EXCALIBUR

PERCER LES SECRETS DE LA NATURE:
Les micro-organismes bénéfiques peuvent transformer la production agricole

Ce projet a reçu un financement du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne dans le cadre de la convention de subvention nº 817946.

Contenu

Introduction 4

Chapitre 1. Champignons mycorhiziens pour l'amélioration de la nutrition des plantes et de la croissance des cultures horticoles 6

1. Types de champignons mycorhiziens et leur capacité à coloniser les plantes 6

2. Effet des CMA sur la croissance, le rendement et la tolérance aux stress des plantes 10

3. Formulations et lignes directrices pour l'application à différents systèmes de culture horticole 13

4. Gestion des cultures pour mieux exploiter l'activité des CMA en proposant des pratiques de gestion augmentant l'efficacité des CMA dans la croissance et le rendement des cultures 14

Chapitre 2. Produits microbiens pour le biocontrôle des cultures horticoles 18

1. Utilisation des micro-organismes pour le biocontrôle 18

2. Biocontrôle des ravageurs et des pathogènes du sol : facteurs à prendre en compte pour obtenir une grande efficacité 21

3. Biocontrôle des ravageurs et des pathogènes affectant les organes aériens des plantes : aspects pratiques 25

4. La capacité multifonctionnelle des micro-organismes : une opportunité pour la lutte intégrée contre les ravageurs 30

Chapitre 3. Micro-organismes pour la promotion de la croissance des plantes 35

1. Micro-organismes capables de favoriser la croissance des plantes 35

1.1. Mode d'action - comment les micro-organismes favorisent-ils la croissance des plantes ? 36

1.2. Souches commerciales de PGPM - de la recherche à l'application 39

2. Exploitation des pré-, pro- et postbiotiques pour favoriser la croissance des plantes et améliorer la fertilité et la santé des sols 41

2.1. Comment sélectionner les prébiotiques, probiotiques ou postbiotiques bénéfiques pour les plantes ? 42

3. Aspects pratiques de l'application correcte des micro-organismes favorisant la croissance des plantes 44

Chapitre 4. Technologie de production de produits microbiologiques 50

1. Types de formulation (dans un contexte pratique -lesquels utilisons-nouset pourquoi ?). 50

2. Technologie de fabrication de produits microbiens 51

2.1. Sélection et isolement des micro-organismes 52

2.2. Banque 54

2.3. Inoculum 55

2.4. Les milieux nutritifs 56

2.5. Principaux éléments de la chaîne de production 57
2.6. Technologie de production de biopréparation 58
2.7. Surveillance et contrôle des variables affectant la croissance microbienne et le qualité 60
2.8. Considérations hygiéniques pour l'ensemble de la ligne 62
3. Efficacité biologique et commercialisation 62
3.1. Vérification de l'efficacité biologique en laboratoire 62
3.2. Vérification de l'efficacité biologique dans des conditions contrôlées 64
3.3. Vérification de l'efficacité biologique en conditions réelles 65
3.4. Solubilité, miscibilité et stabilité des biopréparations 65

Introduction

Il a été démontré que les micro-organismes et leurs communautés jouent un rôle essentiel dans la diversification et le fonctionnement de tous les autres organismes vivants. On sait que l'interaction entre les plantes et les micro-organismes influence la capacité de la plante à faire face aux stress abiotiques et biotiques, avec des implications importantes pour la production végétale. Grâce à cette compréhension, au cours des 20 à 30 dernières années, un grand nombre de micro-organismes ont été isolés, caractérisés et testés en tant que biofertilisants et agents de biocontrôle. Les résultats ont confirmé l'effet bénéfique des micro-organismes sélectionnés sur la croissance et la santé des plantes, ainsi que sur les propriétés du sol.

L'utilisation de micro-organismes bénéfiques dans la production végétale devient donc une pratique courante, puisque les produits à base de microbes sont reconnus comme des alternatives ou des compléments potentiels aux engrais et pesticides synthétiques, en particulier dans le cadre d'une agriculture moderne et durable et dans le contexte des préoccupations environnementales et climatiques. À cet égard, il convient de noter qu'au niveau de l'UE, les produits à base de microorganismes sont réglementés par le règlement (CE) n° 2019/1009 sur les produits fertilisants ou par le règlement (CE) n° 1107/2009 sur la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques.

Les produits à base de micro-organismes utilisés pour la nutrition des plantes, appelés "biostimulants microbiens" par la législation européenne, sont un moyen efficace de promouvoir la croissance et la production des plantes dans un contexte où l'utilisation d'engrais minéraux ou synthétiques est réduite. Les biostimulants microbiens sont des produits qui stimulent les processus de nutrition des plantes indépendamment de la teneur en éléments nutritifs du produit, dans le seul but d'améliorer une ou plusieurs des caractéristiques suivantes de la plante ou de la rhizosphère : efficacité de l'utilisation des éléments nutritifs, tolérance au stress abiotique, caractéristiques qualitatives, disponibilité des éléments nutritifs confinés dans le sol ou la rhizosphère. Parmi les biostimulants microbiens, quatre groupes de micro-organismes sont actuellement répertoriés parmi les produits fertilisants : trois bactéries fixatrices d'azote atmosphérique (*Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp.) et les champignons mycorhiziens, qui favorisent principalement la nutrition phosphatée, mais peuvent également contribuer à améliorer la nutrition azotée et des oligo-éléments.

D'autre part, les produits phytopharmaceutiques à base de micro-organismes sont considérés comme similaires aux produits synthétiques et, pour être homologués, ils doivent lutter efficacement contre l'organisme nuisible ciblé. En ce qui concerne la lutte contre les insectes, les champignons entomopathogènes constituent le groupe de micro-organismes qui a fourni les solutions les plus utiles. Les principales espèces utilisées à cette fin sont *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartti*, *Metarhizium anisopliae* et *Isaria fumosorosea*. Dans le cas des biofongicides, des formulations microbiennes sont disponibles pour les utilisations avant et après la récolte. Toutefois, dans ce cas également, la multitude d'espèces et de souches connues pour leur activité de biocontrôle ne correspond pas au nombre limité de micro-organismes enregistrés en tant que substances actives.

Bien que les produits à base de microbes aient été utilisés avec succès dans l'agriculture jusqu'à présent, les agriculteurs sont encore réticents à les appliquer à grande échelle. Cela est dû à une connaissance limitée de l'impact que les méthodes d'application et les pratiques de gestion des cultures peuvent avoir sur l'efficacité des produits microbiens. Les connaissances relatives à l'application sur le terrain sont limitées en ce qui

concerne les exigences de dosage ou les interactions spécifiques du bioinoculant avec le biote indigène du sol. En outre, une analyse récente des produits présents sur le marché au niveau mondial a souligné la nécessité d'un développement intégré des produits à base de microbes, y compris de leurs processus de production et de formulation, en particulier pour l'utilisation éventuelle d'additifs susceptibles d'augmenter la durée de conservation ou l'efficacité des produits. De ce point de vue, la formulation du biostimulant microbien est un facteur clé pour garantir l'efficacité du traitement des cultures. En effet, alors que la formulation de produits basés sur une seule souche ou espèce simplifie le processus de production et d'enregistrement pour la commercialisation, diverses études indiquent l'utilité d'appliquer des consortiums de micro-organismes composés d'espèces capables de "collaborer" entre elles et éventuellement aussi avec le microbiome du sol. À cet égard, les consortiums de champignons et de bactéries mycorhiziens se sont révélés particulièrement efficaces dans diverses cultures, permettant de réduire jusqu'à 50 % l'application d'engrais minéraux.

Parallèlement à la recherche de la meilleure formulation par l'industrie, une contribution cruciale à la réussite du traitement avec un biostimulant microbien ou un pesticide doit être apportée par les agriculteurs eux-mêmes, grâce à l'adoption de pratiques agronomiques qui n'affectent pas négativement l'action du produit lui-même. En fait, la persistance ou l'efficacité des biostimulants et pesticides microbiens est généralement influencée par les pratiques de gestion agricole : des pratiques telles que le travail du sol, la lutte contre les ravageurs par d'autres moyens, la fertilisation minérale et organique ou le régime hydrique peuvent fortement modifier l'efficacité d'un produit microbien. En ce qui concerne la gestion de la fertilisation, étant donné qu'en général 60 à 90 % des engrais minéraux appliqués sont lessivés et que seuls 30 à 50 % des engrais azotés et 10 à 45 % des engrais phosphatés appliqués sont absorbés par les cultures, l'application de biostimulants microbiens peut favoriser un système intégré de gestion de la fertilisation, soutenant la productivité agricole avec un faible impact sur l'environnement. Dans le cas des pesticides microbiens, la dose et les conditions environnementales au moment de l'application du produit sont également des facteurs importants qui influencent leur efficacité.

Tous les aspects mentionnés ci-dessus ont été expliqués en détail, mais avec une approche pratique et facilement compréhensible dans les chapitres de ce livre. Ce livre a été conçu pour favoriser le transfert des connaissances acquises dans le cadre du projet EXCALIBUR, qui a été financé par l'UE dans le cadre du programme de recherche Horizon 2020, et d'autres projets sur ce sujet. Les auteurs espèrent que ce livre favorisera la réduction de l'utilisation d'intrants chimiques grâce à une application raisonnée de produits à base de microbes parmi les agriculteurs et autres professionnels, afin d'éviter tout impact négatif sur la productivité des sols. L’application des préconisations développées ici, permettra d’avoir deseffets positifs sur l'environnement, mais également sur la santé animale et la santé humaine, dont il a été démontré qu'ils sont tous liés.

Prof. Dr. hab. Eligio Malusà et Dr. Krzysztof Ambroziak

Chapitre 1. Champignons mycorhiziens pour l'amélioration de la nutrition des plantes et de la croissance des cultures horticoles

Lidia Sas-Paszt[1], Sławomir Głuszek[1], Beata Sumorok[1], Edyta Derkowska[1], Anna Lisek[1], Louisa Robinson Boyer[2], Maria Grazia Tommasini[3]

[1]Institut national de recherche horticole, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLOGNE
[2]NIAB, East Malling, West Malling, Kent, ME19 6BD, ROYAUME-UNI
[3]RI.NOVA, via dell'Arrigoni 120, 47522 Cesena - FC, ITALIE

L'objectif de ce chapitre est de présenter les champignons mycorhiziens et de promouvoir une meilleure compréhension de ces champignons et de leur potentiel d'amélioration des systèmes de production horticole. Il décrit également comment ou quand il est plus approprié d'utiliser ces micro-organismes bénéfiques, ainsi que les conditions ou pratiques qui peuvent limiter leurs effets bénéfiques.

1. Types de champignons mycorhiziens et leur capacité à coloniser les plantes

Il existe quatre grands types de champignons mycorhiziens. Il s'agit des ectomycorhizes, des mycorhizes à arbuscules, des mycorhizes éricoïdes et des mycorhizes orchidées. Les ectomycorhizes sont associées à de nombreuses espèces d'arbres, elles forment des structures enroulées à l'intérieur des racines et sont souvent spécifiques à un hôte, chacune favorisant une espèce particulière. Les mycorhizes éricoïdes ne sont associées qu'aux plantes éricacées telles que la myrtille et la canneberge, et les mycorhizes orchidées à leurs hôtes orchidées. Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA). Les champignons mycorhiziens sont omniprésents et se trouvent aux quatre coins du monde et dans tous les environnements terrestres.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules sont représentés par environ deux cent cinquante espèces appartenant à la division Glomeromycota divisée en quatre ordres (Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales et Paraglomerales), qui comprennent un total de 11 familles. Les CMA sont considérés comme l'un des facteurs responsables du succès de la colonisation des terres par les plantes primaires, et leur fossile remonte à 450 millions d'années. Ils entrent en symbiose avec près de 80 % des espèces de plantes terrestres trouvées sur Terre, ce qui inclut une grande partie des cultures vivrières mondiales, mais il est important de noter que les CMA ne s'associent pas avec les *Brassicacea*.

Les champignons mycorrrhiziens sont considérés comme des organismes asexués. Ils se reproduisent en formant de grandes spores à l'extrémité des hyphes qui se répandent dans le sol. En présence d'une plante vivante, les spores peuvent germer. Le mycélium colonise les racines des plantes et leur transfère de l'eau et des nutriments en échange de carbone. Comme le champignon et la plante en tirent tous deux des avantages, il s'agit d'une symbiose mutualiste (Smith et Read 2008).

Lorsque les hyphes des CMA entrent en contact avec la racine d'une plante, ils forment des appressoria à sa surface, où les champignons libèrent des signaux chimiques à la plante pour lui permettre de pénétrer dans le cortex. Une fois à l'intérieur de la racine, le mycélium forme généralement des spirales intracellulaires, puis se propage en se développant à l'intérieur des cellules du cortex primaire. À l'intérieur des cellules corticales de la plante, les branches du mycélium forment des structures appelées arbuscules (Fig. 1.1). C'est par ces arbuscules que s'effectue le transfert d'eau et de nutriments entre la plante et le champignon, d'où

le nom de ce type de mycorhize. Dans la racine, certaines espèces peuvent également former des vésicules qui remplissent des fonctions de stockage, et les substances organiques qu'elles contiennent sont utilisées par les champignons pendant les périodes de faible activité métabolique des plantes hôtes.

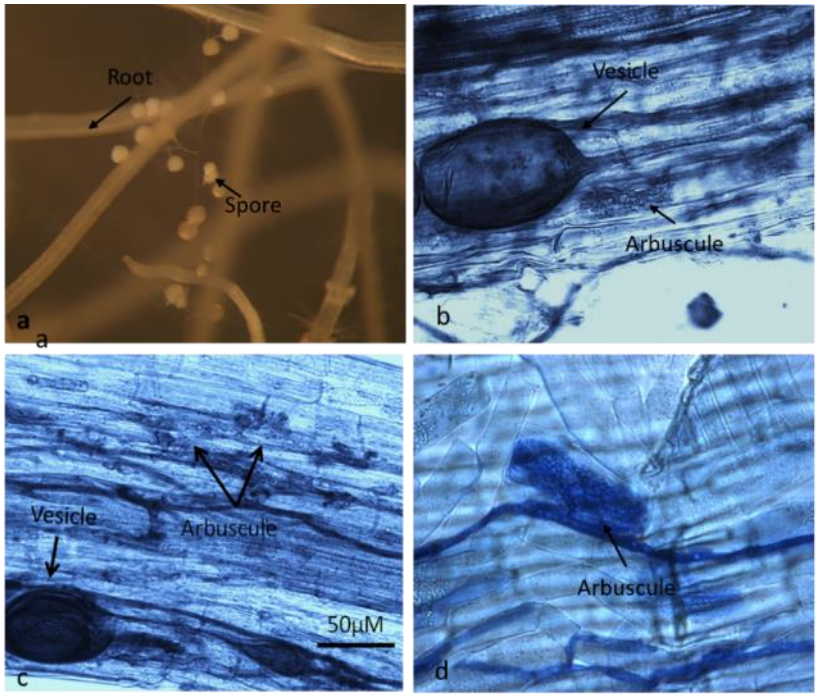

Fig. 1.1. Photo de l'CMA. Culture d'organes racinaires montrant des hyphes et des spores de racines (a), racines de fraises colorées au bleu trypan montrant des cellules racinaires, des hyphes, des vésicules et des arbuscules (b, c et d).
Auteur : Louisa Robinson Boyer

En raison de la nécessité de réduire les intrants chimiques dans l'agriculture pour des raisons de restriction de leur utilisation et d'augmentation de leurs coûts, les agriculteurs recherchent des solutions alternatives durables pour maintenir les rendements des cultures. Les CMA ont un grand potentiel d'utilisation dans de nombreuses espèces de plantes cultivées qui jouent un rôle important dans l'agriculture, y compris de nombreuses espèces d'arbres fruitiers, de vignes, d'arbustes, de fraises, de cultures maraîchères, de salades et de plantes ornementales. Récemment, l'utilisation des CMA dans les systèmes commerciaux a suscité un grand intérêt, grâce à la disponibilité de ces inocula commerciaux et aux bonnes pratiques connues en matière d'intervention dans les systèmes de culture pour augmenter les populations indigènes de microbes du sol.

Certaines espèces de plantes fruitières de la famille des Ericacées, par exemple la myrtille en corymbe, la myrtille moyenne, la myrtille, l'airelle, la canneberge, forment des mycorhizes éricoïdes, qui sont très différentes des CMA et dans lesquelles les hyphes du champignon mycorhizien pénètrent à la fois les espaces intercellulaires et l'intérieur des cellules des racines, créant des structures en forme de serpentins. Un inoculum commercial d'Ericoid Mycorrhiza est également disponible.

