de croissance du

champignon a été calculé par la formule suivante :  $PI = \frac{R_1 - R_2}{R_1} * 100$ , avec  $R_1$  : est la distance radiale la plus

large en mm de croissance du champignon après 7 jours d'incubation dans la direction de l'antagoniste.  $R_2$  : est la distance de croissance du champignon à partir du point d'inoculation jusqu'à les frontières de colonie en direction de l'antagoniste (Whipps, 1987).

### Deuxième méthode

Dans le but de voir l'effet antagoniste entre la bactérie et certains champignons phytopathogènes, on a procédé à l'ensemencement d'un milieu de culture PDA (gélose de pomme de terre agar) (45°C) par un champignon. Après solidification du milieu, deux disques de filtres stériles contenant 50µl de milieu de fermentation de la bactérie ont été déposés sur la gélose. Les boîtes ont été incubées à 25°C pendant 24h (Tagg et McGiven, 1971).

### Optimisation des conditions de croissance des bactéries

On a cherché les conditions de croissance optimales de deux bactéries : le pH, température, concentration des sucres et la concentration d'extrait de levure. Chaque paramètre a été testé pour différentes valeurs en maintenant constantes les concentrations des autres variables.

### Electrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécylsulfate de sodium (SDS PAGE)

Dans un SDS-PAGE, l'échantillon protéique est traité avec un agent réducteur le 2-mercaptoéthanol pour rompre les liaisons disulfures puis avec un agent anionique, le dodécylsulfate de sodium (SDS), qui dénature les protéines et leur confère une enveloppe de charge négative. L'échantillon est alors fractionné par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Toutes les protéines ayant désormais un rapport charge/masse identique, elles sont séparées sur la seule base de leur masse. Les plus petites protéines migrent plus rapidement. Le gel de séparation utilisé dans notre essai a été de l'ordre de 12% SDS.

A la fin de la migration, le gel est coloré au bleu de coomassie pendant une heure et décoloré dans un mélange de méthanol 30%, acide acétique 7,5% (Laemmli, 1970).

### Concentration minimale inhibitrice de surnageant pour les champignons

Le produit de fermentation a été centrifugé à 5000 tours/minute pendant 30 minutes, puis filtré par un filtre stérile 0,22µm. le surnageant a été dilué avec l'eau distillée stérile pour des concentrations différentes. Un volume de 0,1 ml de champignon testé précédemment (*Aspergillus nigers*) a été étalé sur le milieu de culture PDA. Un papier filtre stérile imbibé avec 50 µl de surnageant a été ensuite placé dans la boîte qui a été ensuite incubée à 25°C pendant 24h (Tagg et McGiven, 1971).

## 3. Resultats et discussion

### Identification des souches isolées

Sur un milieu de culture gélosé (gélose nutritive ordinaire), les deux bactéries isolées apparaissent sous forme de colonies blanches, à marge ondulée et à surface cratériforme. Ils ont un envahissement abondant sur tout le milieu de culture et une consistance crémeuse et un diamètre entre 2 et 7 mm. Dans les vieilles cultures, les colonies présentent un aspect sec et s'incrudent dans la gélose. Les colonies sont de forme rhizoïdes (figure1).



**Figure 1:** Colonies étalées de forme rhizoïde, envahissante



**Figure 2:** Observation microscopique de la bactérie, coloration Gram

L'observation microscopique montre des microorganismes en bâtonnets. Ils se présentent sous forme isolée ou sont regroupés par paires ou chaînettes. Ils sont Gram positif, flagellés et sporulant (figure2).

L'étude biochimique des bactéries montre qu'elles sont aérobies, catalase positive, oxydase négatif. En saisissant les résultats des galeries API dans un logiciel d'identification biochimique des bactéries API LAB, on a remarqué que les deux souches de *Bacillus* appartiennent à l'espèce de *Bacillus subtilis*.

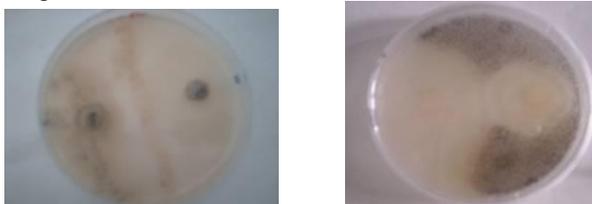
### Activité antifongique de deux souches de *Bacillus*

Nous avons testés les champignons phytopathogènes les plus répons dans la nature tels que : *Penicillium italicum*, *Botrytis cineria*, *Alternaria alternaria*, *Aspergillus niger* et *Fusarium sp.*, (gracieusement fournie par le laboratoire de Phytopathologie de l’INAT) ont donné les résultats résumés en tableau 1:

**Tableau 1:** Taux d’inhibition des champignons par les deux souches de *Bacillus* en % (mm/mm)

Bactérie	SB1	SB2
<b>Champignon</b>		
<i>Aspergillus niger</i>	70	70
<i>Alternaria alternaria</i>	76	52
<i>Penicillium italicum</i>	75	50
<i>Botrytis cinéria</i>	50	50
<i>Fusarium sp.</i>	62	60

D’après le tableau 1, les deux souches montrent des pourcentages d’inhibition pour ces différents champignons. Ces résultats permettraient de conclure que ces bactéries ont une activité antifongique importante. Ainsi, il est intéressant d’étudier la cinétique et les conditions de croissance de ces bactéries.



