

La lutte biologique contre l'Aspergillus flavus Détoxification des Aflatoxines par l'utilisation des souches Bactériennes

Ousmane Diarra^{1*}, Amadou Hamadou Babana¹, Mamadou Diarra¹, Kadia MAIGA¹, Fasse SAMAKE¹

¹Laboratoire de Recherche en Microbiologie et Biotechnologie Microbienne, Faculté des Sciences et Techniques, Université des Sciences, des techniques et des Technologies de Bamako, Bamako, Mali BPE : 3206

*Auteur correspondant: diarraousmane758@gmail.com

RESUME: La conservation post-récolte occupe une place importante dans l'atteinte de l'autosuffisance alimentaire des pays en voie de développement comme le Mali. L'alimentation apparaît comme la contrainte majeure au développement des productions animales au Mali (IER, 1993). La qualité de l'aliment bétail et sa disponibilité auprès des revendeurs causent d'énormes problèmes. En effet, les champignons toxigènes tels que *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* contaminent les récoltes et y produisent des aflatoxines qui sont reconnues cancérigènes pour l'homme et les animaux. Ces champignons provoquent ainsi une perte de la valeur nutritive et commerciale des récoltes. Les Mycotoxines se retrouvent dans les produits animaux. L'une des voies de lutte contre les champignons toxigènes est l'utilisation de Bactéries fongicides ou fongistatiques. La présente étude s'est intéressée à l'inhibition de la croissance et de la Détoxification d'aflatoxines chez une souche d'*Aspergillus* sp. Il est ressorti à l'issue de ce travail que la souche isolée, purifiée et caractérisée est productrice des aflatoxines et peut être classée comme appartenant à l'espèce *Aspergillus flavus*. Les propriétés fongistatiques et fongicides de la Bactérie OP6, OP1 et LTP2 ont été démontrées. Les Bactéries et leurs extraits ont été utilisés pour inhiber la croissance et la détoxification en aflatoxines produites par la souche isolée. Cette croissance a été inhibée de 65 % par OP6. La même souche Bactérienne a également détoxifié de 17,29%, la Bactérie OP1 5,05% et LTP2 de 9,49%.

Mots Clés : *Aspergillus* ; aflatoxines ; cancer du foie ; conservation ; Détoxification.

I. INTRODUCTION

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires des moisissures telles *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*. Celles-ci contaminent les récoltes lorsque les conditions climatiques sont favorables, abaissant ainsi leur valeur nutritive en produisant des mycotoxines (aflatoxines) reconnues cancérigènes. Les aflatoxines sont considérées comme les plus carcinogènes des toxines naturelles, par le centre international de recherche sur le cancer (IARC 1982). Au Mali, des études antérieures ont montré l'existence de fortes teneurs en mycotoxines (aflatoxines, fumonisines, Déoxynivalenol, Zearalenone) dans les céréales, les arachides et leurs produits dérivés. Le présent travail s'inscrit dans un programme de lutte contre l'*Aspergillus* et les mycotoxines (Aflatoxines) au sein de l'université de Bamako USTTB dans le Laborem Bio Tech.

Les objectifs spécifiques sont :

- l'isolement et la caractérisation d'une souche d'*Aspergillus* productrice d'aflatoxines, à partir d'Aliment Bétail ;
- l'étude des performances de production d'aflatoxines par la souche d'*Aspergillus* isolée ;

- l'inhibition de la croissance et de la détoxification d'aflatoxines produites par les souches Bactériennes.

Pour les tests d'inhibition, des souches bactériennes locales isolées, purifiées et stockées dans le Laborem Biotech ont été utilisées (OP1, OP6, LTP2).

II. MATERIEL ET METHODES :

2.1. Echantillonnage et identification des souches Bactériennes à propriétés antifongiques :

L'échantillonnage des souches bactériennes s'est déroulé, dans le Laborem Biotech du Mali à l'université des Sciences de Techniques et Technologiques de Bamako USTTB, à la suite des études de lutte Biologique. Il a concerné des souches bactériennes fongicides ou fongistatiques.