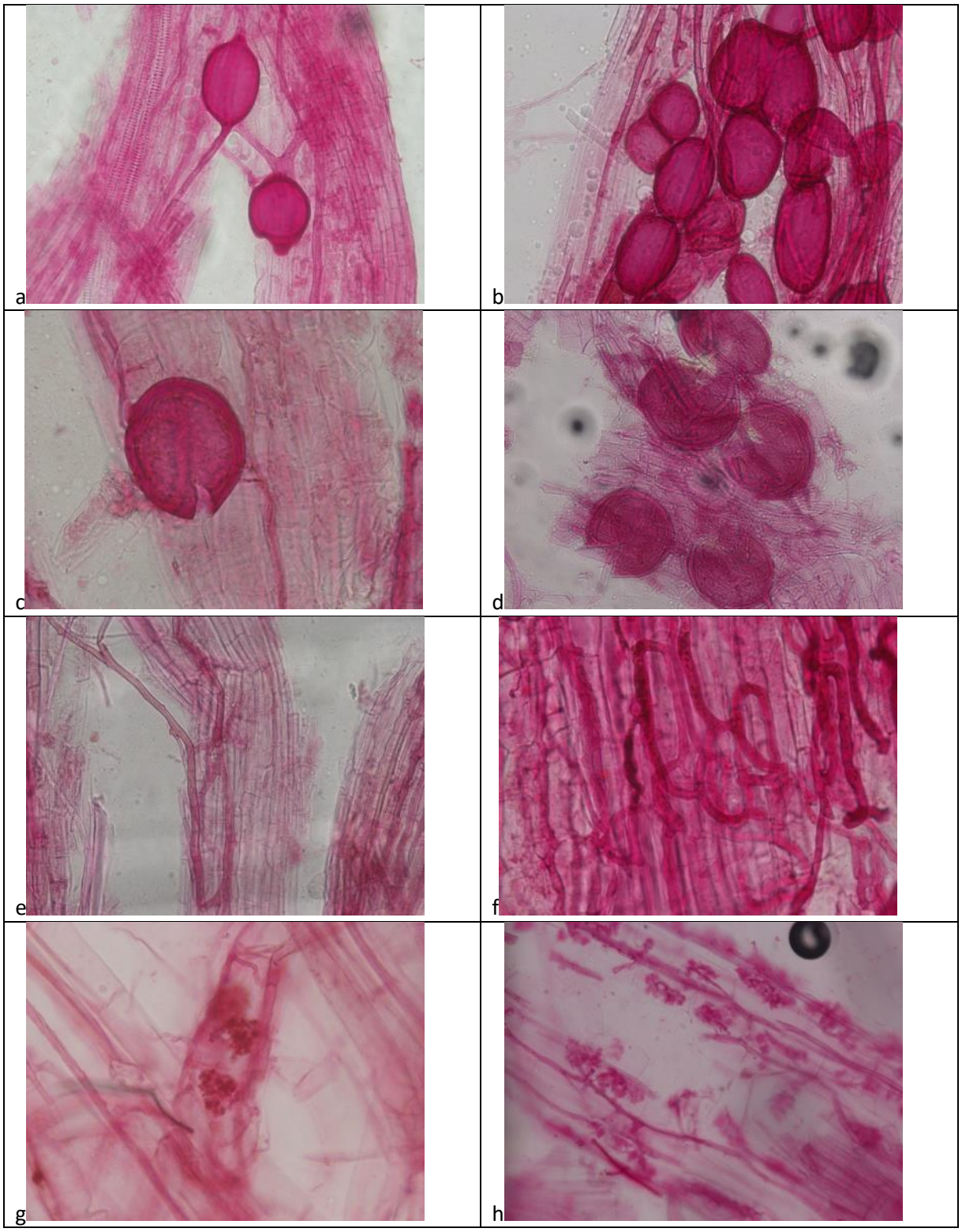

Fig. 1.2. Structures des champignons mycorhiziens dans les racines. (a) Vésicules dans la racine d'un fraisier témoin, (b) Vésicules dans la racine d'un fraisier après inoculation avec des micro-organismes bénéfiques, (c) Spore dans la racine d'un fraisier témoin, (d) Spores dans la racine d'un fraisier après inoculation avec des micro-organismes bénéfiques, (e) Mycélium d'un champignon mycorhizien à arbuscules dans la racine d'un fraisier témoin, (f) Mycélium d'un champignon mycorhizien à arbuscules dans la racine d'un fraisier après inoculation avec des micro-organismes bénéfiques, (g) Arbuscule dans la racine d'un fraisier témoin, (h) Arbuscules dans la racine d'un fraisier après inoculation avec des micro-organismes bénéfiques.
Source : Département de microbiologie et de rhizosphère, Institut national de recherche horticole (Inhort, PL)

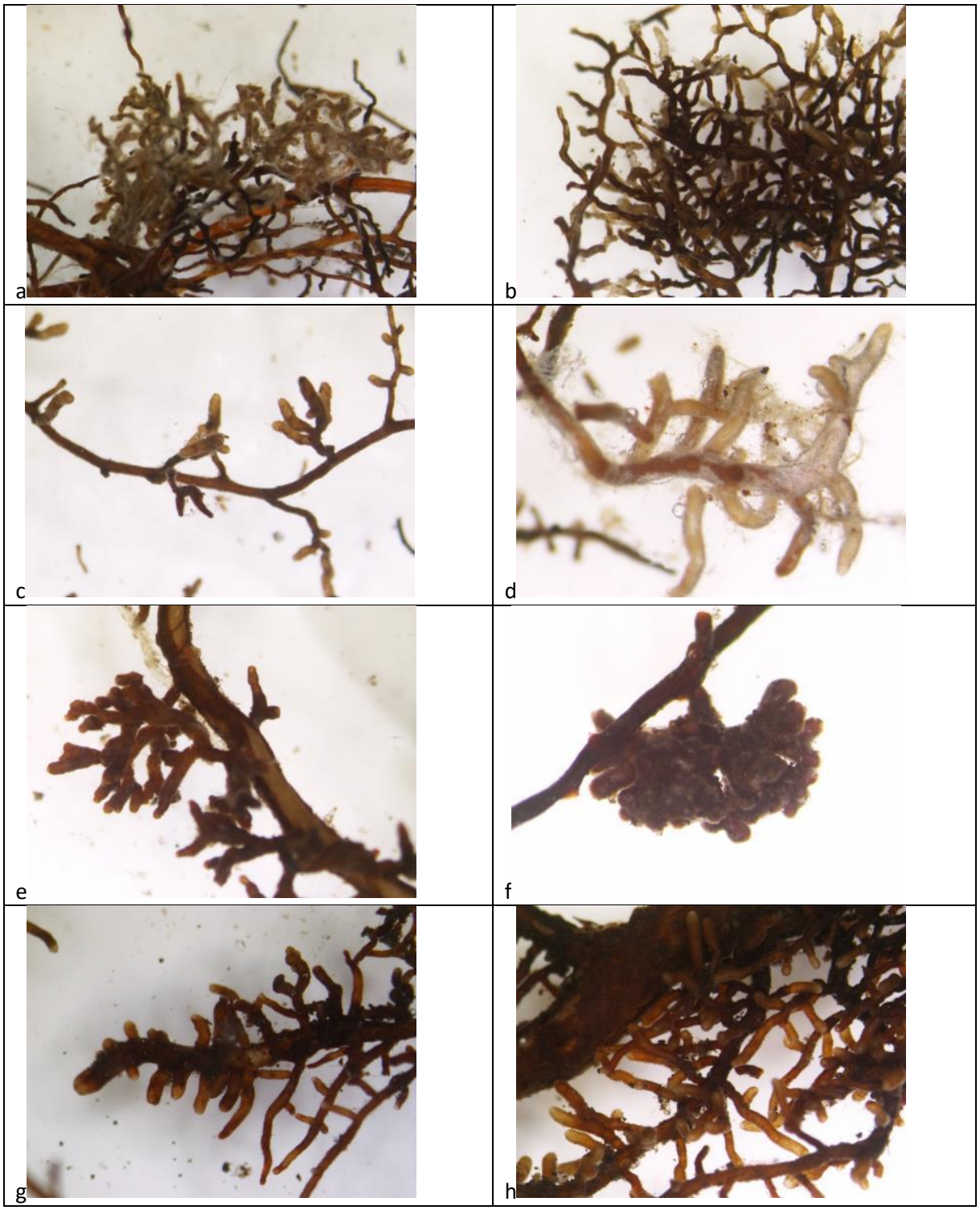

Fig. 1.3. Champignons ectomycorhiziens dans les racines des plantes forestières. (a) Ectomycorhize sur les racines du hêtre européen poussant dans la pépinière forestière de Podanin, (b) Ectomycorhize sur les racines du bouleau argenté poussant dans une pépinière forestière à Radom, (c) Ectomycorhize sur les racines du charme européen poussant dans la pépinière forestière de Białogard, (d) Ectomycorhize sur les racines d'un chêne anglais poussant dans la pépinière forestière de Białogard, (e) Ectomycorhize sur les racines de pin sylvestre poussant dans la pépinière forestière de Gościniec, (f) Ectomycorhize sur les racines de pin sylvestre poussant dans la pépinière forestière de Gościniec, (g) Ectomycorhize sur les racines d'épicéa de Norvège poussant dans la pépinière forestière de Białogard, (h) Ectomycorhize sur les racines d'épicéa de Norvège poussant dans la pépinière forestière de Wałcz.
Source : Département de microbiologie et de rhizosphère, Institut national de recherche horticole (Inhort, PL)

2. Effet des CMA sur la croissance, le rendement et la tolérance aux stress des plantes

Des recherches sur l'application pratique des produits mycorhiziens sont menées depuis de nombreuses années dans plusieurs centres de recherche à travers le monde. Un certain nombre d'études ont montré les effets positifs de l'inoculation de CMA sur la croissance d'une série de cultures horticoles et de plantes modèles. Les CMA ont pour effet de modifier la croissance, la morphologie et le nombre de racines, ce qui rend le système racinaire de la plante plus efficace pour absorber l'eau et les composés minéraux du sol. Dans de nombreux cas, les racines des plantes colonisées par les champignons mycorhiziens à arbuscules sont mieux formées et ont plus de racines latérales.

La symbiose mutualiste avec les CMA apporte aux plantes de nombreux avantages, dont le plus important, pour les agriculteurs et les cultivateurs, est l'augmentation de l'absorption d'eau et de nutriments et une résistance plutôt accrue à divers stress environnementaux, à la fois biotiques, tels que les attaques de ravageurs et de pathogènes, et abiotiques, tels que la sécheresse, l'engorgement et le stress thermique. En particulier, en améliorant la prise en charge de l'eau et de la nutrition, les CMA sont bien connus pour leur effet bénéfique sur la croissance des plantes et souvent sur le rendement. La mycorhization augmente également la surface foliaire et l'activité photosynthétique de la plante, ce qui facilite la croissance.

Les CMA sont particulièrement importants pour l'absorption du phosphore, de l'azote, du potassium, du magnésium et des micro-éléments, ce qui améliore la santé des plantes, en particulier dans des conditions défavorables. Une carence en phosphate limite considérablement la croissance des plantes, d'autant plus que les ions de phosphate ne sont pas très mobiles dans le sol. Ils forment un certain nombre de complexes insolubles qui ralentissent leur diffusion. Le mycélium externe des CMA pénètre dans le sol beaucoup plus profondément que les racines seules, formant un réseau hyphalique qui facilite l'absorption de l'eau et des composés minéraux du sol par les plantes et la libération des composés organiques des racines dans le sol. Le réseau hyphalique s'étend bien au-delà de la zone d'absorption des nutriments par les racines, fournissant une plus grande surface d'absorption, les brins hyphaliques fins peuvent pénétrer dans des particules plus petites, extrayant des nutriments autrement inaccessibles, d'autres composés plus petits et de l'eau à partir de poches dans le sol. (Helgason et Fitter 2005). Marschner et Dell (1994) ont montré que jusqu'à 80 % du phosphore contenu dans les plantes peut être fourni par des champignons de la division Glomeromycota. Il a été démontré qu'une utilisation efficace du phosphore, même dans des conditions de carence du sol, est facilitée par les CMA qui sécrètent des enzymes dans le sol qui dissolvent les formes de phosphore qui ne sont pas disponibles pour les plantes. Le phosphore dans les filaments est transloqué avec le mouvement du cytoplasme et se présente sous une forme insoluble dans l'eau (polyphosphates), de sorte que de faibles concentrations de phosphore métaboliquement actif permettent son absorption continue à partir de la solution du sol. Il a été démontré que sur les sols pauvres en phosphore, la mycorhize des pommiers augmente l'efficacité de l'absorption du phosphore, tandis que sur les sols riches en phosphore, la mycorhize facilite l'absorption des ions de zinc et de cuivre. Néanmoins, plusieurs études montrent une réduction du niveau d'association et de dépendance des CMA dans les situations où le phosphore est abondant. Des niveaux très élevés de phosphore ont souvent un effet négatif sur la mise en place de la symbiose entre les plantes et les CMA.

D'autres éléments mineurs et minéraux essentiels sont également transportés vers la plante par les CMA, tels que le potassium, le zinc, le calcium, le magnésium et le cuivre. Il a été démontré que les pruniers et les

cerisiers inoculés avec une espèce de CMA, *Glomus intraradices*, avaient un effet bénéfique sur l'augmentation de la teneur en micronutriments des tissus végétaux et sur la croissance des plantes poussant sur des sols à faible teneur en phosphore. En outre, l'amélioration de la croissance des vignes de différentes variétés résultant de la mycorhization est étroitement liée à l'absorption des minéraux suivants du sol : phosphore, azote, fer, cuivre et zinc.

Il est désormais bien connu que les CMA jouent également un rôle important dans le transfert d'azote aux plantes, en facilitant l'absorption à partir du sol et l'assimilation de l'azote. Les chercheurs ont observé dans les arbuscules des transporteurs d'azote et d'autres éléments, ainsi que des aquaporines pour l'eau. Certaines espèces d'CMA transportent également des acides aminés (glycine et glutamine) du sol vers les racines. Voir l'image ci-dessous pour l'échange de nutriments.

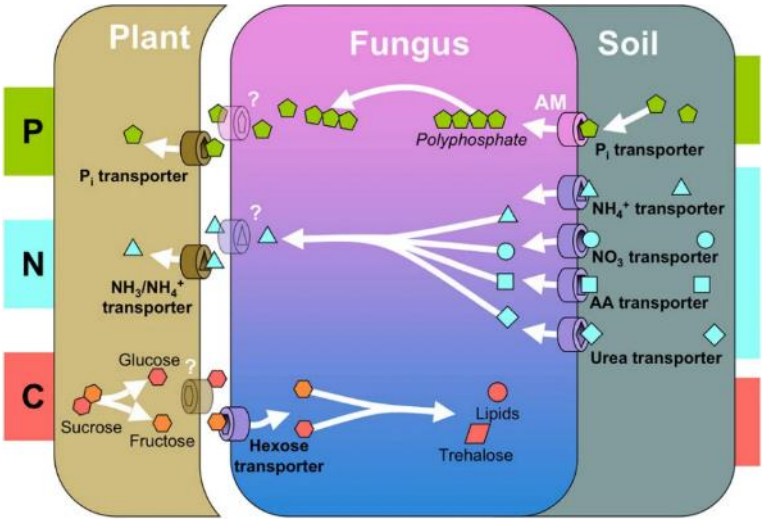

Fig. 1.4. Les principaux échanges de nutriments dans les CMA d'après Bonfante et Genre (2010)

En général, les micro-organismes bénéfiques influencent directement la croissance des plantes en synthétisant des régulateurs de croissance, des acides organiques, des sidérophores, en formant des biofilms et en exerçant une action antagoniste contre les pathogènes du sol et des plantes. Les résultats obtenus indiquent un potentiel élevé à cet égard pour les bactéries et les champignons bénéfiques de la rhizosphère, ce qui se traduit par une augmentation du rendement et une amélioration de la qualité du rendement, par rapport à celui des plantes fertilisées avec des engrais minéraux standard.

Avec le changement climatique mondial et l'augmentation des événements météorologiques extrêmes, il est crucial de trouver des mécanismes pour augmenter la résilience des plantes cultivées à ces stress. Il existe de nombreuses preuves que les CMA jouent un rôle important dans la régulation de l'eau dans les plantes et qu'ils augmentent, par exemple, la tolérance des plantes à la sécheresse. Il a été constaté que les racines des plantes poussant dans des environnements arides sont intensément colonisées par les mycorhizes et que la colonisation par les CMA des plantes cultivées poussant dans ces zones peut effectivement augmenter la taille et la qualité des rendements des plantes (Al-Karaki et al. 2004) et la résilience aux épisodes de sécheresse. De même, il est de plus en plus évident que les CMA peuvent aider les plantes à tolérer l'engorgement (dû à l'augmentation des précipitations et au stress thermique).

Il a été démontré que la dynamique des CMA change à l'intérieur des racines en fonction des effets du stress et de la saison. Par exemple, le degré de colonisation des racines de vignes (Pinot Noir) poussant dans un vignoble de 20 ans a varié sur deux ans de 20 % pendant le débourrement à 50 % fin juin/début juillet. En revanche, fin octobre/début novembre, pendant une période de très fortes pluies, le degré de colonisation par les CMA a diminué jusqu'à devenir presque nul. Un autre effet observé est que l'inoculation des racines des vignes avec des champignons mycorhiziens *Glomus iranicum* réduit les effets du stress hydrique, améliore le taux de photosynthèse et le rendement des raisins, accélérant également la maturation des raisins de table.

Les expériences de Martins et al. (1997) ont montré les effets positifs de la mycorhization du châtaignier (*Castanea sativa*) sur la croissance végétative et l'activité photosynthétique des plantes. Les champignons mycorhiziens à arbuscules peuvent également augmenter le rendement des plantes non halophiles poussant sur des sols salins. Un autre effet des CMA est la production de glomaline, qui agrège les particules du sol, ce qui a un effet stabilisateur sur le sol et aide à prévenir l'érosion et le lessivage du sol. Les CMA soutiennent les processus de formation du sol et contribuent à la diversité de la couverture végétale, en particulier sur les sols érodés et fortement contaminés.

Les champignons mycorhiziens jouent un rôle important dans la résilience aux stress biotiques tels que la tolérance aux ravageurs et aux pathogènes chez les plantes par le biais d'un certain nombre de mécanismes. La colonisation des racines par les champignons mycorhiziens peut stimuler les mécanismes de défense naturelle de la plante en provoquant des facteurs de résistance systémique induite, ce qui peut réduire l'effet des ravageurs et des pathogènes. En outre, l'amélioration de la santé et de la vigueur des plantes grâce à une meilleure nutrition et à une meilleure alimentation en eau les rend moins sensibles aux attaques. De plus, les champignons MA peuvent entrer en compétition avec les pathogènes pour les ressources, telles que l'espace et les nutriments, réduisant ainsi la colonisation et la prolifération des pathogènes dans la zone racinaire de la plante. Par exemple, les champignons MA de certaines variétés de vigne activent les mécanismes de défense contre les nématodes parasites et augmentent leur tolérance à la sécheresse.

Cependant, cette interaction symbiotique a un coût pour la plante qui héberge ses partenaires CMA. Le carbone est transféré de la plante au champignon, ce qui peut entraîner une réduction de la croissance des très jeunes plantes, au début de l'établissement et dans les cas où les plantes ne reçoivent pas tous leurs besoins nutritionnels. En général, le rapport coût-bénéfice augmente au fur et à mesure que la plante grandit ou qu'elle est confrontée à un stress.

Dans certains cas, les mycorhizes augmentent également l'efficacité de l'absorption et de l'accumulation des ions de métaux lourds (cuivre, zinc, cadmium, plomb ou cobalt), ainsi que des ions de chlorure et de sulfate. Les champignons mycorhiziens augmentent également la résistance des plantes aux effets nocifs de l'excès de métaux lourds et de contaminants du sol, comme les composés aromatiques**.** Néanmoins, la mycorhization des plantes contribue à une épuration significative des polluants organiques présents dans le sol et c'est pour cette raison que ces CMA sont utilisés dans la phytoremédiation des zones contaminées.

3. Formulations et lignes directrices pour l'application à différents systèmes de culture horticole

Ces dernières années ont vu une augmentation de la demande et de la production de produits d'inoculum mycorhizien pour les secteurs de l'agriculture et de l'horticulture, de nombreux cultivateurs voyant le potentiel d'une utilisation dans le cadre d'une culture durable. Les formulations se présentent sous diverses formes : granulés secs et poudres, liquides, enrobages de semences et vinaigrettes. La plupart des formulations contiennent soit un mélange d'espèces de CMA, soit des espèces individuelles sélectionnées en fonction de l'utilisation. La production d'inocula mycorhiziens peut s'avérer difficile car ils ne peuvent être cultivés qu'en présence de plantes hôtes (c'est-à-dire de symbiotes obligatoires).

Les produits à base de champignons mycorhiziens sont réglementés dans l'UE dans le cadre de l'annexe II du règlement sur les engrais et les biostimulants végétaux (https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R1768). Ils sont classés comme des produits fertilisants car ils sont destinés à améliorer la nutrition des plantes et la fertilité des sols. Les produits à base de champignons mycorhiziens ne sont pas soumis à la même réglementation que les agents de biocontrôle, car ils ne sont pas classés comme ayant des propriétés phytopharmaceutiques. Les législations nationales varient d'un pays à l'autre de l'UE, de sorte qu'il convient de suivre les orientations et politiques locales pour l'enregistrement des produits à base de champignons mycorhiziens. Par conséquent, les fabricants de ces produits doivent les enregistrer dans chaque pays de l'UE où ils ont l'intention de les vendre.