**Figure 3:** Activité des souches de *Bacillus* sur les champignons

### Optimisation des conditions de croissance des bactéries

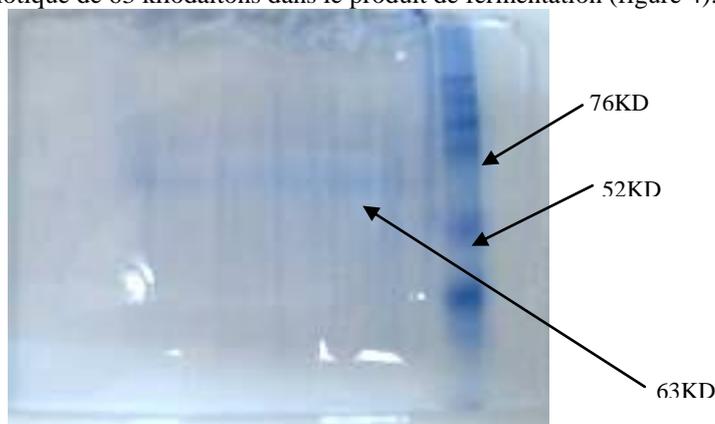
On remarque que les conditions de croissance de deux souches sont semblables:

- pH optimal est pH= 7 : D’après Zhou J.W. *et al.* (2007), les bacilles peuvent croitre dans un domaine de pH entre 3 et 9 et le pH optimal de croissance des bacilles est aux alentours de 7
- Température optimale est 30°C : Ce résultat est démontré par Guez *et al.* (2007) qui confirme que la température optimale de croissance de *Bacillus* sporulant aérobie est 30°C.
- Concentration optimale en glucose est 20g/l
- Concentration optimale en extrait de levure est 3g/l

### Electrophorèse des protéines produites

D’après l’agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de santé du Canada (2007), *Bacillus subtilis* produit une protéine antibiotique de 63 kilodaltons dont l’activité a été démontrée contre les bactéries Gram positif et les champignons, mais pour laquelle aucune toxicité chez les mammifères n’a été relevée.

En faisant un gel SDS page pour le produit de fermentation de la bactérie, on a obtenu une bande dont le poids moléculaire, selon le marqueur de poids, est situé entre 52 et 76 kilodaltons. Le résultat confirmerait la présence de la bande de la protéine antibiotique de 63 kilodaltons dans le produit de fermentation (figure 4).



**Figure 4:** Figure d’un gel d’électrophorèse

#### Concentration minimale inhibitrice de surnageant pour les champignons

A partir d'un produit de fermentation de *Bacillus subtilis* ayant une concentration en protéine de 6,2mg/ml, on a fait une série de dilutions. On a ensemencé un milieu de culture de pomme de terre agar par un champignon *Aspergillus niger* à concentration de  $5,15 \cdot 10^4$  UFC/ml par étalement. Puis, nous avons mis des disques contenant 50µl de produit de fermentation. Nous avons vu une inhibition par le produit de fermentation à partir de la concentration de 6,2µg/µl (figure 5).



Figure 5: Inhibition par les métabolites de fermentation

#### 4. Conclusion

L'identification de ces bactéries par les tests microbiologiques et biochimiques (galerie API 20E et API 50CH) montre bien que les deux bactéries sont des souches de l'espèce de *Bacillus subtilis*.

L'étude de l'effet antifongique *in vitro* de ces bactéries sur les champignons phytopathogènes les plus répandus dans la nature tels que *Aspergillus niger*, *Alternaria alternaria*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cineria* et *Fusarium* a montré que les deux souches isolées sont dotées d'une activité antifongique.

L'analyse moléculaire du produit de fermentation a montré que *Bacillus subtilis* produit une protéine antibiotique de 63 kilodaltons ayant une activité contre les bactéries Gram positives et les champignons.

En fin, l'optimisation des conditions de croissance des deux bactéries en erlenmeyer sur la base de la vitesse spécifique de croissance de ces bactéries nous a permis d'obtenir les valeurs optimales suivantes : pH =7, température de 30°C, [sucres]=20g/l, [extrait de levure]=3g/l, [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=2g/l, [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]=1g/l, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]=2g/l et [MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O]=0,5g/l.

#### Remerciements :

Je remercie M. Rhouma Ali, chercheur à l'Institut de l'Olivier de Sfax pour avoir mis à notre disposition deux souches bactériennes.

#### 5. References bibliographiques

- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de santé Canada, 2007. *Bacillus subtilis* souche MBI 600. Valable sur internet : < URL: <http://www.pmla-arla.gc.ca/francais/pdf/prdd/prd2007-05-f.pdf>
- Bartholomew J. W. and Tod Mittler, 1953. Demonstration of yeast bud scars with the electron microscope. J Bacteriol; 65(3): 272-275.
- Guez J.S., Chenikher S., Cassar J.Ph. and Jacques P., 2007. Setting up and modeling of over flowing fed- batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. Journal of biotechnology. 131 (1): 67- 75.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259): 680- 685.
- Ling Lin F., Rong X., Wei Fen L., Jiang Bing S., Ping L. and Chun Xia H., 2007. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. Biotechnology Advances. 25 (1) : 1 – 12.
- Priest F.G., Goodfellow M., Shut L.A. and Berkeley R.C.W., 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. International Journal Systematic Bacteriol, 37 : 66-71.
- Tagg J.R., McGiven A.R., 1971. Assay for bacteriocins. Applied Microbiology 21: 943.
- Whipps J.M., 1987. Effet of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. New phytologist 107: 127- 142.
- Zhou J.W., Chang Y.F., Xu Z.H., Yu Z.N. and Chen S.W., 2007. Production of thuringiensin by fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis*. Subsp. darmstadiensis 032 with an improved pH-control glucose feeding strategy. Process Biochemistry. 42 (1) : 52 – 56.