2.2. Isolement et caractérisation de la souche d'*Aspergillus* :

2.2.1. Isolement:

L'isolement de la souche est réalisé à partir d'un consortium de champignons poussés sur un échantillon d'aliment bétail cultivé sur le milieu PDA. La sélection de la souche est faite par repiquage en point par épuisement sur le milieu PDA. Pour la détermination systématique, la souche purifiée a été repiquée sur le milieu non sélectif Rose Bengal selon les méthodes utilisées par Hocking, 1982, Cotty, 1993 et Christensen, 1981

2.2.2. Caractérisation de la souche d'Aspergillus isolée:

Les caractères culturels tels que le diamètre, la couleur des colonies et la variation de la couleur en fonction du temps, le changement de couleur du milieu et la texture de la surface ont été évalués sur la souche isolée. L'étude des caractères microscopiques est réalisée à l'aide d'un microscope optique. Les caractéristiques microscopiques telles que présence ou absence de métules, arrangement et forme des phialides, forme et taille de la vésicule, forme, taille et couleur des conidies, couleur et taille du conidiophore, ont été étudiées.

2.3. Cinétique de la croissance des souches Bactériennes antagonistes:

La vitesse de croissance des trois souches bactériennes antagonistes a été déterminée dans des microplaques contenant le milieu PDA+ Chloramphénicol préalablement quantifié et calibré. Une colonie bactérienne a été suspendue dans de l'eau physiologique stérile et répartie dans les conditions d'asepsie dans les puits des microplaques contenant le milieu PDA liquide + Chloramphénicol à différents pH (5, 7 et 8,5) et incubé à différentes températures (25°C et 37°C) pendant 7 jours. L'évolution de la Biomasse Bactérienne a été quantifiée par la mesure de la densité optique des différents puits contenant différentes souches (OP6, OP1 et LTP2) par une série de mesure (18h, 36h, 54h, 72h, 90h, 108h, 126h, 144h).

2.4. Production d'aflatoxines :

La souche isolée est mise en culture sur le milieu AFPA et incubée à l'étuve entre (28-30°C) pendant 07 jours. La production d'aflatoxines est réalisée par culture de la souche d'Aspergillus isolée dans le milieu AFPA.

2.4.1. Extraction d'Aflatoxine à partir de l'aliment contaminé :

Les aliments bétail fortement contaminés en mycotoxines ont été sélectionnés pour l'étude. Les aflatoxines sont extraites à l'aide d'un solvant méthanol-eau (70:30; v/v) et purifiées dans une colonne chromatographique d'affinité pour les aflatoxines et dosées selon la méthode décrite par R Biopharm. Le dosage est réalisé après séparation en phase inversée (C18).

2.4.2. Contrôle de la croissance d'aspergillus sur le milieu solide:

La lutte biologique entre la souche d'aspergillus flavus et les bactéries ont été engagées dans des boîtes de pétrie dans le milieu PDA. Une spore d'aspergillus flavus et une colonie bactérienne ont été déposées simultanément dans les boîtes de pétrie et incubées à 37°C pendant 7 jours. Les effets antagonistes ont été déterminés par la mesure de diamètre d'inhibition du champignon par les Bactéries.

2.4.3. Contrôle de la croissance dans le milieu liquide à différentes températures :

La lutte biologique entre la souche d'aspergillus flavus et les bactéries ont été engagées dans des microplaques contenant le milieu PDA préalablement quantifié et calibré. Une spore d'aspergillus flavus et une colonie bactérienne ont été déposées simultanément dans les puits des microplaques et incubées à différentes températures (25°C et 37°C) pendant 7 jours. Les effets antagonistes ont été déterminés par la mesure spectrophotométrique de la densité optique des différentes plaques par une série de mesure (18h, 36h, 54h, 72h, 90h, 108h, 126h, 144h).