De nombreux produits contiennent des espèces de CMA que l'on trouve couramment dans de nombreux environnements agricoles et horticoles, en particulier des espèces de *Rhizophagus* et de *Funneliformis* (anciennement connu sous le nom de *Glomus*). À mesure que la technologie de production augmente, le nombre d'espèces de CMA incluses dans les produits et de produits adaptés à différents environnements augmentent également. Même si les CMA sont considérés comme non spécifiques dans leur potentiel de colonisation de différentes espèces, il est important de classer les diverses espèces de CMA en fonction de leurs préférences en matière d'hôte et d'environnement. Cela permet d'identifier les meilleures stratégies pour la formulation et la production d'inoculum et les méthodes d'application adaptées aux différentes conditions (par exemple, en plein champ, en serre, au stade de la transplantation, au stade de la propagation *in vitro*, à l'écologisation urbaine, etc.) Par conséquent, une technologie appropriée pour la production d'inocula et de milieux de formulation est essentielle pour une application efficace.

Bien que l'inoculation de plantes avec des champignons mycorhiziens soit une pratique bien connue, leur utilisation plus large est encore entravée dans certains cas par la formulation d'inocula capables de garantir un effet fiable et cohérent dans des conditions de terrain. Cependant, il est essentiel de sensibiliser la communauté des cultivateurs à l'utilisation de ces produits et à la manière dont leur application diffère des approches chimiques standards. En particulier, les produits individuels varient dans leurs taux d'application et leurs instructions d'application. Par conséquent, il convient de suivre les directives des fabricants pour l'utilisation de ces produits.

En général, lors de l'application des CMA dans les environnements de culture, un certain nombre de facteurs clés doivent être pris en compte :

- Application - Tout inoculum de CMA doit être appliqué directement sur les racines des plantes : soit par trempage des racines, soit lors du repiquage dans un trou à proximité de la jeune plante, soit sous/à côté de la graine au moment de la germination. Il est préférable d'inoculer les plantes pendant les premiers stades de leur développement.
- Environnement - L'environnement peut affecter le CMA et certaines formulations peuvent être mieux adaptées à des conditions environnementales spécifiques. En particulier, le type de culture, les conditions du sol et les méthodes de plantation peuvent jouer un rôle important dans l'effet de l'application du CMA et de sa formulation. Par exemple, il faut savoir qu'une application élevée de produits chimiques peut compromettre l'efficacité du CMA (c'est-à-dire que des niveaux très élevés de nutriments, en particulier de P, pourraient inhiber l'association du CMA avec les racines). Des conditions environnementales extrêmes telles qu'une chaleur excessive, un faible pH, une forte teneur en eau peuvent suggérer de choisir des espèces spécifiques de CMA qui s'adaptent mieux à ces conditions. Il convient de veiller à ce que le pH du sol soit correct, car un pH inférieur à 5,5 limite la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens à arbuscules.
- Traitement post-plantation - L'effet du traitement post-plantation peut avoir un effet sur la réussite de l'association des CMA. Une application très importante de fongicides peu après la plantation pourrait fortement réduire les chances de colonisation. De nombreux fongicides et herbicides sont compatibles avec les CMA, mais une sélection minutieuse et un calendrier d'application approprié peuvent s'avérer nécessaires. Les CMA ont besoin d'une plante hôte vivante pour survivre, les processus qui laissent le sol dépourvu de plantes vivantes, comme le travail du sol, l'arrachage des vergers, le désherbage ou les périodes de jachère, épuisent rapidement la viabilité des CMA dans le sol.
- Considérations relatives aux coûts et aux avantages - Le coût de l'application de l'inoculum pour l'agriculteur doit être considéré comme raisonnable et économiquement viable. L'évaluation des avantages pour les cultures à cycle court (par exemple, les herbes et les salades) par rapport aux cultures pérennes (arbres fruitiers et forêts) doit être analysée en même temps que les avantages pour les cultures, en particulier pour celles qui sont très exigeantes en éléments nutritifs. Certains systèmes de culture peuvent être mieux adaptés à l'application des CMA que d'autres.
- Interactions avec d'autres organismes - L'interaction entre les CMA et d'autres microbes bénéfiques semble accroître leurs potentialités. Par exemple, dans de nombreuses études, des communautés adaptées comprenant différentes espèces d'CMA et d'autres champignons bénéfiques tels que Trichoderma et des bactéries bénéfiques présentent des avantages accrus et des niveaux plus élevés de colonisation de l'CMA.

4. Gestion des cultures pour mieux exploiter l'activité des CMA en proposant des pratiques de gestion augmentant l'efficacité des CMA dans la croissance et le rendement des cultures

De nombreux aspects des pratiques de gestion agricole conventionnelles affectent la diversité et l'abondance des CMA. Le recours accru à la monoculture, qui réduit la biodiversité en surface, réduit la microbiologie souterraine du sol, y compris les CMA. Les niveaux élevés de produits chimiques utilisés dans l'agriculture, les taux d'engrais (avec des niveaux excessifs de phosphate) nécessaires pour soutenir les rendements des cultures modernes, ainsi que les applications de pesticides et de fongicides, réduisent tous les populations

de ces microbes importants. Les cultures ont été fortement domestiquées au cours de nombreuses décennies et la plupart des programmes de sélection ne tiennent pas compte de la manière dont les nouveaux génotypes interagissent avec les microbes du sol, et de nombreuses nouvelles variétés ont un besoin réduit d'absorption des CMA. Les sols des exploitations agricoles à forte utilisation d'intrants sont susceptibles d'offrir des conditions moins favorables à l'hébergement des microbes, avec de faibles niveaux de matière organique et une structure du sol réduite. De nombreuses cultures sont aujourd'hui cultivées dans des substrats sans sol, tels que le coir (fibre de coco). Ces substrats sont dépourvus de microbes et, à ce titre, les préparations disponibles dans le commerce peuvent être essentielles. Toutes ces pratiques modernes diminuent la biologie des sols agricoles et horticoles.

Si l'on veut mieux utiliser les micro-organismes bénéfiques et les CMA dans l'horticulture commerciale, il faut examiner les pratiques qui encouragent le développement des CMA. Si des préparations commerciales sont appliquées à des systèmes commerciaux, nous devons réfléchir à la meilleure façon d'assurer leur survie et leur longévité dans les cultures commerciales. De nombreux agriculteurs réfléchissent également aux moyens de raviver ou d'encourager les populations indigènes de CMA en adoptant des méthodes et des interventions durables.

De nombreuses études ont été menées pour examiner les effets des techniques de gestion des cultures dans différentes conditions de sol et de climat. Bien que l'environnement, le type de sol et le lieu ajoutent de la variabilité aux données recueillies dans ces études, des modèles universels se dégagent :

- Perturbation du sol - Le travail du sol et la perturbation du sol (y compris l'arrachage dans les vergers) ont un effet important sur les populations de champignons CMA dans le sol. Une perturbation excessive brise les réseaux d'hyphes établis dans les sols, ce qui réduit les effets bénéfiques des CMA. Le travail mécanique du sol affecte les communautés de CMA et entraîne une diminution du nombre de spores, de la colonisation des racines, de la diversité taxonomique des CMA et du mycélium extra-radical par rapport à un sol non perturbé. Oehl et al [2003] ont constaté que le travail intensif du sol réduisait la diversité des champignons mycorhiziens. Ces travaux ont été menés sur des terres arables et des prairies, mais les résultats peuvent également s'appliquer aux cultures intensives de vergers. Afin de maintenir et d'encourager les populations de champignons mycorhiziens dans les sols, les cultivateurs devraient réduire autant que possible les perturbations de leurs sols.
- Application chimique - Bien que de nombreux fongicides soient compatibles avec les CMA, il faut veiller à réduire leur application et demander conseil aux producteurs d'inoculum pour s'assurer que les produits chimiques utilisés sont corrects. Le moment choisi pour l'application des fongicides est également important, et il n'est pas recommandé de procéder à un arrosage excessif au début de l'établissement de la symbiose. La compatibilité du glyphosate avec les CMA a fait l'objet d'un débat au cours des dernières années et on ne sait toujours pas exactement comment les populations de CMA sont affectées par ce produit chimique.
- Application d'engrais - Des apports très importants d'engrais annulent clairement la nécessité pour les plantes de consacrer leurs ressources à la formation d'associations avec les CMA. Pour assurer une production suffisante, les cultivateurs doivent appliquer des engrais aux cultures, mais ces apports doivent être réduits si l'on veut encourager les CMA dans le système, ce qui permet au cultivateur d'économiser de l'argent sur des produits chimiques coûteux et d'œuvrer en faveur de la durabilité. Des niveaux très élevés de phosphore facilement disponible auront les effets les plus

néfastes. Il est également important de maintenir des niveaux adéquats de matière organique dans le sol afin de fournir aux CMA des ressources qu'ils peuvent explorer pour se nourrir et d'améliorer la structure et le drainage du sol.

- Diversité des cultures - La biodiversité en surface est importante pour encourager la diversité des espèces deCMA. Dans les exploitations commerciales, on peut y parvenir en augmentant la diversité des plantes non cultivées, telles que les bandes de fleurs sauvages, les cultures de couverture, les plantations intercalaires et les rotations. En raison de la nature symbiotique obligatoire des CMA, le fait d'avoir un sol nu pendant de longues périodes sans racines vivantes réduit considérablement leurs populations.

La mise en œuvre de ces stratégies de gestion dans les exploitations commerciales peut garantir la création d'environnements propices aux CMA. En comprenant que différentes stratégies doivent être envisagées lorsque la biologie (plutôt que la chimie traditionnelle) est appliquée aux systèmes commerciaux, l'utilisation des CMA pourrait être un facteur clé dans la réalisation d'une culture durable. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour concevoir des essais simples et fiables sur le terrain dans les cultures horticoles commerciales afin de quantifier l'impact des communautés des CMA sur la croissance des cultures, les rendements et la durabilité de l'agroécosystème.

Les études montrent une différence entre la composition des communautés des CMA au niveau du genre entre les systèmes d'agriculture biologique et conventionnelle, les pratiques d'agriculture biologique augmentant la richesse des familles de CMA dans les sols, mais les genres les plus abondants sont souvent observés dans les deux systèmes. Les pratiques agricoles, telles que l'agriculture biologique, peuvent avoir un effet positif ou neutre sur les communautés de CMA dans le sol (Manoharan et al. 2017), les pratiques agricoles biologiques peuvent augmenter la richesse de la famille des CMA Gigasporaceae dans les sols. Le principal facteur, cependant, dans le système agricole conventionnel qui cause le déclin de la richesse en CMA est lié aux fortes concentrations de C et de N dans le sol (Wadhan et al. 2021). En outre, les facteurs pédologiques tels que la teneur en N, P, K, ainsi que les rapports C/P et N/P façonnent la communauté totale d'CMA.

Certaines études montrent que les communautés de CMA dans les sols agricoles réagissent aux systèmes agricoles à long terme et résistent aux sécheresses estivales de courte durée. On ne sait pas si la capacité des communautés de CMA à tolérer la sécheresse dépend des propriétés du sol, de la diversité et de la composition des communautés de CMA ou des communautés végétales associées. Il est clair qu'étant donné l'augmentation des températures mondiales et la fréquence des événements météorologiques extrêmes, y compris la chaleur et les précipitations, nous devons comprendre comment cela affecte les populations de CMA et comment nous pouvons mieux utiliser ces champignons pour augmenter la résilience des principales cultures horticoles pour faire face à ces défis.

L'absence de bonnes pratiques d'inoculation et d'études à grande échelle avec une analyse coût-bénéfice de l'application des CMA reste un obstacle majeur à l'introduction stable des CMA dans les protocoles de culture.

Références

Al-Karaki G., McMichael B., Zak J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. Mycorrhiza, 14, 263-269.

Bonfante P., Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nature communications, 1(1), 48.

Helgason T., Fitter A. 2005. The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologist, 19(3), 96–101.

Manoharan L., Rosenstock N. P., Williams A., Hedlund K. 2017. Agricultural management practices influence AMF diversity and community composition with cascading effects on plant productivity. Applied Soil Ecology, 115, 53-59.

Marschner H., Dell B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant and Soil, 159, 89–102.

Martins A., Casimiro A., Pais M.S. 1997. Influence of mycorrhization on physiological parameters of micropropagated *Castanea sativa* Mill. plants. Mycorrhiza, 7, 161-165.

Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mäder P., Boller T., Wiemken A., 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. Applied Environmental Microbiology 69, 2816–2824.

Smith S. E., Read D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press, San Diego.

Wadhan S.F.M., Reitz T., Heintz-Buschart A., Schädler M., Roscher R., Breitkreuz C., Schnabel B., Purahong W., Buscot F. 2021. Organic agricultural practice enhances arbuscular mycorrhizal symbiosis in correspondence to soil warming and altered precipitation patterns. Environmental Microbiology, 23(10), 6163–6176.

Chapitre 2. Produits microbiens pour le biocontrôle des cultures horticoles

Magdalena Ptaszek[1], Małgorzata Tartanus[1], Massimo Pugliese[2]

[1]Institut national de recherche horticole, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLOGNE
[2]Université de Turin - Agroinnova, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO), ITALIE

La protection des plantes est l'un des principaux défis de l'horticulture moderne. C'est pourquoi de nouvelles approches sont développées, notamment l'utilisation de micro-organismes en tant que biopesticides durables et efficaces. L'objectif de ce chapitre est de démontrer les possibilités d'utilisation des micro-organismes bénéfiques dans la protection des plantes contre les pathogènes et les ravageurs transmis par le feuillage et le sol. En outre, la multifonctionnalité des micro-organismes dans la production végétale est présentée, ainsi que les avantages et les inconvénients de leur utilisation. Une grande attention a été accordée aux conditions qui doivent être remplies lors de l'application de produits microbiens et aux facteurs affectant l'obtention d'une grande efficacité, ainsi qu'aux aspects pratiques de l'utilisation de biopesticides contenant divers micro-organismes. Enfin, la question des réglementations légales pour la commercialisation des bioproduits a également été abordée.

1. Utilisation des micro-organismes pour le biocontrôle

Les micro-organismes et leurs communautés (microbiome) jouent un rôle fondamental dans la biodiversité et le fonctionnement de tous les autres organismes vivants, stimulant l'évolution et l'adaptation écologique depuis le début de la vie sur Terre. La relation hôte-microbiome, quel que soit l'organisme - végétal, animal ou humain - influe sur la capacité de l'hôte à faire face aux stress abiotiques et biotiques et a des implications biologiques (par exemple dans la physiologie ou le métabolisme) et écologiques (par exemple dans les interactions plante-parasite) pertinentes pour les activités économiques et sociales de l'homme. Il est donc de plus en plus évident qu'une bonne gestion du microbiome dans les systèmes agricoles peut favoriser une production durable dans le respect de l'environnement. Les produits à base de micro-organismes ou dérivés de ceux-ci peuvent donc constituer un outil efficace pour gérer le microbiome du sol et/ou des plantes.

L'histoire de l'utilisation des micro-organismes bénéfiques en agriculture a commencé au 19th siècle. Depuis lors, de nombreuses études importantes ont été menées sur l'isolement de souches bactériennes et fongiques individuelles, leur caractérisation et leur utilisation potentielle en tant que biopesticides ou biofertilisants. Les biopesticides sont définis comme des produits phytopharmaceutiques contenant des groupes de micro-organismes tels que des virus, des bactéries et des champignons, ainsi que des nématodes. La liste des "substances actives microbiologiques" actuellement autorisées par l'Union européenne est disponible sur : https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en. Compte tenu des dispositions de la stratégie de l'Union européenne en matière de biodiversité visant à réduire de 50 % l'utilisation des produits phytopharmaceutiques chimiques d'ici à 2023, les biopesticides sont appelés à jouer un rôle clé dans les pratiques agricoles à l'échelle mondiale. C'est pourquoi l'utilisation de produits microbiens devient une alternative viable aux produits phytopharmaceutiques chimiques, comme le confirme le nombre croissant de produits à base de microbes apparaissant sur le marché dans le contexte de la lutte intégrée contre les maladies et les ravageurs. Il convient également de mentionner que de nombreux produits contenant des inoculants microbiens et montrant une activité de lutte contre les pathogènes et les

ravageurs ne sont pas enregistrés en tant que produits phytopharmaceutiques, mais en tant que préparations microbiennes qui stimulent l'activité microbienne dans les sols ou ont un effet bénéfique sur la croissance et le rendement des plantes. En effet, dans l'Union européenne, le processus d'enregistrement, les exigences et les coûts des pesticides microbiens sont similaires à ceux des pesticides chimiques (règlement CE 1107/2009).

Cependant, le paradigme chimique, dans lequel un produit est utilisé pour éliminer efficacement, facilement et rapidement les nuisibles, persiste encore, et l'utilisation des biopesticides est trop souvent considérée comme un simple substitut aux pesticides chimiques. Une telle approche n'est certainement pas appropriée, car elle ne tient pas compte des différents facteurs qui influencent l'efficacité de la lutte avec les biopesticides dits "à base de matière vivante". Une autre approche complémentaire à l'utilisation des biopesticides, peut-être meilleure, consiste à manipuler l'environnement des cultures afin d'augmenter la population du microbiome indigène pour assurer une certaine protection contre les ravageurs ou les maladies (biocontrôle conservateur). En ce qui concerne la lutte contre les ravageurs (insectes et autres arthropodes), les champignons entomopathogènes constituent le groupe de biopesticides qui a fourni les solutions les plus utiles. Une étude mondiale récente a montré que 129 produits mycoinsecticides sont disponibles (de Faria et Wraight 2007). Les espèces principalement utilisées à cette fin appartiennent aux ascomycètes et comprennent *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartti*, *Metarhizium anisopliae* et *Isaria fumosorosea*. Ces espèces sont souvent généralistes, c'est-à-dire qu'elles parasitent une variété d'espèces d'insectes nuisibles, mais certaines sont spécialisées (par exemple, *B. brongniartii* ne parasite que des espèces du genre Melolontha) (Zimmermann 2007). Cependant, les virus pathogènes pour les insectes suscitent un intérêt croissant, bien que le développement de la résistance d'un insecte nuisible à une souche d'insecticide semble être un facteur important pour déterminer l'utilisation correcte de ces produits, comme cela a été souligné dans le cas du carpocapsa apple granulovirus.

L'approche de la pulvérisation des cultures avec un agent microbien, c'est-à-dire la distribution de formulations de biopesticides, est analogue à celle utilisée pour les pesticides synthétiques : la lutte contre les insectes se fait uniquement au moyen de l'organisme utilisé (Jaroński 2010). Les raisons techniques de l'utilisation de l'inondation sont liées à la biologie des espèces entomopathogènes, mais aussi au fait que la plupart des systèmes de culture et leurs ravageurs associés sont transitoires et ne durent qu'une saison de croissance, parfois seulement quelques semaines. L'interruption temporaire de l'habitat culturel élimine non seulement les parasites, mais aussi, dans de nombreux cas, l'agent microbien capable de les contrôler. Des applications répétées sont donc nécessaires, adaptant ainsi aux biopesticides un paradigme chimique familier à l'agriculteur, qui applique simplement des champignons bénéfiques comme il le fait pour les pesticides chimiques. Dans le cas des biofongicides, qui sont utilisés pour lutter contre les maladies des plantes, il existe des formulations qui peuvent être appliquées à la fois avant et après la récolte. Toutefois, même dans ce cas, la variété des espèces et des souches connues pour leur activité de biocontrôle ne correspond pas au nombre de micro-organismes enregistrés en tant que substances actives. En outre, la plupart des souches autorisées (par exemple *Trichoderma* sp.) sont utilisées pour lutter contre les pathogènes du sol (Ptaszek et al. 2023). Récemment, cependant, les biofongicides ont suscité un intérêt croissant, car ils offrent la possibilité de lutter contre les infections survenant dans les champs, mais aussi pendant le stockage (causées par *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., etc.) (Sellitto et al. 2021). L'utilisation de biofongicides avant la récolte permet d'éviter les risques liés à la présence de résidus de pesticides qui ne respectent pas les limites fixées par la

législation de l'UE. À cet égard, il convient de noter que dans la dernière mise à jour du règlement (CE) n° 1107/2009 sur les substances actives des pesticides ne nécessitant pas la fixation de limites maximales de résidus, 21 des 39 substances actives répertoriées sont d'origine microbienne. Néanmoins, outre les facteurs influençant l'efficacité des bioinoculants utilisés pendant la culture, il est important de considérer que la phase post-récolte est caractérisée par des interventions physico-chimiques (par exemple, le lavage ou la modification de l'atmosphère de stockage) utilisées pour préserver ou prolonger la durée de conservation des produits, ce qui représente donc un autre facteur de variabilité.

En outre, l'utilisation de produits à base de microbes réduit le risque de résistance des agents pathogènes, qui se produit souvent lors de l'application de pesticides. L'action des micro-organismes dans la protection des plantes peut être basée sur différents mécanismes, à la fois directs et indirects. Les effets directs sur l'agent pathogène sont basés sur l'antagonisme microbien par l'antibiose, la compétition pour les nutriments ou la colonisation des niches et le parasitisme. Les micro-organismes peuvent également perturber les conditions de croissance nécessaires au développement des pathogènes. Le mécanisme indirect implique l'induction d'une résistance dans la plante qui peut conduire à une réduction de la prolifération, de l'agressivité ou des dommages causés par le pathogène.

Les micro-organismes utilisés dans la protection biologique des plantes doivent remplir certaines conditions pour contribuer efficacement à la protection des plantes contre les ravageurs ou les agents pathogènes :

- ils doivent être sans danger pour la santé humaine,
- ils doivent être génétiquement stables et présenter une viabilité et une résistance élevées aux fluctuations de l'environnement,
- ils devraient avoir des besoins nutritionnels modérés et des taux de croissance rapides,
- ils doivent être spécifiques au ravageur ou au pathogène concerné, afin d'éviter les effets néfastes sur les organismes bénéfiques et les effets secondaires indésirables,
- ils doivent être compatibles avec différents systèmes de culture, y compris l'utilisation d'engrais et d'autres produits phytopharmaceutiques,
- ils doivent être efficaces dans la lutte contre les ravageurs ou les agents pathogènes. Leur capacité à coloniser et à concurrencer les pathogènes est un facteur clé.

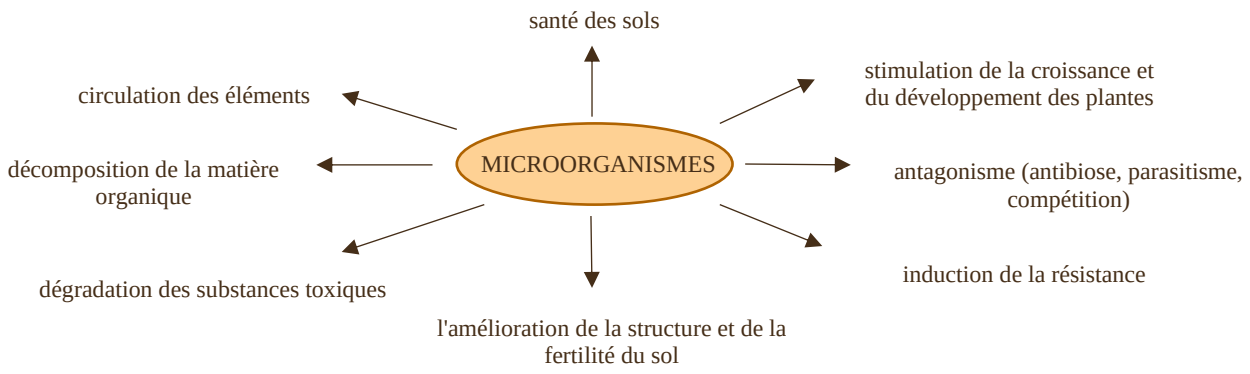

Fig. 2.1. Les fonctions les plus importantes des micro-organismes

2. Biocontrôle des ravageurs et des pathogènes du sol : facteurs à prendre en compte pour obtenir une grande efficacité

Il convient de noter qu'à l'heure actuelle, la plupart des produits phytopharmaceutiques biologiques à base de micro-organismes contiennent des souches uniques et qu'un seul est enregistré en tant que consortium (*Trichoderma asperellum* souche ICC 012+ *Trichoderma gamsi* ICC 080). Si l'efficacité des isolats bactériens ou fongiques sélectionnés lors des tests en laboratoire ou en serre est satisfaisante, l'efficacité des bioproduits sur le terrain reste l'un des principaux défis de l'agriculture moderne (Kowalska et al. 2020 ; Michev et al. 2021). Les facteurs limitant l'obtention d'une efficacité élevée de ces formulations à base de micro-organismes peuvent être dus à des facteurs biotiques et abiotiques, comme la concurrence des micro-organismes indigènes, la sensibilité à des conditions environnementales variables, mais aussi le climat et les conditions météorologiques, les méthodes d'application et les pratiques de gestion des cultures (Trivedi et al. 2020 ; Malusà et al. 2021). Pour des raisons pratiques, les facteurs susmentionnés peuvent être divisés en quatre catégories : les facteurs liés à la culture (Plant), les propriétés du sol (Soil), le processus de formulation (Product) et les pratiques agricoles (Farmer) (Figure 2.2.).

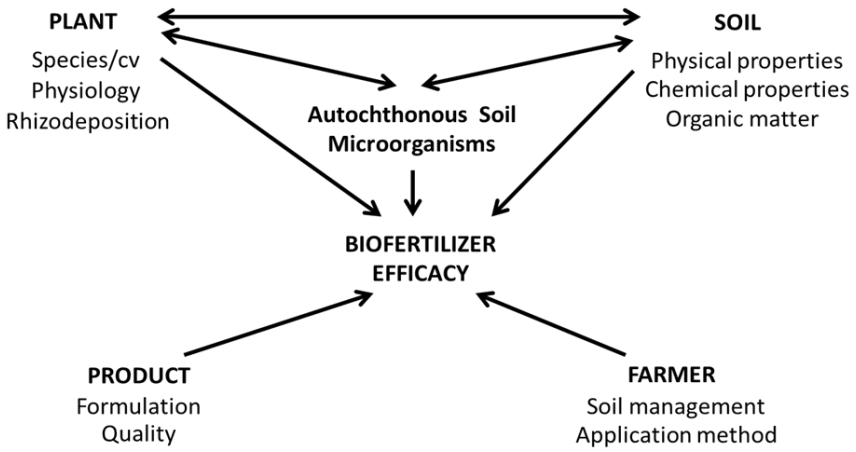

Fig. 2.2. Facteurs influençant l'efficacité des bioproduits

L'état physiologique de la plante est important dans les interactions avec les biopesticides. Les composants des feuilles peuvent affecter la persistance des spores et la sensibilité des insectes à l'infection par les bioinsecticides. Le niveau nutritionnel de la plante influe également sur la santé générale des insectes nuisibles et peut donc influencer l'effet des entomopathogènes fongiques. En outre, il a été observé que la présence de phytopathogènes peut affecter la sensibilité du ravageur aux champignons insecticides : par exemple, il a été constaté que *M. anisopliae* provoque une mortalité de 100 % du ravageur lorsque celui-ci se trouve sur des feuilles infectées par le champignon, mais une mortalité de seulement 50 % lorsque le ravageur se nourrit de feuilles non infectées (Rostas et Hilker 2003).

La difficulté de garantir une efficacité constante contre les pathogènes et les ravageurs des plantes accroît les complications et les difficultés liées à l'utilisation des biopesticides, malgré leur sécurité. Dans la pratique, le niveau d'efficacité réalisable est certainement une "question de chiffres" : il faut appliquer suffisamment de spores pour réduire la population d'insectes nuisibles ou prévenir l'infection par des agents pathogènes. Dans le cas des bioinsecticides, le mode d'action par lequel la souche parasite (par infection cutanée ou par

le système digestif), le comportement de l'insecte (sur la plante ou dans le sol) et la morphologie de la plante déterminent la meilleure méthode d'application pour assurer un contrôle efficace. De même, pour les biofongicides, le cycle biologique du pathogène et le site d'infection déterminent le moment et la méthode d'application pour permettre une colonisation préventive par un agent de biocontrôle contre le pathogène.

Les propriétés chimiques (pH, teneur en matière organique et en nutriments) et physiques (texture) du sol influencent les communautés bactériennes et fongiques et donc le potentiel de colonisation et l'efficacité des biopesticides appliqués au sol. La concurrence du microbiome indigène, qui est également influencée par les propriétés du sol, augmente la variabilité de l'adaptabilité et de la persistance des bioinoculants. Cependant, les conditions optimales de croissance microbienne (humidité, température, teneur en matière organique, etc.) favorisent généralement la persistance et la colonisation des racines par les bioinocula.

Le processus de production de l'inoculum est crucial pour obtenir une formulation de haute qualité, car il existe une corrélation directe entre l'abondance des micro-organismes et la qualité du produit final. Comme l'agent actif des formulations microbiennes est constitué de bactéries ou de champignons viables, l'un des principaux problèmes consiste à mettre au point une formulation à longue durée de conservation. Des additifs sont utilisés pour améliorer les paramètres physiques et chimiques des inocula (adhésifs, émulsifiants, composés tampons) et pour prolonger la durée de vie des micro-organismes. La formulation optimale protège les cellules microbiennes pendant le stockage et le transport, ce qui permet d'augmenter la durée de conservation de l'inoculum dans le sol ou sur la plante tout en étant inerte pour l'environnement. Il existe deux formes principales de préparations microbiennes : les préparations sèches ou granulaires et les préparations liquides. En général, les préparations granulaires sont plus efficaces dans le sol, tandis que les préparations liquides, bien que plus faciles à appliquer, ont une durée de conservation plus courte. Un autre facteur important influençant l'efficacité des produits microbiens est les conditions dans lesquelles ils sont stockés. Stocker les produits à des températures extrêmes ou laisser une formulation sèche devenir humide entraîne une diminution plus rapide du nombre de microbes. Les agriculteurs qui utilisent des préparations contenant des bactéries ou des champignons doivent être conscients des facteurs qui affectent la durée de conservation de la préparation.

L'établissement de normes juridiques minimales pour l'enregistrement et la commercialisation des produits microbiens est important pour garantir une norme de qualité minimale, qui est un autre facteur influençant l'efficacité des bioproduits sur le terrain. Dans le cas des biopesticides, leur qualité est garantie par un processus d'enregistrement long et coûteux et par un contrôle de la qualité du produit au niveau du marché, qui doivent être respectés par chaque État membre de l'UE.

Il est essentiel de comprendre les facteurs qui influencent l'activité microbienne bénéfique pour que les agriculteurs puissent incorporer avec succès ces produits dans leur pratique. La structure du microbiome du sol, et par conséquent la durabilité ou l'efficacité des bioproduits inoculés, est fondamentalement influencée par les pratiques de gestion agricole, avec des effets contrastés lorsque l'on compare les systèmes intensifs et les systèmes plus respectueux de l'environnement : des pratiques telles que le travail du sol, la protection des cultures, la fertilisation minérale et organique ou le régime hydrique peuvent altérer l'efficacité des biopesticides appliqués dans le sol.

Pour les biopesticides, la pratique qui peut avoir le plus d'impact sur leur efficacité est certainement la résistance aux produits de synthèse (Karpouzas et al. 2022). Le site d'interaction chimique entre les

bioinsecticides et les résidus de produits synthétiques est la surface de la feuille, où la spore fongique bénéfique est dormante dans la plupart des conditions jusqu'à ce qu'elle entre en contact avec l'épiderme de l'insecte. Certains produits agrochimiques sont rapidement absorbés par la feuille après leur application : par exemple, les fongicides à base de strobilurine sont toxiques *in vitro* pour les entomopathogènes fongiques et une large gamme de champignons, mais ils sont absorbés par la feuille dans les 15 minutes suivant l'application, ce qui fait que le contact entre les spores fongiques déjà présentes ou appliquées en même temps est très court et ne pose donc pas de problème particulier pour le bioinsecticide. Il est évident que les biopesticides appliqués après les fongicides synthétiques ne doivent pas entrer en contact avec leurs résidus, de sorte qu'il faut tenir compte du délai d'attente des produits appliqués précédemment avant d'appliquer un biopesticide.

Une autre limite à l'utilisation des biopesticides à l'échelle commerciale est leur application correcte et le taux de dosage. L'effet de la dose est particulièrement important pour les biopesticides. En général, lors de l'application de champignons insecticides sur des cultures de plein champ ou en serre, au moins 10^{-10} propagules ha^{-1} doivent être appliqués pour garantir un bon niveau d'efficacité (Jaroński 2010). Cela correspond à 10^5 propagules cm^{-2} sur une surface plane ou, théoriquement, à 10^4 propagules cm^{-2} sur une culture dont l'indice de surface foliaire est normal. Des doses similaires sont également nécessaires pour les biofongicides. La situation se complique pour les traitements antiparasitaires dans le sol, où, outre la dose appropriée, il est nécessaire de faciliter le contact entre le biopesticide et le parasite ou l'agent pathogène. La technique d'application joue donc un rôle clé pour assurer une action défensive. En concentrant les propagules de biopesticides sur une petite surface ciblée, il est possible de multiplier leur concentration par un facteur de 6 à 30. Cependant, il ne faut pas oublier qu'après l'application sur les feuilles, la concentration des propagules diminue en fonction de divers facteurs, tels que la lumière du soleil, la pluie, la température, l'humidité, la composition chimique de la surface des feuilles et le microbiote associé à la plante. La situation est similaire dans le sol : dans de nombreux cas, en particulier pour les préparations bactériennes, la persistance des bioinoculants dans le sol ou la rhizosphère des racines est généralement limitée à 30-40 jours après l'inoculation (Bashan et al. 1995). Il est donc nécessaire de procéder à des applications multiples (2-4) par saison de culture, la fréquence dépendant des conditions météorologiques et du développement des parasites/pathogènes dans le cas des biopesticides. Cela n'est pas considéré comme un inconvénient pour les préparations microbiennes, car plusieurs traitements par saison de culture sont également effectués pour les préparations synthétiques.

La méthode d'application peut également affecter les performances des biopesticides. Pour leur distribution, en particulier pour les formulations granulaires, des machines sont généralement déjà disponibles. L'application de bioinoculants par traitement des semences ou au sol sous forme liquide offre une efficacité comparable dans la production de différentes espèces végétales (Deaker et al., 2004). L'application de formulations liquides à l'aide d'un pulvérisateur hydraulique n'affecte que légèrement la viabilité des bactéries utilisées pour la protection des cultures, mais le temps de travail prolongé réduit jusqu'à 50 % le nombre de cellules viables atteignant la surface des feuilles (Świechowski et al. 2012). Le volume d'eau utilisé pour l'application et la présence d'adjuvants peuvent également affecter l'efficacité des biopesticides fongiques. Une attention particulière doit être accordée au moment de la distribution du bioproduit : une surexposition à la lumière (en particulier aux UV) ou des conditions de faible humidité peuvent réduire la viabilité et la longévité des micro-organismes et, par conséquent, leur efficacité.

Il est également important de s'assurer que les micro-organismes introduits dans l'environnement disposent des conditions appropriées pour leur prolifération. L'aspect du stockage adéquat des biopesticides, qui dépend de leur composition, sera également important.

C'est pourquoi, dans le cadre du projet EXCALIBUR (Horizon 2020), des essais expérimentaux en plein champ visant à étudier les nouveaux inoculants microbiens multifonctionnels du sol sont testés sur trois cultures modèles dans différentes régions pédoclimatiques.

Biocontrôle des pathogènes du sol : exemples pratiques

Le biocontrôle des pathogènes du sol implique l'utilisation de micro-organismes bénéfiques pour supprimer la croissance des organismes pathogènes dans le sol. Plusieurs mécanismes sont utilisés par ces micro-organismes pour réaliser le biocontrôle, notamment l'antibiose, l'hyperparasitisme, l'induction d'une résistance et la compétition pour l'espace et les nutriments. Par exemple, certaines souches bactériennes, telles que les pseudomonades fluorescentes, produisent des métabolites secondaires extracellulaires qui inhibent la croissance des agents pathogènes présents dans le sol. En outre, certains agents de biocontrôle provoquent une résistance systémique induite chez les plantes hôtes, tandis que d'autres interfèrent spécifiquement avec les facteurs de pathogénicité des champignons. L'efficacité des produits d'origine microbienne dans la lutte contre les pathogènes du sol est influencée par divers facteurs, tels que la diversité et l'abondance des taxons pathogènes, le microbiome du sol et les conditions environnementales. La compréhension des interactions entre le sol, les plantes, les pathogènes et les agents de biocontrôle est cruciale pour l'application pratique des stratégies de biocontrôle. C'est pourquoi les recherches en cours visent à améliorer l'efficacité des produits à base de microbes et à évaluer leur impact sur le microbiome du sol (Haas et Défago 2005 ; Ptaszek et al. 2023 ; Handelsman et Stabb 1996).

Voici quelques exemples de micro-organismes utilisés pour le biocontrôle des agents pathogènes présents dans le sol :

- *Pseudomonas* spp. - Les membres du genre *Pseudomonas*, tels que les pseudomonades fluorescentes, sont connus pour leur capacité à produire des antibiotiques antifongiques, à provoquer une résistance systémique induite chez les plantes hôtes et à interférer avec les facteurs de pathogénicité fongique (Haas et Défago 2005).
- *Bacillus* spp. - Certaines souches de bactéries *Bacillus*, comme *Bacillus amyloliquefaciens*, ont été utilisées comme agents de biocontrôle pour supprimer les pathogènes du sol. Elles peuvent produire une variété de composés antifongiques et induire une résistance systémique chez les plantes (Bonaterra et al. 2002).
- *Streptomyces* spp. - Certaines espèces de bactéries *Streptomyces* ont été étudiées pour leur potentiel en matière de lutte biologique. Elles sont connues pour produire une large gamme de composés bioactifs, y compris des antibiotiques et des agents antifongiques (Bonaterra et al. 2002).
- *Trichoderma* spp - *Trichoderma* est un champignon de biocontrôle bien connu, utilisé pour supprimer les pathogènes du sol. Il agit par le biais de divers mécanismes tels que le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition, et a été largement étudié pour son potentiel de contrôle d'une série de champignons pathogènes du sol, y compris *Fusarium*, *Pythium* et *Rhizoctonia* (Graham et Strauss 2021).