2.4.4. Contrôle de la croissance dans le milieu liquide à différents pH:

La lutte biologique entre la souche d'aspergillus flavus et les bactéries ont été engagées dans des microplaques contenant le milieu PDA préalablement quantifié et calibré. Une spore d'aspergillus flavus et une colonie bactérienne ont été déposées simultanément dans les puits des microplaques contenant des milieux à différents pH (5,7 et 8,5) et incubées à 37°C pendant 7 jours. Les effets antagonistes ont été déterminés par la mesure spectrophotométrique de la densité optique des différentes plaques.

2.5. Détoxification d'aflatoxines:

Des extraits totaux de souches Bactériennes (OP6, OP1, LTP2) sont obtenus par culture dans un milieu en croissance continue. La détoxification est conduite avec le culot et le surnageant Bactérien par la suivie de la cinétique de détoxification en fonction du temps une série de mesure spectrophotométrique avant et après l'ajout de l'extrait Bactérien a la solution d'aflatoxine purifiée et préalablement quantifié par le Rida Quick Scan de R Biopharm.

III. RESULTATS ET DISCUSSION:

3.1. Résultats de la culture cellulaire:

L'étude des caractères cultureux et microscopiques a été faite par référence aux travaux de Christensen, 1981, Guiraud, 1998 et Hocking, 1982.

3.2. Caractères cultureux: Le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et PDA) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C. Sur le milieu de culture *A. flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés.

3.3. Morphologie microscopique:

Les têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis réparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. Les vésicules sont sub-globuleuses, et mesurent 25 à 45 µm de diamètre. Les phialides (6-10 x 4-5,5 µm) sont insérées directement sur la vésicule (unisériées) ou portées par des métules. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de 3-6 µm de diamètre, de couleur verte pâle, verruqueuses. Les sclérotés, fréquents dans les isolats récents, sont globuleux à sub-globuleux, d'abord blanc puis virant au brun-rouge foncé et au noir.