- *Fusarium* sp. - L'utilisation de souches antagonistes de *Fusarium* pour lutter contre les agents pathogènes présents dans le sol a été étudiée dans le cadre de la lutte biologique. Par exemple, la souche de *Fusarium* K5 a montré un contrôle de la maladie de 69% et une augmentation de la production de biomasse de basilic par rapport au contrôle inoculé (Pugliese et al. 2008), et la souche de Fusarium MSA35 est connue pour produire des composés volatils pour contrôler les flétrissures de *Fusarium* (Gilardi et al. 2005).

Ces micro-organismes utilisent divers mécanismes, tels que l'antibiose, la résistance systémique induite et l'interférence avec les facteurs de pathogénicité, pour contrôler la croissance des agents pathogènes présents dans le sol.

Diverses méthodes sont utilisées pour appliquer des micro-organismes antagonistes afin de contrôler les agents pathogènes présents dans le sol :

- Traitement des semences - des micro-organismes antagonistes peuvent être appliqués aux semences avant la plantation. Cette méthode garantit la présence des micro-organismes dans la rhizosphère, où ils peuvent s'établir et assurer la protection des jeunes plants.
- Application au sol - les micro-organismes peuvent être appliqués directement au sol, soit par arrosage, soit par le biais de systèmes d'irrigation. Cela permet aux micro-organismes de coloniser la rhizosphère et d'assurer une protection à long terme contre les agents pathogènes présents dans le sol.
- Incorporation dans les milieux de culture - pour la production de cultures en serre ou en conteneur, des micro-organismes antagonistes peuvent être incorporés dans les milieux de culture pour assurer une protection contre les agents pathogènes présents dans le sol (Panth et al. 2020 ; Pandit et al. 2022).

Ces méthodes visent à garantir l'établissement et l'activité de micro-organismes antagonistes dans la rhizosphère, où ils peuvent lutter efficacement contre les agents pathogènes présents dans le sol et contribuer à la santé des plantes.

3. Biocontrôle des ravageurs et des pathogènes affectant les organes aériens des plantes : aspects pratiques

Actuellement, les biopréparations à base de micro-organismes tels que les virus, les bactéries et les champignons sont utilisées dans la protection des plantes contre les maladies et les parasites.

Virus

Ils constituent un vaste groupe d'agents pathogènes pour les insectes, dont le plus nombreux est la famille des *Baculoviridae*. Les représentants de ce groupe sont des virus très sélectifs pour leurs hôtes, les insectes. Les papillons (chenilles de la drosophile du pommier, tordeuses, etc.) sont les plus souvent attaqués, les hyménoptères et les coléoptères le sont beaucoup moins. Leur virulence est souvent limitée à une famille, à un genre, voire à une espèce d'insecte. De plus, ils ne se multiplient pas dans les cellules des vertébrés et des plantes, ce qui en fait un agent de lutte biologique sans danger pour l'environnement. Les effets de leur présence chez les insectes ont été observés dès le XIXe siècle, mais leur utilisation pratique n'est devenue possible qu'avec une meilleure compréhension de la biologie des hôtes, ainsi que du mécanisme d'infection

et du cycle de développement des virus eux-mêmes. Les baculovirus sont de grands virus contenant de l'acide désoxyribonucléique (ADN) emballé dans des capsides protéiques en forme de bâtonnets, qui se forment principalement dans les noyaux des cellules hôtes. Les capsides sont fusionnées dans une matrice, des molécules protéiques appelées corps d'inclusion. Cette matrice protéique, appelée polyédrine dans les virus de la polyédrose nucléaire (NPV) et granuline dans les virus de la granulose (GV), les protège des facteurs environnementaux défavorables et leur permet de survivre en dehors de l'organisme hôte. Leur exclusivité à infecter les arthropodes et leur présence dans des corps d'inclusion protecteurs en font des agents biologiques précieux d'une grande importance pratique. Les corps d'intrusion transportés par le vent et la pluie et par certains vertébrés et invertébrés parasites agissant comme transporteurs (vecteurs) peuvent persister dans la nature pendant de nombreuses années et constituer une source d'infection pour les insectes sensibles. Ingérés par l'insecte avec sa nourriture, ils se dissolvent dans son intestin et, infectant la plupart des tissus de l'hôte, conduisent à sa mort. Les *baculovirus* sont présents dans presque toutes les populations naturelles d'insectes en Pologne. Cependant, l'introduction supplémentaire de ces virus sous forme de préparations biologiques augmente leur fréquence d'infection ou, avec l'introduction de préparations virales hautement concentrées, permet une réduction rapide de la population d'insectes nuisibles. Il convient toutefois de rappeler que la température joue un rôle important dans l'action efficace des préparations virales. Elle a une influence importante sur le déroulement de l'infection virale. Les températures inférieures à 20° C ralentissent le taux de multiplication du virus, tandis que les températures plus élevées (25-30° C) accélèrent le processus de la maladie virale. Les différents stades du ravageur sont également plus ou moins sensibles à l'infection virale - les jeunes stades sont plus sensibles.

Bactéries

Parmi le vaste groupe de bactéries insecticides présentes dans la nature, la plus importante pour la protection des plantes contre les ravageurs est l'espèce *Bacillus thuringiensis*, qui produit un cristal de protéine contenant ce que l'on appelle la delta-endotoxine, responsable de la mort de l'insecte. Les spores (endospores) sont la forme de survie de cette bactérie, ce qui lui permet de survivre même dans des conditions environnementales défavorables. Les cristaux d'endotoxine et les spores des différentes sous-espèces et isolats de *B. thuringiensis* sont généralement les ingrédients de base des biopréparations à base de bactéries. Ils sont utilisés contre un certain nombre d'espèces nuisibles importantes : les chenilles de papillons utilisent un isolat de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, les larves de mouches *B. thuringiensis* var. *israelensis* et les larves de coléoptères *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*. Le cristal en question est un composé protéique qui doit être activé avant de pouvoir agir. Dans des conditions normales, cette protéine présente une très faible solubilité, ce qui la rend totalement inoffensive pour l'homme, les animaux supérieurs et la plupart des insectes. Cependant, elle se dissout facilement dans un environnement alcalin (pH>9,5), comme celui que l'on trouve dans l'intestin moyen des chenilles de papillon, par exemple. Par conséquent, *B. thuringiensis* est un agent de lutte contre les insectes très spécifique. La delta-endotoxine endommage l'épithélium intestinal de l'insecte et l'empêche d'absorber la nourriture. L'insecte cesse de se nourrir et des générations successives de bactéries se développent dans son corps, entraînant sa mort dans les jours qui suivent. L'inhibition de l'alimentation et la mort tardive de l'insecte sont des caractéristiques de l'infection par cette bactérie.

L'utilisation de bactéries pour lutter contre les maladies foliaires a été étudiée et certaines bactéries bénéfiques ont montré leur potentiel à cet effet. Par exemple, dans une étude sur le biocontrôle des maladies

racinaires et foliaires de la tomate, il a été constaté que les consortiums microbiens, comprenant *Pseudomonas chlororaphis* et *Pseudomonas azotoformans*, ont démontré des effets antagonistes contre l'agent pathogène foliaire *Botrytis cinerea* lorsqu'ils sont appliqués sous forme de pulvérisation foliaire. Ces traitements ont réduit la surface des lésions nécrotiques causées par *B. cinerea*, les consortia microbiens permettant une réduction de 70% de la surface des lésions (Minchev et al. 2021).

En outre, les bactéries du genre *Bacillus* (par exemple *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) sont également couramment utilisées dans la protection des plantes contre les maladies. Ces bactéries présentent une activité antifongique en produisant divers composés (antibiotiques, enzymes, produits chimiques) qui inhibent la croissance des agents pathogènes, les concurrencent pour la nourriture et l'espace vital et induisent une résistance chez les plantes. L'utilisation des bactéries *Bacillus* dans la protection des plantes fait souvent partie des stratégies de culture durable, car ces bactéries sont sans danger pour l'environnement et n'ont pas d'effets négatifs sur d'autres organismes.

En outre, la recherche a démontré le potentiel des agents de biocontrôle bactériens, tels que les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas*, pour réduire l'incidence et la gravité des maladies bactériennes courantes lorsqu'ils sont appliqués en pulvérisation foliaire (Minchev et al. 2021).

Levures

Les levures les plus couramment utilisées pour le biocontrôle des maladies des plantes dans l'UE sont *Candida oleophila, Aureobasidium pullulans, Metschnikowia fructicola, Cryptococcus albidus* et *Saccharomyces cerevisiae* (Freimoser et al. 2019). Ces espèces de levures ont été reconnues pour leur potentiel en tant qu'agents de biocontrôle contre divers pathogènes végétaux, soulignant leur importance dans les pratiques d'agriculture durable. *Candida oleophila*, par exemple, est connue pour sa forte activité antagoniste contre les moisissures et les maladies post-récolte des fruits à pépins. *Aureobasidium pullulans* a été utilisé pour le biocontrôle de divers agents pathogènes des plantes, y compris des champignons et des bactéries, et il a été enregistré dans l'UE comme produit de biocontrôle ciblant *B. cinerea* sur le raisin, la tomate et la fraise. *Metschnikowia fructicola* s'est avéré efficace pour lutter contre les maladies post-récolte des fruits, comme les pommes et les poires. *Cryptococcus albidus* s'est avéré avoir une activité antagoniste contre divers agents pathogènes des plantes. *Saccharomyces cerevisiae*, communément appelé levure de boulangerie, a été utilisé pour le biocontrôle de divers agents pathogènes des plantes, y compris des champignons et des bactéries, et différents produits formulés contenant des cellules de levure séchées sont également utilisés comme éliciteurs. Ces espèces de levure ont été homologuées dans l'UE en tant que produits de biocontrôle en raison de leur activité antagoniste contre divers agents pathogènes des plantes, de leurs exigences de culture peu contraignantes et de leurs préoccupations limitées en matière de biosécurité. L'utilisation de ces espèces de levures en tant qu'agents de biocontrôle pourrait permettre de réduire l'utilisation de pesticides chimiques, qui peuvent avoir des effets négatifs sur la santé humaine et l'environnement (Kowalska et al. 2022). Par conséquent, l'utilisation de levures de biocontrôle représente une approche prometteuse pour le développement de pratiques agricoles durables (Kowalska et al. 2022).

Champignons

Outre les champignons, qui peuvent être à l'origine de maladies végétales dangereuses, il existe également un large groupe de ces organismes qui présentent des capacités spécifiques à agir comme antagonistes et à

parasiter des insectes nuisibles et des nématodes. Les infections fongiques sont facilement reconnaissables à l'aspect caractéristique de l'insecte malade ou mort, car de nombreuses espèces produisent du mycélium et des spores à l'extérieur du corps de l'hôte après sa mort, le recouvrant d'une couche épaisse souvent d'une couleur caractéristique, par exemple *Metarhizum anisopliae* - verdâtre, *Beauveria bassiana* - blanc. Le cycle de développement de la plupart des champignons insecticides est similaire : le stade infectieux est généralement la spore qui, après avoir atteint la cuticule de l'insecte, germe et pénètre dans l'insecte par le tube germinatif. Après avoir pénétré dans le corps de l'hôte, le champignon se multiplie dans l'hémolymphe, ce qui entraîne la paralysie de l'insecte, qui meurt au bout d'un certain temps. Après la mort de l'insecte, un mycélium abondant se développe à la surface de l'insecte, donnant naissance à de nouvelles spores qui peuvent être transportées par le vent, l'eau, les insectes et d'autres animaux.

Sur les quelque 100 000 espèces de champignons actuellement connues, on compte environ 800 espèces de champignons insecticides, dont 12 à 15 espèces sont utilisées pour la protection biologique contre les insectes nuisibles aux plantes, principalement dans les cultures sous serre, mais aussi en plein champ. Les champignons insecticides sont très répandus dans l'environnement et jouent un rôle crucial en réduisant les populations d'insectes. Les espèces les plus courantes sont *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosorosea*, *Verticillium lecanii*, qui sont plus ou moins utilisées dans les préparations biologiques. Les champignons insecticides sont très sensibles à la température et à l'humidité. Ils agissent par contact et doivent se trouver à la surface du corps de l'insecte pour germer et pénétrer dans l'insecte pour provoquer sa mort. En raison de l'exigence d'un microclimat approprié, les biopréparations fongiques sont principalement utilisées dans les serres, bien que de nombreux rapports fassent état de leur bonne efficacité dans des conditions de terrain, par exemple *B. brongniartii* pour réduire les populations de larves de coléoptères de mai. Dans les cultures de couverture, ils sont utilisés pour réduire les populations d'aleurodes, par exemple, et dans les grandes cultures, ils réduisent également le doryphore de la pomme de terre, la cicadelle du chou et la pourriture brune. On a constaté qu'environ 30 % des populations de pucerons des céréales sont infectées chaque année par des champignons insecticides. Des épizooties causées par ce groupe de champignons ont également été observées dans les populations de dactyle, de pyrale du pommier, de tanaisie à bec croisé, de coccinelle du pommier, de blanc du colza et d'autres.

Dans la protection biologique des plantes contre les pathogènes, les souches de *Trichoderma* sont les plus utilisées. Par exemple, les recherches menées par divers centres scientifiques dans le monde entier ont montré que les souches de *Trichoderma* ou leurs métabolites secondaires présentent une forte activité antagoniste contre divers champignons pathogènes des plantes, qu'ils concurrencent et suppriment la croissance des organismes pathogènes par des mécanismes tels que la production d'antibiotiques et d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires d'autres champignons, améliorent la croissance des plantes et favorisent le développement du système radiculaire. *Trichoderma* peut également induire une résistance systémique chez les plantes en déclenchant les mécanismes de défense de la plante. Cela comprend l'activation de voies de signalisation qui conduisent à la production de composés liés à la défense, rendant les plantes plus résistantes aux infections par des micro-organismes pathogènes. Ce genre est également connu pour sa capacité à produire une variété d'enzymes telles que les chitinases, les glucanases et les protéases, qui jouent un rôle crucial dans la décomposition des parois cellulaires des champignons pathogènes, contribuant ainsi à la lutte contre les maladies (Waghunde et al. 2016 ; Zin and Badaluddin 2020).

Ampelomyces quisqualis est un autre exemple de champignon de biocontrôle qui s'est avéré efficace contre les pathogènes foliaires tels que l'oïdium et la rouille. Il agit comme un hyperparasite, infectant et parasitant d'autres champignons, supprimant ainsi un large éventail de maladies des plantes, y compris celles qui affectent le feuillage. *Clonostachys rosea* a également été étudiée pour son potentiel de biocontrôle contre divers pathogènes foliaires. Il utilise de multiples mécanismes, y compris le mycoparasitisme, l'antibiose et la résistance induite, pour supprimer les maladies foliaires dans différentes cultures (Elad 2003).

Les défis associés à l'utilisation des champignons pour le biocontrôle des maladies foliaires sont les suivants :

- Variabilité et incohérence - L'utilisation à grande échelle des champignons de biocontrôle est limitée par la variabilité et l'incohérence de leur activité de biocontrôle, qui peut être influencée par des facteurs environnementaux. Cette variabilité entrave leur application à grande échelle.
- Sensibilité aux influences environnementales - Certains champignons de biocontrôle sont sensibles aux influences environnementales, ce qui peut affecter leur efficacité. Cette sensibilité peut poser des problèmes lorsqu'il s'agit de maintenir une suppression constante des maladies dans des conditions environnementales variables.
- Intégration avec les fongicides chimiques - L'intégration du biocontrôle avec les fongicides chimiques sur une base calendaire ou en fonction des exigences écologiques peut s'avérer difficile. Bien que cette intégration puisse améliorer la suppression des maladies, elle nécessite une gestion attentive pour assurer la compatibilité et l'efficacité des deux méthodes de contrôle.

*Fig. 2.3. Photo d'*Otiorhynchus sulcatus *adulte infecté par* Beauveria bassiana
Auteur : Małgorzata Tartanus

Fig. 2.4. Photo de larves de Melolontha melolontha *infectées par* Beauveria bassiana
Auteur : Małgorzata Tartanus

4. La capacité multifonctionnelle des micro-organismes : une opportunité pour la lutte intégrée contre les ravageurs

Dans le passé, la lutte biologique basée sur les micro-organismes a généralement consisté à utiliser une seule souche de bactérie ou de champignon, notamment en raison des approches réglementaires qui ont considéré les produits à base de microbes comme des composés chimiques. L'efficacité des inoculants microbiens, en particulier ceux qui sont appliqués en tant que souches uniques dans l'environnement, varie considérablement. C'est pourquoi la principale tendance actuelle en matière de protection des plantes est l'utilisation d'inoculants composés de plusieurs micro-organismes ayant des modes d'action différents afin d'accroître l'efficacité des produits microbiens et d'étendre leur spectre d'activité à diverses espèces de pathogènes. Les consortiums peuvent être conçus comme un mélange de différentes souches appartenant à la même espèce ou composés d'espèces de différents genres (Sarma et al. 2015 ; Minchev et al. 2021 ; Ptaszek et al. 2023). Les consortiums basés sur le complexe de micro-organismes bénéfiques pourraient potentiellement renforcer les effets de biocontrôle, car les différentes bactéries et les différents champignons ont des mécanismes d'action distincts. De plus, les différents microorganismes occupent des niches distinctes dans la zone racinaire et réduisent ainsi la compétition entre eux (Sarma et al. 2015 ; Minchev et al. 2021). Les consortiums sont supérieurs à la formulation d'une seule souche au niveau des tâches multiples. Ils peuvent induire différents mécanismes d'action des divers micro-organismes présents, qui peuvent parfois aussi inclure des mécanismes de protection des plantes (par exemple, antagonisme envers les pathogènes ou induction de processus métaboliques qui augmentent la tolérance aux pathogènes ou rendent la plante moins "appétente" pour les ravageurs), et peuvent donc être considérés comme des produits "multifonctionnels" (Kowalska et al. 2020 ; Minchev et al. 2021). Plusieurs biopesticides, dont certains champignons insecticides (par exemple *Beauveria* spp.) et bactéries (par exemple *Bacillus*

thuringiensis), actuellement utilisés dans la protection des cultures, ont montré des effets stimulants sur la croissance des plantes (Kowalska et al. 2020). Le double effet de protection des plantes et de promotion de l'absorption des nutriments a été observé dans certaines études avec des souches de biopesticides *à base de Trichoderma*. Parmi les bactéries utilisées pour la protection contre les agents pathogènes, les bactéries du genre *Bacillus* ont, en général, une application commerciale en tant que biopesticides, mais elles sont également actives dans la promotion de la croissance des plantes.

La capacité multifonctionnelle des micro-organismes offre une voie prometteuse pour le développement d'alternatives inoffensives et durables dans le cadre de la lutte intégrée contre les parasites. L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) considère la lutte intégrée comme la meilleure combinaison de stratégies de lutte contre les pathogènes et les ravageurs, compte tenu du rendement, du profit et du profil de sécurité. De nombreux essais sur le terrain et applications pratiques attestent de l'intégration réussie des micro-organismes dans les programmes de lutte intégrée. Ces études démontrent la faisabilité et l'efficacité de l'utilisation des micro-organismes dans divers contextes agricoles. Les micro-organismes sont un élément clé du maintien de l'équilibre biologique dans l'agroécosystème. En exploitant les divers mécanismes d'action des micro-organismes, il est possible d'élaborer des stratégies durables de lutte contre les ravageurs et les maladies, ce qui favorise la santé de l'environnement et assure la durabilité à long terme de l'agriculture. La multifonctionnalité des micro-organismes s'étend au cycle des nutriments et à la santé des sols. Cependant, la production et la commercialisation de consortiums microbiens posent des problèmes techniques aux producteurs et, surtout, des questions réglementaires.

Les micro-organismes bénéfiques de la rhizosphère jouent un rôle important dans l'atténuation des stress biotiques chez les plantes, ce qui rend intéressante leur utilisation comme bioinoculants pour réduire l'utilisation d'agents antiparasitaires synthétiques dans l'agriculture. Les mécanismes de réduction des agents pathogènes par les micro-organismes de la rhizosphère sont divers (Ptaszek et al. 2023). Certains sont basés sur l'interférence directe des micro-organismes bénéfiques avec la prolifération des pathogènes dans la rhizosphère par le biais de divers mécanismes de compétition, par exemple pour les nutriments ou l'espace, ou la production d'antibiotiques. Les mécanismes indirects sont basés sur l'induction de changements dans la plante hôte qui modifient la sensibilité de la plante à l'agent pathogène, par exemple en induisant une résistance systémique dans la plante.

D'autre part, de nombreux micro-organismes favorisant la croissance des plantes présentent des fonctions de biocontrôle. L'observation selon laquelle la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens n'est pas toujours associée à une amélioration de la nutrition et de la croissance des plantes a conduit à la conclusion qu'une tolérance accrue aux stress biotiques est un autre avantage important de la symbiose. La résistance accrue des plantes mycorhizées aux infections par des pathogènes du sol a été liée à l'accumulation de phytoalexines, de flavonoïdes et d'isoflavonoïdes dans les tissus racinaires colonisés par ces champignons. La protection biologique par les champignons mycorhiziens a également été démontrée sur les nématodes parasites des plantes, par exemple en réduisant les populations de *Meloidogyne incognita* ou de *Pratilenchus penetrans* (45 % et 87 %) dans les racines mycorhizées par rapport aux racines non mycorhizées. La complexité ou la multifonctionnalité de la relation entre la plante hôte et les champignons mycorhiziens a été démontrée, par exemple, dans une étude où des plants de tomates mycorhizés en présence de l'agent pathogène *Alternaria solani* présentaient nettement moins de symptômes de maladie que les plants non mycorhizés, mais l'augmentation des doses d'engrais phosphatés, parallèlement à la

réduction de la formation de mycorhizes, a entraîné une augmentation de la gravité de la maladie, même chez les plants mycorhizés. L'induction d'une activité de défense par les champignons mycorhiziens a également été démontrée dans les organes épigés de la plante : par exemple, les larves de la noctuelle de la tomate (*Helicoverpa arimigera*) élevées sur les feuilles de plantes mycorhizées étaient significativement plus petites (réduction de poids de 62,3 %) que celles élevées sur des plantes non mycorhizées.

Dans ce cadre, qui englobe les aspects scientifiques, commerciaux et réglementaires, le développement d'outils de contrôle des espèces microbiennes introduites devient extrêmement important, notamment pour garantir l'évaluation correcte des risques pour l'environnement et la santé humaine, mais aussi pour évaluer leur durabilité, un aspect utile pour déterminer la méthode d'application optimale (temps et doses) qui permet d'obtenir une efficacité maximale. La recherche à cet effet, qui utilise également des méthodes innovantes, est en cours, et on peut donc s'attendre à ce que des systèmes d'aide à la décision (SAD) soient mis à la disposition des techniciens et des agriculteurs pour améliorer l'application et l'efficacité des bioproduits.

En résumé, les problèmes liés à l'efficacité insuffisante des produits microbiologiques peuvent être dus à une technologie de production (choix des souches, formulation, application et survie) qui n'a pas été entièrement développée. La pression exercée pour réduire l'utilisation de produits phytopharmaceutiques chimiques et d'engrais provenant de sources non renouvelables entraînera la poursuite du développement et de l'amélioration des produits microbiologiques, malgré leurs limites actuelles, et ils deviendront une alternative viable aux pesticides. On s'attend également à ce qu'avec les progrès technologiques et une meilleure connaissance de la viabilité des micro-organismes introduits dans l'environnement, les obstacles actuels à l'utilisation des bioinoculants soient surmontés.

Références

Bashan Y., Puente M.E., Rodriguez-Mendoza M.N., Toledo G., Holguin G., Ferrera-Cerrato R., Pedrin S. 1995. Survival of Azospirillum brasilense in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Applied and Environmental Microbiology, 61(5), 1938-1945.

Bonaterra A., Badosa E., Daranas N., Francés J., Roselló G., Montesinos E. 2022. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. Microorganisms, 10(9), 1759.

Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. 2004. Legume seed inoculation technology-a review. Soil biology and biochemistry, 36(8), 1275-1288.

de Faria M. R., Wraight S. P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological control, 43(3), 237–256.

Elad Y. 2003. Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. Communications in agricultural and applied biological sciences, 68(4, PART A), 17–24.

Food and Agriculture Organization for the United Nations. NSP—Integrated Pest Management. Available online: http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en/ (accessed on 15 July 2024)

Freimoser F. M., Rueda-Mejia M. P., Tilocca B., Migheli Q. 2019. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 35 (10), 154.

Gilardi G., Tinivella F., Gullino M. L., Garibaldi A. 2005. Seed dressing to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* / Entwicklung eines Saatgutbehandlungsverfahrens zur Kontrolle von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection, 112(3), 240–246.

Graham J.H., Strauss S.L. 2021. Biological control of soilborne plant pathogens and nematodes. In: Gentry T.J., Fuhrmann J.J., Zuberer D.A. (eds.) Principles and applications of soil microbiology. Third Edition. Elsevier, pp 633-654.

Haas D., Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature reviews microbiology, 3(4), 307-319.

Handelsman J., Stabb E.V. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. The Plant Cell, 8(10), 1855.

Jaroński S.T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. BioControl, 55,159–185.

Karpouzas D.K., Vryzas Z., Martin-Laurent F. 2021. Pesticide soil microbial toxicity: setting the scene for a new pesticide risk assessment for soil microorganisms. (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 94(10), 1161-1194.

Kowalska J., Tyburski J., Matysiak K., Tylkowski B., Malusà E. 2020. Field exploitation of multiple functions of beneficial microorganisms for plant nutrition and protection: real possibility or just a hope? Frontiers in Microbiology, 11, 1904.

Kowalska J. Krzymińska J. Tyburski J. 2022. Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement—A Short Review. Agriculture, 12(9), 1404.

Malusà E., Berg G., Biere A., Bohr A., Canfora L., Jungblut A.D., Kępka W., Kinzle J., Kusstatscher P., Masquelier S., Pugliese M., Razinger J., Tommasini M.G., Vassilev N., Mayling N.V., Xu X., Mocali S. 2021. A holistic approach for enhancing the efficacy of soil microbial inoculants in agriculture: from lab to field scale. Global Journal of Agricultural Innovation, Research & Development, 8, 176-190.

Minchev Z., Kostenko O., Soler R., Pozo M.J. 2021. Microbial consortia for effective biocontrol of root and foliar diseases in tomato. Frontiers in Plant Science, 12, 756368.

Pandit M.A., Kumar J., Gulati S., Bhandari N., Mehta P., Katyal R., Rawat, C.D., Mishra, V., Kaur J. 2022. Major biological bontrol strategies for plant pathogens. Pathogens, 11(2): 273.

Panth M., Hassler S.C., Baysal-Gurel F. (2020). Methods for management of soilborne diseases in crop production. Agriculture, 10(1), 16.

Ptaszek M., Canfora L., Pugliese M., Pinzari F., Gilardi G., Trzciński P., Malusà E. 2023. Microbial-Based Products to Control Soil-Borne Pathogens: Methods to Improve Efficacy and to Assess Impacts on Microbiome. Microorganisms, 11(1), 224.

Pugliese M., Liu B.P., Gullino M.L., Garibaldi A. 2008. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. Journal of Plant Diseases and Protection, 115, 220–228.

Regulation (EC) No 1107/2009 concerning the placing of plant protection products on the market. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj (accessed on 15 July 2024).

Regulation (EC) No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj (accessed on 15 July 2024).

Rostas M., Hilker M. 2003. Indirect interactions between a phytopathogenic and an entomopathogenic fungus. Naturwissenschaften, 90, 63–67

Sarma B.K., Yadav S.K, Singh S., Singh H.B. 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. Soil Biology & Biochemistry 87, 25-33.

Sellitto V.M., Zara S., Fracchetti F., Capozzi V., Nardi T. 2021. Microbial biocontrol as an alternative to synthetic fungicides: boundaries between pre- and postharvest applications on vegetables and fruits. Fermentation 7(2), 60.

Świechowski W., Doruchowski G., Trzciński P. 2012. Effect of spray application parameters on viability of bacterium Pseudomonas fluorescens used as bio-pesticide in organic fruit production. In: Granatstein D., Andrews P. (eds.) Proc. II Int. Congress on Organic Fruit Research Symposium. ISHS, Leavenworth WA, USA, pp. 18-21.

Trivedi P., Leach J.E., Tringe S.G., Sa T., Singh B.K., 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nature reviews microbiology, 18(11), 607–621.

Waghunde R.R., Shelake R.M., Sabalpara A.N. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. African Journal of Agricultural Research, 11(22): 1952-1965.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology, 17(6),533–596.

Zin N.A., Badaluddin N.A. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences 65(2), 168-178.

Chapitre 3. Micro-organismes pour la promotion de la croissance des plantes

Samuel Bickel[1], Paweł Trzciński[2], Stefano Mocali[3]

[1]Université de technologie de Graz, Petersgasse 12, 8010 Graz, AUTRICHE
[2]Institut d'horticulture - Institut national de recherche, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLOGNE
[3]Council for Agricultural Research and Economics, Centre de recherche sur l'agriculture et l'environnement, Via di Lanciola 12/A, 50125 Cascine del Riccio, ITALIE

Les micro-organismes spécifiques du sol, de la rhizosphère et des plantes jouent un rôle crucial dans la promotion de la croissance des plantes et de l'agriculture. Dans ce chapitre, nous expliquons comment les micro-organismes couramment utilisés et les souches commerciales peuvent favoriser la croissance des plantes. Nous abordons l'exploitation et la sélection des pré-, pro- et postbiotiques pour la promotion de la croissance des plantes et l'amélioration de la fertilité et de la santé des sols. Enfin, les aspects pratiques de l'application correcte des micro-organismes favorisant la croissance des plantes sont abordés.

1. Micro-organismes capables de favoriser la croissance des plantes

Les micro-organismes qui favorisent la croissance des plantes (Plant growth-promoting microorganisms ; PGPM) sont un groupe clé composé principalement de bactéries et de champignons qui contribuent de manière significative à l'amélioration de la croissance des plantes (Glick 2012). L'utilisation de souches commerciales de PGPM et les recherches en cours sur de nouveaux micro-organismes peuvent améliorer notre compréhension de la manière dont ces microbes bénéfiques peuvent être exploités pour améliorer la durabilité de l'agriculture et la productivité des cultures. Les trois principaux groupes de PGPM sont les suivants (1) les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes qui colonisent la surface des racines des plantes, (2) les bactéries endophytes qui vivent à l'intérieur de la plante hôte, et (3) les champignons mycorhiziens (CMA) qui forment des relations symbiotiques avec les racines des plantes. Les principales fonctions assurées par les PGPM et leur association avec la plante hôte sont illustrées dans la figure 3.1.

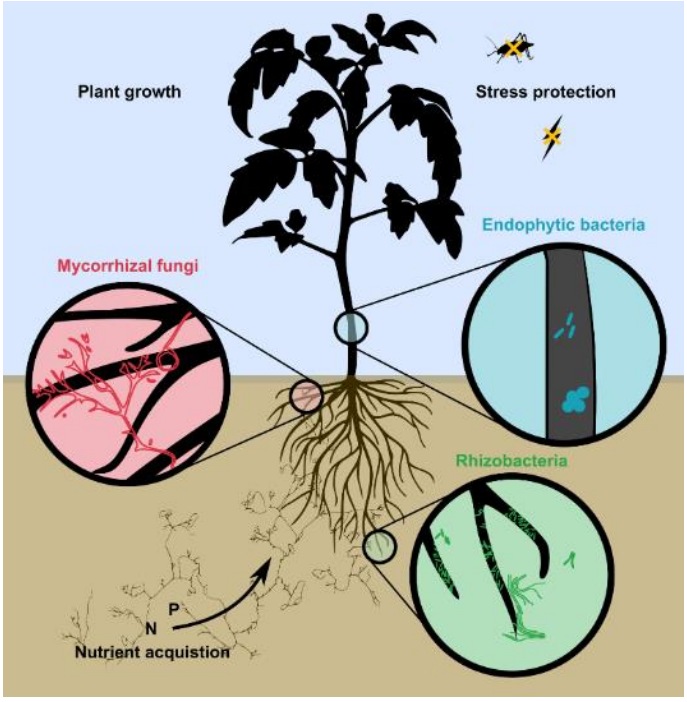

Fig. 3.1. Trois groupes principaux de micro-organismes favorisant la croissance des plantes.

En outre, la diversité microbienne du sol et des plantes joue un rôle crucial dans la promotion de la croissance des plantes par le biais de divers mécanismes qui profitent à la santé et au développement des plantes. Une communauté microbienne diversifiée dans la rhizosphère peut augmenter la disponibilité des nutriments pour les plantes. Cette communauté diversifiée comprend des micro-organismes capables de favoriser la croissance des plantes en facilitant l'absorption et le cycle des nutriments. Une grande diversité taxonomique et fonctionnelle des microbes dans la rhizosphère est associée à la suppression des maladies causées par les agents pathogènes du sol et peut favoriser la croissance des plantes. La diversité et l'activité des communautés microbiennes peuvent contribuer à l'amélioration des performances des plantes et à la réduction de l'incidence des maladies, ce qui favorise en fin de compte la croissance et la santé des plantes. L'abondance de microbes bénéfiques dans le sol est positivement corrélée à la qualité du sol, ce qui se traduit par une meilleure croissance des plantes, une incidence réduite des maladies et une meilleure teneur en éléments nutritifs. La présence de diverses communautés microbiennes influence les propriétés biologiques et chimiques du sol et contribue à améliorer la santé des plantes et le fonctionnement global de l'écosystème. En outre, la communauté microbienne souterraine peut avoir un impact sur la dynamique de la communauté végétale et les processus écosystémiques. De plus, les interactions entre les plantes et une communauté microbienne diversifiée peuvent façonner les caractéristiques des plantes et influencer leur adaptation au fil du temps.

Les interactions complexes entre les plantes et les diverses communautés microbiennes soulignent l'importance de la diversité microbienne pour la santé des plantes et le fonctionnement des écosystèmes.

1.1. Mode d'action - comment les micro-organismes favorisent-ils la croissance des plantes ?

Comme mentionné ci-dessus, les micro-organismes jouent un rôle crucial dans la promotion de la croissance des plantes par le biais de divers mécanismes. Ces mécanismes comprennent la production de phytohormones, l'aide à l'acquisition des nutriments, la résistance systémique aux agents pathogènes et la protection des plantes contre le stress.

Phytohormones

La production de phytohormones est l'un des principaux moyens par lesquels les micro-organismes favorisent la croissance des plantes. Les phytohormones sont des molécules de signalisation qui régulent divers aspects de la croissance et du développement des plantes. De nombreux PGPM peuvent synthétiser des phytohormones telles que les auxines, les cytokinines et les gibbérellines, qui influencent les processus de croissance des plantes. Par exemple, *Azotobacter spp*, *Rhizobium spp*, *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* et *Paenibacillus polymyxa* ont été signalés comme synthétisant des cytokinines, qui sont des phytohormones essentielles influençant les processus de croissance des plantes tels que la division, l'élongation et la différenciation cellulaires (Glick 2012). Plusieurs espèces bactériennes peuvent produire des composés indoliques tels que la phytohormone auxine, l'acide indole-3-acétique (IAA), qui joue un rôle important dans les interactions entre les bactéries et les plantes et peut stimuler la croissance des plantes (Souza et al. 2015). La production d'IAA par *Pseudomonas putida* a été associée à des augmentations significatives des paramètres de croissance des plantes et du rendement des plants de tomates. D'autres taxons, tels que les espèces de Bacillus associées à la rhizosphère du blé (notamment *Bacillus endophyticus*, *Paenibacillus xylanexedens*, *Planococcus citreus*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Sporosarcina sp.* et *Staphylococcus succinus*) présentent des attributs multifonctionnels favorisant la croissance des plantes, y compris potentiellement la production de phytohormones. Les PGPM capables de synthétiser des phytohormones peuvent contribuer à améliorer la croissance et le développement des plantes par de multiples mécanismes.

Acquisition de nutriments

Un autre mode d'action essentiel par lequel les micro-organismes améliorent la croissance des plantes est la promotion de l'acquisition des nutriments par les plantes. Par exemple, les PGPM peuvent solubiliser les minéraux contenant du phosphore, fixer l'azote atmosphérique et produire des sidérophores qui chélatent le fer pour le rendre plus accessible aux racines des plantes. En améliorant la disponibilité des nutriments, ces micro-organismes favorisent la croissance et le développement des plantes. Les inoculants microbiens dotés de propriétés favorisant la croissance des racines et la mobilisation des nutriments ont été proposés comme stratégie pour améliorer l'acquisition des nutriments par les plantes. En interagissant avec les engrais organiques et inorganiques, ces inoculants peuvent faciliter l'absorption des nutriments par les plantes et contribuer à améliorer leur croissance et leur développement. Certaines rhizobactéries bénéfiques ont été signalées comme augmentant l'absorption des nutriments par les plantes en améliorant l'efficacité de l'absorption de l'azote des engrais, comme l'ont démontré des études utilisant des techniques isotopiques[15] N pour suivre le mouvement de l'azote dans les tissus des plantes. Il est intéressant de noter que les inoculants microbiens contenant des *Bacillus spp.* et des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) peuvent améliorer la croissance et le rendement des plantes, ce qui se traduit par une meilleure efficacité de l'absorption des nutriments. Ces PGPM peuvent aider les plantes à extraire davantage de nutriments, y compris l'azote, le phosphore et le potassium, du sol, améliorant ainsi l'acquisition des nutriments. D'autre

part, les *Sphingomonas spp.* qui produisent des auxines et des sidérophores peuvent améliorer la croissance des plantes et l'absorption des nutriments en stimulant le développement des poils racinaires et des racines latérales. Les diverses interactions des PGPM jouent un rôle important dans l'amélioration de l'acquisition des nutriments par les plantes, ce qui favorise en fin de compte une meilleure croissance, une meilleure absorption des nutriments et une meilleure santé des plantes en général.