Figure1. Colonies de la souche aflatoxinogène isolée



Figure 2. Tête conidienne de la souche aflatoxinogène isolée

3.4. Cinétique de la croissance des souches Bactériennes antagonistes sur milieu solide:

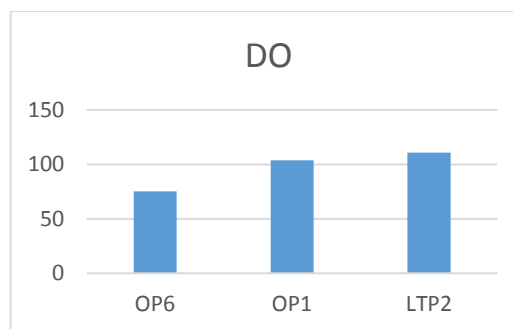


Figure 3: Cinétique de la croissance des souches Bactériennes antagonistes

3.5. Contrôle de la croissance aspergillus sur le milieu solide

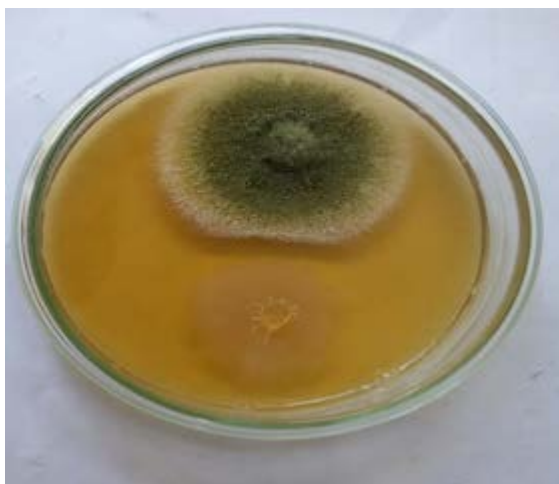


Figure 4: Contrôle de la croissance aspergillus par OP6

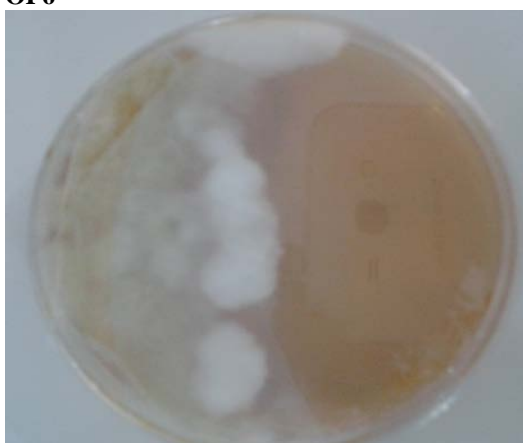


Figure 4: Contrôle de la croissance aspergillus par OP6

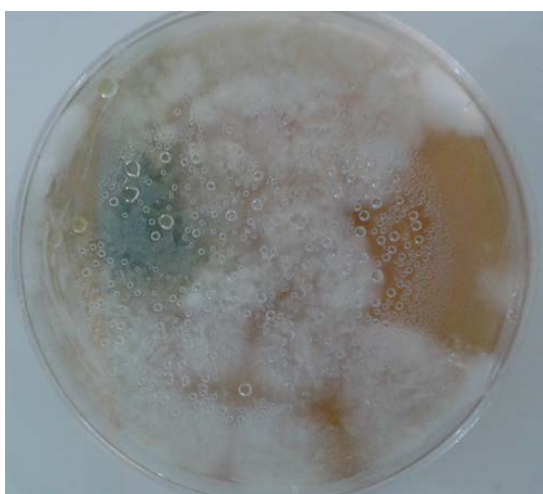


Figure 4: Contrôle de la croissance aspergillus par OP6

Essai de détoxification des Aflatoxines produites dans les aliments bétails :

Souche	Quantité en Aflatoxines μL /29,72ppb	Inhibition (%) Croissance
OP1	200	39%
OP6	200	65 %
LTP2	200	8,26 %

IV. Conclusion:

Le but de ce travail est d'optimiser l'emploi de micro-organismes pour lutter contre la prolifération de fongique et le contrôle de la production d'Aflatoxines, dont l'agent pathogène est l'Aspergillus flavus. La souche Toxino-pathogène Aspergillus flavus et les souches OP6, OP1 et LTP2 de Bacillus ont été utilisées.

Références bibliographiques:

- [1]I.A.R.C. Environmental carcinogens selected methods of analysis. 5. Some Mycotoxins. IARC Scient. Pub, 44, 1982.
- [2.]Nikiéma, P. A. Etude des aflatoxines au Burkina Faso: Détermination quantitative et qualitative des aflatoxines de l'arachide par des tests biochimiques et immunologiques. Thèse de Doctorat de spécialité Sciences Biologiques Appliquées. Université de Ouagadougou. 1993.
- [3].Sanou, D. Etude de la prévalence des mycotoxines dans les produits agricoles du Burkina Faso : Cas de la contamination du maïs (*Zea mays* L.) par les aflatoxines et les fumonisines dans l'Ouest du Burkina. Mémoire de DEA, université de Ouagadougou. 2000. .
- [4]Nikiéma, P. A. Dietary Patterns and exposure to aflatoxin in rural area of Burkina Faso: Design of a cross- sectional study. 1999.
- Hocking, A. D. Food Technology in Australia. 34 (1982) 1-3.
- [5] Cotty , P. J., Mycopathologia. 125 (1994) 157-162.
- Christensen, M. Mycologia. 73 (1981)1056-1084
- Kime, K.; Shon, D. H.; Yoo, J. Y.; Ryu, D.; Lee, C. et Kim, Y. B. Food Additives and Contaminants. 18 (2001) 151-156.
- [6] Kozakiewicz, Z. In Highley, E., et Johnson, G.I. (Eds). Mycotoxins contamination of grains. ACIAR Technical Reports 37 (1996) 18-26.
- [7] Guiraud, J. P., 1998. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, 1998 , p. 328-330.
- [8] Chang, P. K., Ehrlich, K.C., Yu, J., Bhatnagar, D. et Cleveland, T.E. Appl. Envir. Microbiol. 61 (1995) 2372-2377.
- [9] IER,2002. La recherche zootechnique au Mali : acquis, problèmes et perspectives. Institut d'Economie Rurale. Rapport de synthèse de recherche. 100p.