Protection contre le stress biotique et résistance systémique

Les micro-organismes peuvent également contribuer à la croissance des plantes en induisant une résistance systémique chez ces dernières. En effet, les PGPM peuvent activer les mécanismes de défense des plantes, les rendant plus résistantes aux agents pathogènes et aux maladies. Cette réponse de résistance systémique aide les plantes à lutter contre divers stress et à maintenir leur santé et leur vigueur (Vacheron et al. 2013). Les PGPM ont été identifiés comme des inducteurs de résistance systémique chez les plantes à travers divers mécanismes, y compris la production de sidérophores, la sécrétion d'antibiotiques, la génération de phytohormones et l'activation de voies de résistance systémique. La capacité des PGPM à produire des sidérophores contribue à leurs effets antagonistes contre les pathogènes et renforce l'induction de la résistance systémique chez les plantes. La résistance systémique induite par les bactéries de la rhizosphère confère une résistance à large spectre, améliorant la capacité des plantes à se défendre contre différents types d'agents pathogènes. Cette résistance a été observée dans une série d'espèces végétales, dont Arabidopsis, le haricot, l'œillet, le concombre, le radis, le tabac et la tomate. Ici, la diversité microbienne en contact avec la plante joue également un rôle clé, car elle offre une variabilité pour "entraîner" le système immunitaire de la plante. En déclenchant une résistance systémique induite, la PGPM peut renforcer les mécanismes de défense de la plante et améliorer sa résistance aux attaques de pathogènes.

Protection contre le stress abiotique

Les micro-organismes protègent également les plantes contre le stress, en particulier dans des conditions environnementales défavorables. En colonisant la rhizosphère et en interagissant avec les racines des plantes, les PGPM peuvent aider les plantes à tolérer des stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinité et la toxicité des métaux lourds. Cette capacité de protection contre le stress renforce la résilience des plantes et assure leur survie dans des environnements difficiles. Il a été démontré que les bactéries rhizosphériques isolées dans des environnements difficiles améliorent la tolérance à la sécheresse chez le blé. Ces bactéries augmentent la production de biomasse et réduisent les émissions de substances volatiles liées au stress, contribuant ainsi à accroître la résistance des plantes à la sécheresse. Le biofilm des bactéries de la rhizosphère, ainsi que le paillis de sol, jouent un rôle protecteur contre le stress de la sécheresse (Timmusk et al. 2014). Par exemple, *Paenibacillus polymyxa* isolé du microbiome rhizosphérique de l'orge sauvage dans le nord d'Israël a démontré sa capacité à améliorer la résilience des plantes aux conditions de sécheresse, soulignant son potentiel pour promouvoir la résistance à la sécheresse dans les cultures. De même, *Stenotrophomonas rhizophila* et d'autres microbes bénéfiques démontrent une forte capacité à coloniser les tissus des racines, ce qui permet aux bactéries d'interagir étroitement avec la plante hôte, facilitant potentiellement l'échange de composés bénéfiques et améliorant la tolérance au stress de la plante. Il a été démontré que *S. rhizophila* présentait une tolérance saline prononcée en produisant des osmo-protecteurs très efficaces tels que le glucosylglycérol, le tréhalose et la spermidine qui favorisent la survie des plantes

dans des conditions environnementales difficiles. Ces agents de protection contre le stress favorisent la croissance des plantes et aident à la protection des racines, contribuant ainsi à améliorer la résilience des plantes face à divers facteurs de stress (Alavi et al. 2013). En résumé, les PGPM utilisent une combinaison de mécanismes, y compris la production d'osmo-protecteurs, l'amélioration de l'adaptabilité environnementale, la colonisation des tissus racinaires, pour protéger les plantes (et leurs racines) contre le stress et promouvoir leur croissance et leur survie dans des environnements difficiles.

1.2. Souches commerciales de PGPM - de la recherche à l'application

Dans le cadre de la recherche, les scientifiques explorent en permanence de nouvelles souches de micro-organismes capables de stimuler la croissance des plantes. Ces souches "de recherche" font l'objet d'une évaluation rigoureuse afin de comprendre leurs mécanismes d'action, leur efficacité dans l'amélioration de la croissance des plantes et leurs applications potentielles dans l'agriculture. En étudiant ces souches, les chercheurs visent à élargir la base de connaissances sur les interactions entre les plantes et les microbes et à développer des stratégies innovantes pour une production agricole durable. Les inoculants à base de PGPM ont donné des résultats prometteurs en matière de réduction des taux d'application d'engrais chimiques et font l'objet d'une évaluation plus poussée en tant qu'éléments des stratégies de gestion intégrée des nutriments (Adesemoye et al. 2009).

Dans l'agriculture commerciale, l'utilisation de souches spécifiques de PGPM a gagné en importance. Ces souches commerciales sont sélectionnées pour leur efficacité à favoriser la croissance des plantes et à améliorer le rendement des cultures. En exploitant les effets bénéfiques de ces micro-organismes, les agriculteurs peuvent améliorer la productivité et la durabilité de leurs pratiques agricoles. Parmi les PGPM les plus utilisés dans le commerce, on trouve *Rhizobia*, *Pseudomonas spp*, *Azotobacter spp*, *Bacillus spp*, *Trichoderma spp*, *Aspergillus spp et Glomus spp*. Ces inoculants microbiens disponibles dans le commerce sont généralement utilisés comme biofertilisants ou produits de renforcement biologique qui contiennent une seule espèce ou plusieurs souches de micro-organismes bénéfiques qui ont été largement étudiés pour leur capacité à promouvoir la croissance des plantes, à améliorer l'absorption des nutriments, à renforcer la tolérance des plantes aux stress et à contribuer à une production agricole durable dans les agroécosystèmes des petits exploitants. Le tableau 1 donne un aperçu des PGPM les plus courants, de leurs mécanismes d'action et des avantages qu'ils offrent aux plantes.

Tab. 1. Micro-organismes communs favorisant la croissance des plantes (PGPM).

Micro-organisme	Mécanismes d'action	Avantages pour les plantes	Exemple
Rhizobactéries	• Production de phytohormones • Solubilisation des nutriments (par exemple, le phosphore) • Induction d'une résistance systémique	• Amélioration de la croissance et du développement des plantes • Meilleure absorption des nutriments • Résistance accrue aux agents pathogènes	*Bacillus subtilis* produit des phytohormones comme les auxines, solubilise des nutriments tels que le phosphore et induit une résistance systémique chez les plantes.
Bactéries endophytes	• Établissement d'associations étroites avec les plantes • Production de substances stimulant la croissance	• Amélioration de la croissance des plantes • Protection contre les maladies et les stress	*Pseudomonas fluorescens* établit des relations symbiotiques avec les plantes, sécrète des substances favorisant la croissance, comme l'acide indole acétique (IAA), et contribue à l'absorption des nutriments.
Champignons mycorhiziens (arbusculaires)	• Facilitation de l'absorption des nutriments, en particulier du phosphore • Amélioration de la tolérance des plantes aux stress	• Amélioration de l'acquisition des nutriments • Augmentation de la résistance des plantes aux défis environnementaux	*Rhizophagus irregularis* (anciennement *Glomus intraradices*) forme des associations mycorhiziennes à arbuscules avec les racines des plantes, facilitant l'absorption du phosphore et améliorant la tolérance aux stress.

2. Exploitation des pré-, pro- et postbiotiques pour favoriser la croissance des plantes et améliorer la fertilité et la santé des sols

Au cours des 20 à 30 dernières années, un grand nombre de PGPM ont été isolés, caractérisés et testés en tant que biofertilisants et agents de biocontrôle dans des conditions contrôlées et naturelles. Les résultats ont confirmé l'effet bénéfique des micro-organismes sélectionnés sur la croissance et la santé des plantes, l'augmentation de la teneur en éléments nutritifs et l'amélioration des propriétés du sol, comme indiqué dans la section précédente. Aujourd'hui, l'activité scientifique dans le domaine des inoculants microbiens se concentre sur le développement de formulations microbiennes efficaces et respectueuses de l'environnement et sur l'analyse de la manière dont les micro-organismes introduits affectent la communauté microbienne, la diversité et les interactions spécifiques entre les plantes et les micro-organismes.

Dans ce cadre, le projet EXCALIBUR[1] a abordé la biodiversité sous différents angles en se concentrant sur la santé des sols dans l'horticulture, renforçant ainsi les secteurs transversaux pour intégrer les humains, les sols, les plantes et les écosystèmes vers une approche "One Health" (une seule santé). Compte tenu de la complexité du système pédologique, nous sommes allés au-delà de la vision simplifiée des interactions individuelles plante-microbe ou sol-plante et avons examiné les facteurs clés qui influencent cet écosystème complexe, notamment la plante, le sol et les organismes du sol en tant que "méta-organisme" unique capable de servir de médiateur et d'influencer les divers échanges (flux) qui contribuent à la santé et à la productivité de la plante. Une combinaison de pré-, pro- et postbiotiques a donc été appliquée pour gérer et stimuler le microbiome bénéfique du sol. En bref, nous avons favorisé "artificiellement" les fonctions biologiques et la diversité du sol en intégrant des pratiques de gestion avec des formulations nouvellement développées contenant des bio-inocula microbiens bénéfiques ("approche probiotique") et des bio-effecteurs ("approche prébiotique"), afin de comprendre comment ils affectent la productivité des cultures, la biodiversité et la fertilité du sol. L'approche prébiotique vise à améliorer la capacité des plantes à exploiter la biodiversité environnante en stimulant le microbiote du sol et les endophytes, tandis que l'approche probiotique introduit des micro-organismes bénéfiques dans le sol ou les cultures afin d'améliorer la nutrition ou la protection des plantes. EXCALIBUR a relevé ce défi par une approche systémique, en évaluant : (i) comment les systèmes de culture affectent la biodiversité du sol et sa dynamique ; (ii) comment la biodiversité indigène influence l'efficacité des nouveaux bioproduits, en particulier en termes de nutrition et de protection des plantes ; (iii) comment les stratégies de gestion des cultures impliquant des bio-inocula peuvent être améliorées pour assurer des avantages cohérents aux producteurs au niveau de l'exploitation et une protection pertinente de la biodiversité au niveau régional/territorial.

La mise en œuvre d'une stratégie intégrant des prébiotiques, des probiotiques et des postbiotiques peut présenter plusieurs avantages pour la croissance des plantes et la fertilité des sols. Les prébiotiques et les postbiotiques améliorent la disponibilité des nutriments pour les plantes, suppriment les maladies, renforcent la structure du sol et la tolérance au stress. Dans l'ensemble, ils contribuent à une agriculture durable en favorisant un microbiome du sol sain, en réduisant la dépendance aux engrais chimiques et aux pesticides, et en améliorant la résistance des plantes aux stress environnementaux. Toutefois, il est essentiel de tenir compte de facteurs tels que la compatibilité microbienne, les méthodes d'application et les

[1] https://cordis.europa.eu/project/id/817946

conditions environnementales lors de la mise en œuvre de stratégies prébiotiques, probiotiques et postbiotiques dans l'agriculture. Des recherches continues sont nécessaires pour optimiser ces approches et comprendre leurs effets à long terme sur la santé des sols et la productivité des plantes.

2.1. Comment sélectionner les prébiotiques, probiotiques ou postbiotiques bénéfiques pour les plantes ?

Sur la base des considérations ci-dessus, trois stratégies de gestion microbienne des systèmes sol-plante pourraient être sélectionnées sur la base des prébiotiques, des probiotiques et des postbiotiques (Fig. 3.2.).

Prébiotiques

Les prébiotiques sont des produits qui améliorent la diversité microbienne et la santé des sols en favorisant la croissance des micro-organismes déjà présents dans le système sol-plante. Les prébiotiques sont des produits naturels, généralement des déchets agro-industriels, y compris le biochar, les boues d'épuration, le compost, l'humus, le fumier animal et les déchets contenant de la chitine, entre autres, qui améliorent (en particulier dans les sols dégradés) la structure du sol, l'activité biochimique et augmentent la population et la diversité microbiennes. Le compost et le fumier animal peuvent toutefois être considérés comme des produits dits "*symbiotiques*", car ils contiennent des micro-organismes (dont certains ont des propriétés bénéfiques). Les inoculants issus de la fermentation en milieu solide peuvent également être définis comme des symbiotes, car il s'agit de mélanges multifonctionnels de matière organique minéralisée (avec des fonctions prébiotiques et de support) et de micro-organismes bénéfiques pour les plantes (avec des fonctions probiotiques de promotion de la croissance des plantes ou de biocontrôle) (Vassileva et al. 2020). Par exemple, lorsque le micro-organisme probiotique est un agent de solubilisation du P, le mélange symbiotique pourrait en outre être enrichi en P disponible pour les plantes. Des caractéristiques symbiotiques similaires ont été observées dans des inoculants microbiens encapsulés dans des gels naturels en présence d'additifs ayant une action stimulante sur les microbes bénéfiques.

Probiotiques

Les probiotiques sont généralement considérés comme des micro-organismes bénéfiques qui exercent des propriétés de promotion de la santé et de mobilisation des nutriments. Une fois introduits dans le sol, les probiotiques doivent développer un niveau de biomasse critique pour exercer leurs effets bénéfiques sur les plantes. Les bactéries présentant une activité enzymatique élevée (ACC-déaminase), une production de phytohormones (auxines, cytokinines, gibbérellines) et de métabolites osmotiques (par exemple, tréhalose, glycine-bétaïne) sont particulièrement intéressantes. Comme la croissance microbienne dépend des caractéristiques du sol et de la plante et des conditions environnementales, il semble difficile pour un seul micro-organisme ou un consortium microbien d'atteindre les nombres critiques de cellules nécessaires. Par conséquent, après une longue période d'études sur l'isolement, la sélection et la caractérisation des PGPM, les chercheurs se concentrent sur le développement de processus biotechnologiques économiques pour la production et la formulation de biomasse/spores qui garantiront la survie et la croissance de l'inoculum. L'une des techniques de formulation les plus prometteuses est l'encapsulation dans des macro- et microbilles de polysaccharides qui garantit une distribution continue de l'inoculant dans le sol en empêchant l'effet des facteurs de stress du sol et de l'environnement, y compris la communauté microbienne indigène. Des inoculants doubles/multiples combinés à des biostimulants et à d'autres additifs, y compris des semences

(bio-formules intelligentes tout-en-un) devraient être développés pour compléter les engrais chimiques traditionnels. Une autre option, pour éviter les problèmes à chaque phase de la production, de la formulation, du stockage et de l'établissement/action des PGPM dans le sol, est d'utiliser leurs métabolites bénéfiques pour les plantes (postbiotiques).

Postbiotiques

Les postbiotiques sont des sous-produits métaboliques ou des substances produites par les PGPM, qui exercent des effets spécifiques de promotion de la croissance et/ou de biocontrôle sur les plantes, évitant ainsi les risques associés à l'application de cellules microbiennes. Parmi les exemples spécifiques de ces métabolites figurent les phytohormones, les substances volatiles et les composés de détection du quorum. Quels sont les risques liés à l'utilisation de micro-organismes dans les systèmes sol-plante ? Des procédures de formulation erronées sans osmo-protecteurs, sans protecteurs UV, sans charges à valeur nutritive et sans autres additifs bénéfiques pour les plantes peuvent entraîner des résultats incohérents dans les conditions de terrain. D'autres risques sont liés à divers facteurs abiotiques et biotiques qui affectent le taux de colonisation microbienne, la présence d'autres composants plus compétents de la population microbienne, le niveau des besoins de la plante et sa capacité à attirer et à nourrir les micro-organismes bénéfiques. Il est important de noter que les protocoles d'application des PMP sur le terrain ne garantissent pas qu'ils trouveront leur niche d'implantation et de fonctionnement. En outre, on ne sait pas encore exactement quel type de métabolites les micro-organismes introduits libéreront dans le système sol-plante. Cet ensemble complexe de conditions détermine le taux de survie des inoculants et la performance de leurs fonctions cibles (Kaminsky et al. 2019). En analysant tous ces aspects, il apparaît que les micro-organismes endophytes sont mieux protégés contre les conditions environnementales défavorables et, en outre, plus efficaces sur le plan fonctionnel.

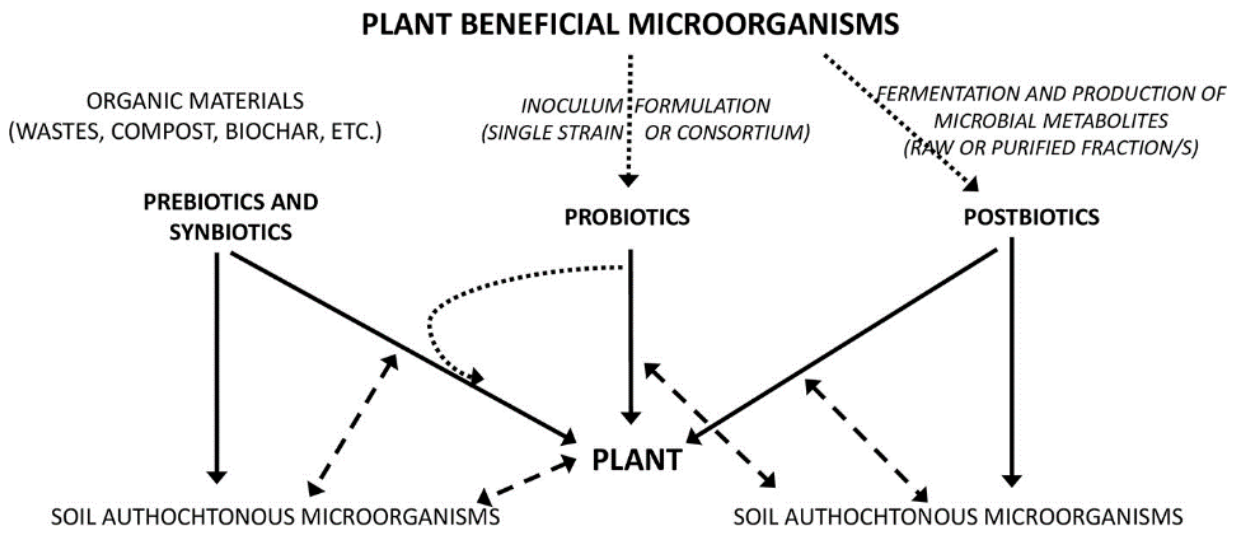

Fig. 3.2. - Diagramme montrant les trois stratégies de gestion microbienne du sol et des plantes basées sur des approches prébiotiques, probiotiques et postbiotiques. Les lignes pleines indiquent l'effet direct, les lignes discontinues indiquent les interactions, les lignes en pointillé les processus de formulation/production (source : Vassileva et al. 2020).

3. Aspects pratiques de l'application correcte des micro-organismes favorisant la croissance des plantes

Les micro-organismes étant des êtres vivants, le produit qui en est issu doit être appliqué correctement pour maintenir les organismes en vie. De nombreux aspects cruciaux influencent la survie et l'efficacité des inoculums bactériens et fongiques, mais il existe quelques règles générales :

1. Les conditions de stockage appropriées - l'exposition des préparations à des températures élevées ou basses, à une forte lumière ou à l'humidité - peuvent rapidement diminuer le nombre de cellules viables dans le produit.
2. L'utilisation dépend du type de micro-organisme - certains micro-organismes bénéfiques comme les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) doivent être appliqués directement dans le sol, de préférence près de la zone racinaire, tandis que les autres, qui agissent comme des agents de contrôle biologique par contact direct ou des endophytes, peuvent être pulvérisés sur les feuilles ou d'autres parties des plantes.
3. Les conditions météorologiques doivent être propices à l'utilisation des micro-organismes - l'application des produits contenant des micro-organismes doit être similaire à l'utilisation des produits phytopharmaceutiques (éviter les températures trop élevées ou trop basses, la pluie, etc.)
4. Certaines pratiques agrotechniques peuvent diminuer l'efficacité des inocula microbiens - par exemple, la fertilisation, en particulier avec du phosphore, inhibe la croissance des CMA ; l'application simultanée de produits phytopharmaceutiques et de micro-organismes bénéfiques peut détruire une partie ou la totalité des microbes.
5. Contrairement aux produits de protection chimique ou aux engrais, les produits à base de micro-organismes n'agissent pas rapidement et doivent être utilisés à titre préventif. En outre, les agents de lutte biologique n'agissent pas comme des fongicides systémiques et ne peuvent donc pas être utilisés pour "éliminer" les agents pathogènes des plantes.

Les méthodes de traitement peuvent être divisées en fonction de l'objectif, c'est-à-dire : application par pulvérisation, traitement du sol ou traitement des semences. En outre, dans certains cas, le traitement sera différent selon qu'il s'agit d'une culture en plein champ ou d'une culture sous serre.

L'application par pulvérisation est principalement utilisée pour traiter les parties aériennes des plantes. En raison des conditions difficiles liées à l'exposition des plantes à la lumière du soleil, au manque de sources de nutriments et au dessèchement, les traitements doivent être répétés plusieurs fois au cours de la saison végétative. Les bactéries endophytes, par exemple du genre *Methylobacterium*, font exception à cette règle. Il est également possible d'appliquer un inocula à la surface du sol pour l'enrichir en micro-organismes bénéfiques. Toutefois, cette méthode risque d'être inefficace, car les microbes ont du mal à pénétrer dans le sol et/ou à atteindre la zone racinaire. L'avantage de la méthode de pulvérisation est qu'elle est facile à mettre en œuvre à l'aide de machines agricoles courantes. Cependant, il existe des restrictions quant à l'utilisation de cette méthode. Une circulation prolongée et intensive du liquide dans le système de pulvérisation induit la mort des cellules bactériennes en raison de dommages mécaniques (Doruchowski et al. 2015). En outre, la taille du taux d'aérosolisation (un taux de survie plus faible a été associé à des gouttelettes plus petites), la température (le taux de survie le plus élevé a été observé à 12°C) et l'humidité

relative (le taux d'humidité optimal était de 70-80%) peuvent avoir un impact sur la survie des cellules bactériennes. (Marthi et al. 1990).

Le traitement des semences a pour but d'inoculer des micro-organismes symbiotiques aux plantes, de les protéger contre les agents pathogènes ou d'accélérer la germination des semences. Il existe plusieurs méthodes de traitement des semences, mais en général, cette méthode consiste à enrober les semences d'un inoculum mélangé à des agents liants et éventuellement à des protecteurs de cellules. Elle est couramment utilisée pour inoculer des plantes avec des champignons mycorhiziens à arbuscules ou des légumineuses avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote comme *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Les semences peuvent également être traitées avec des agents de contrôle biologique tels que *Trichoderma* spp ou *Bacillus* spp afin de réduire le risque d'infestation par des agents pathogènes des plantes. Outre l'inoculation des semences, la même technique peut être utilisée pour traiter les jeunes plants lors du rempotage ou avant la plantation. L'avantage du traitement des semences ou des plantules avec des bactéries ou des champignons symbiotiques est que l'inoculation n'est généralement effectuée qu'une seule fois et que, dans la plupart des cas, le traitement des semences peut être réalisé à l'aide d'une machine simple. En revanche, le traitement des semis est plus compliqué, car les jeunes plantes sont fragiles et nécessitent une main-d'œuvre humaine ou un équipement spécialisé.

L'application au sol est utilisée pour appliquer les microbes bénéfiques directement dans la zone racinaire des plantes ou dans le sol. Une autre méthode consiste à mélanger les micro-organismes au substrat de culture pour l'enrichir en bactéries ou en champignons bénéfiques (plus couramment en serre) avant de planter les plantes ou les graines. L'application de micro-organismes dans le sol en vrac (avec des engrais spéciaux ou sous forme de préparation microbienne) pourrait être réalisée facilement à l'aide de machines agricoles courantes. Toutefois, en raison de limitations économiques, le dosage des préparations commerciales, selon la formulation, s'élève généralement à plusieurs kilogrammes ou litres par hectare. Par conséquent, le ratio de micro-organismes appliqués par cm^3 de sol est faible, car l'inoculum est réparti sur toute la surface du champ (donc là où il y a des plantes et là où il n'y en a pas). En revanche, l'incorporation directe de l'inoculum dans la zone racinaire permet une concentration plus élevée de microbes à l'endroit où ils peuvent influencer les racines ou affecter le microbiome de la rhizosphère. Avec une concentration plus élevée, les microorganismes introduits ont une plus grande chance de succès dans le sol. Par exemple, dans le projet EXCALIBUR, l'agent de contrôle biologique *à base de Trichoderma* a été appliqué dans les trous de plantation juste avant de planter les semis. Après la saison végétative, la population de champignons dans le sol traité était dominée par le champignon introduit (Fig. 3.3.). Cependant, cette méthode est difficile à mettre en œuvre sur des plantes déjà en place et demande beaucoup de travail et de temps lors de l'application de micro-organismes sur des semis repiqués. Les micro-organismes les plus couramment utilisés dans l'application au sol sont les CMA, les bactéries fixatrices d'azote, les solubilisateurs de phosphore et les agents de contrôle biologique.

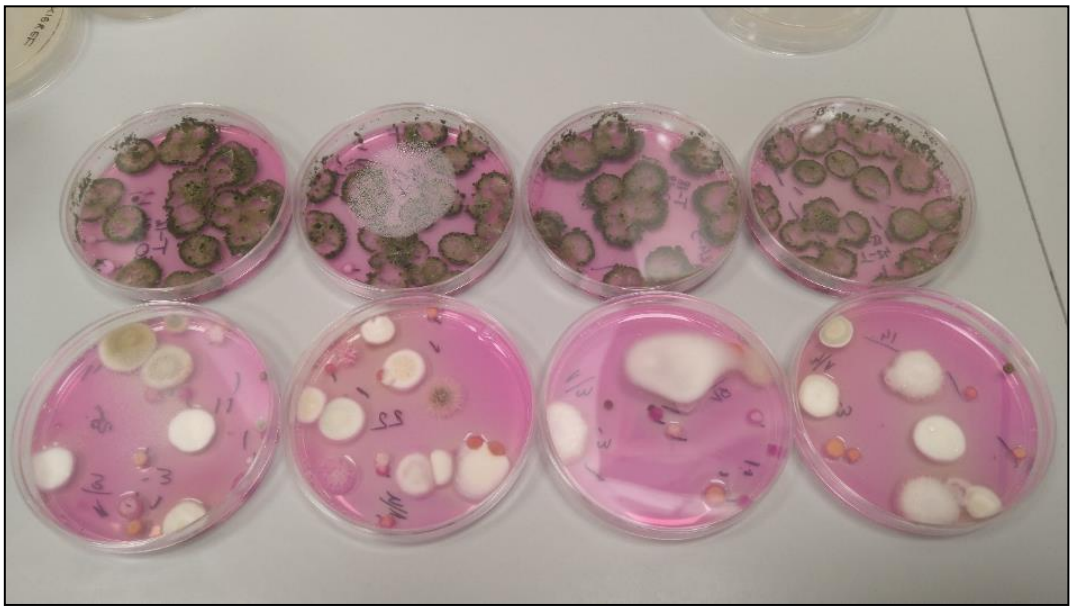

Fig. 3.3. Comparaison des populations fongiques dans le sol traité avec Trichoderma *(rangée supérieure de boîtes de Petri) et dans le sol témoin non traité (rangée inférieure de boîtes de Petri). Les colonies vertes appartiennent au genre* Trichoderma*.*
Auteur : Paweł Trzciński.

Un autre type d'application au sol est l'introduction de micro-organismes par le biais de systèmes de fertigation. Cette méthode est facile à mettre en œuvre car les micro-organismes sont introduits dans les plantes avec l'eau d'irrigation. Elle présente toutefois l'inconvénient de n'utiliser que des préparations solubles dans l'eau et de nécessiter, après chaque application, un rinçage à l'eau de tous les éléments du système d'irrigation afin de les débarrasser des résidus de l'inoculum. De plus, les produits microbiens, outre les bactéries ou les champignons, contiennent des supports ou des agents de charge qui peuvent souvent être utilisés par les micro-organismes comme source de nourriture et d'énergie. Par conséquent, certaines parties du système d'irrigation, en particulier les goutteurs, peuvent être obstruées par la biomasse. Les micro-organismes les plus courants trouvés dans les goutteurs bouchés sont des champignons du genre *Trichoderma* (Boari et al. 2008 ; Trzcinski et al. 2013).

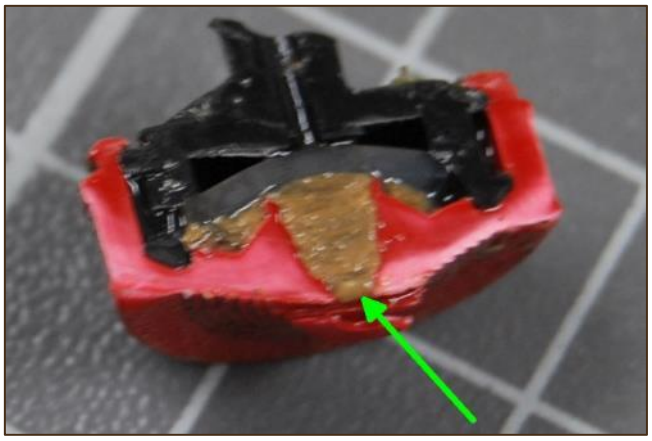

Fig 3.4. Emetteur de goutte à goutte obstrué par de la biomasse fongique.
Auteur : Paweł Trzciński.

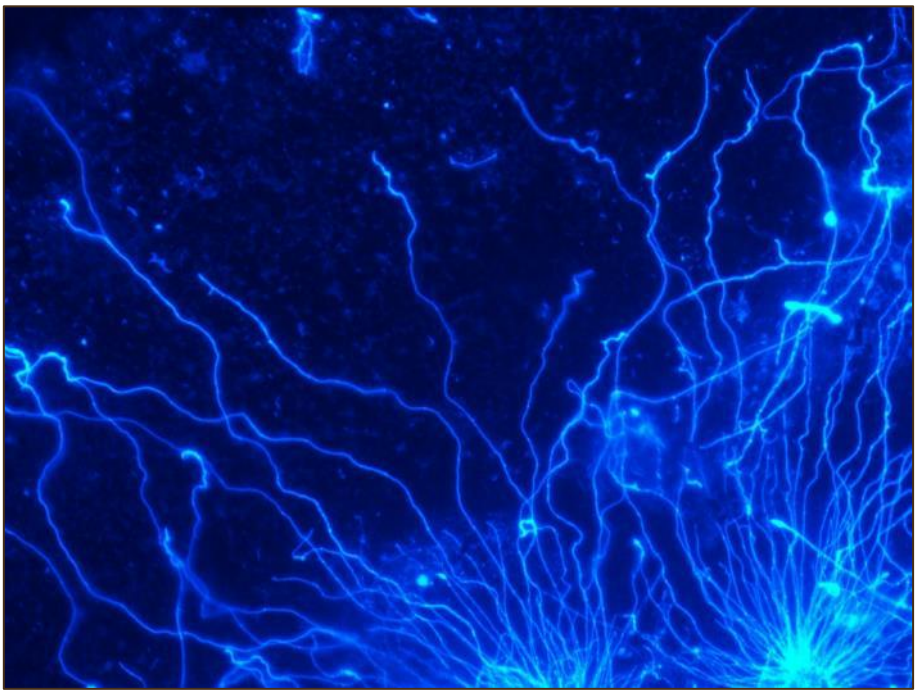

Fig 3.5a. Champignons se développant sur la surface intérieure du goutteur. La préparation a été colorée à l'aide de KOH et de blanc de calcofluor et observée sur un microscope équipé d'une lumière UV.
Auteur : Paweł Trzciński.

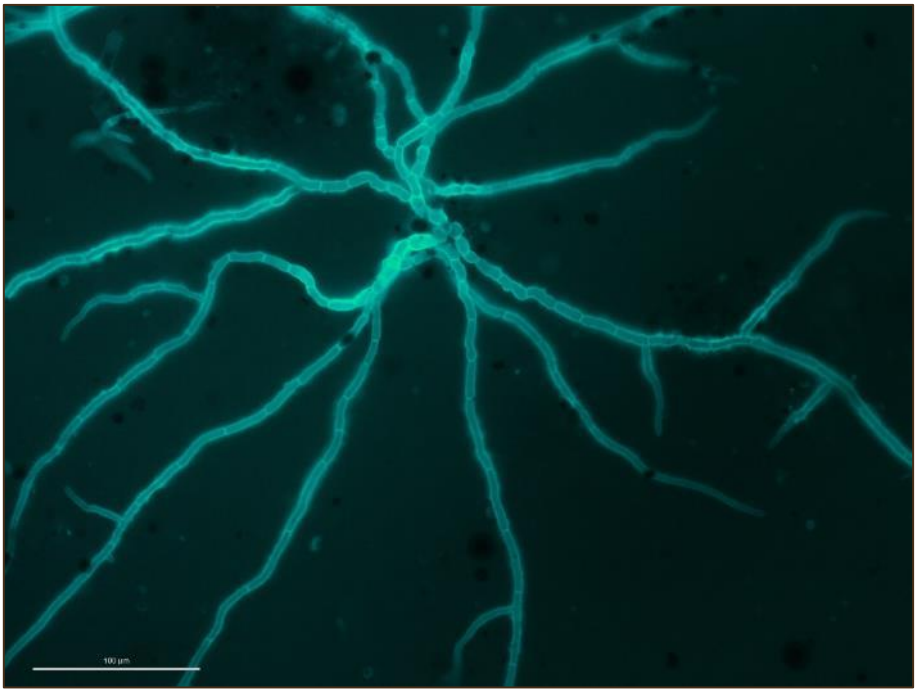

Fig 3.5b. Champignons se développant sur la membrane du goutteur. La préparation a été colorée à l'aide de KOH et de blanc de calcofluor et observée sur un microscope équipé d'une lumière UV.
Auteur : Paweł Trzciński.

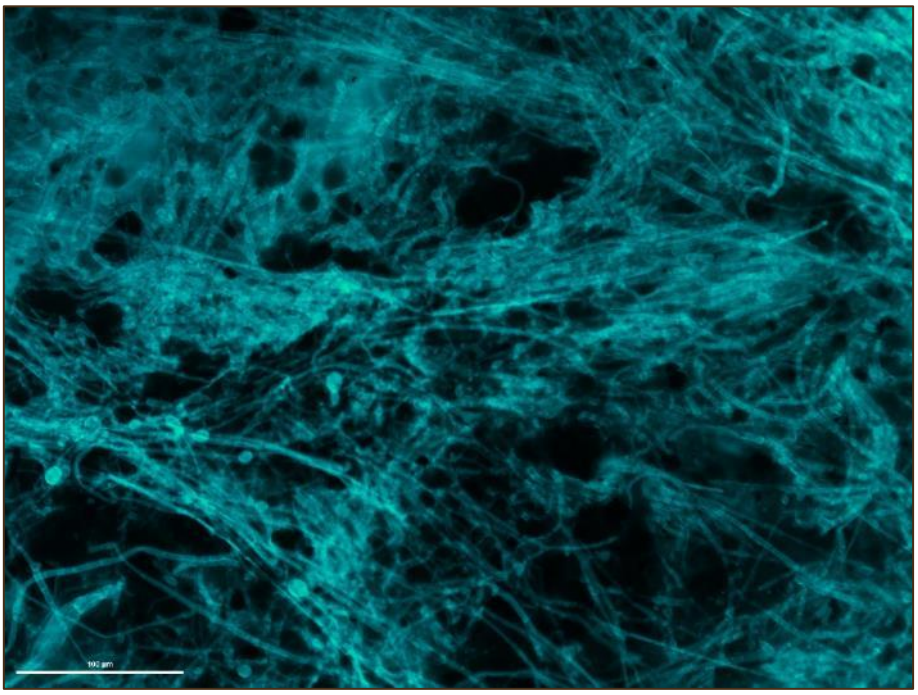

Fig. 3.6. Structure de la biomasse fongique prélevée sur un goutteur bouché. La préparation a été colorée à l'aide de KOH et de blanc de calcofluor et observée sur un microscope équipé d'une lumière UV.
Auteur : Paweł Trzciński.

Références

Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. 2009. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. Microbial Ecology, 58(4), 921–929.

Alavi P., Starcher M. R., Zachow C., Müller H., Berg G. 2013. Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) Stenotrophomonas rhizophila DSM14405T. Frontiers in plant science, 4, 141.

Boari A., Zuccari D., Vurro M. 2008. 'Microbigation': Delivery of biological control agents through drip irrigation systems. Irrigation Science, 26(2), 101–107.

Doruchowski G., Świechowski W., Trzciński P., Sas-Paszt L., Hołownicki R. 2015. Effect of spray application parameters on viability of rhizobacteria used as bio-pesticides in organic fruit production. 448, 60–61.

Glick B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica, 2012, 1–15.

Kaminsky L. M., Trexler R. V., Malik R. J., Hockett K. L., Bell, T. H. 2019. The inherent conflicts in developing soil microbial inoculants. Trends in Biotechnology, 37(2), 140-151.

Marthi B., Fieland V. P., Walter M., Seidler R. J. 1990. Survival of bacteria during aerosolization. Applied and Environmental Microbiology, 56(11), 3463–3467.

Souza R.D., Ambrosini, A., Passaglia L.M.P. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetics and Molecular Biology, 38(4), 401–419.

Timmusk S., Abd El-Daim I. A., Copolovici L., Tanilas T., Kännaste A., Behers L., Nevo E., Seisenbaeva G., Stenström E., Niinemets Ü. 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. PLOS ONE, 9(5), e96086.

Trzcinski P., Sas-Paszt L., Treder W. 2013. Mikrobiologiczne przyczyny zapychania się kroplowników. Hasło Ogrodnicze, 02.

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moënne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Frontiers in Plant Science, 4, 356.

Vassileva M., Flor-Peregrin E., Malusá E., Vassilev N. 2020. Towards Better Understanding of the Interactions and Efficient Application of Plant Beneficial Prebiotics, Probiotics, Postbiotics and Synbiotics. Frontiers in Plant Science, 11, 1068.

Chapitre 4. Technologie de production de produits microbiologiques

Katarzyna Góralska[1], Magdalena Jopek[1], Anna Gierut-Kot[1], Jakub Drewniak[1], Roksana Rakoczy-Lelek[1], Maria Bylica[1], Radosław Wilk[1]

[1]INTERMAG sp. z o.o., Al. 1000-lecia 15G, 32-300 Olkusz, POLOGNE

L'objectif de ce chapitre est de présenter le domaine fascinant de la technologie microbienne, qui non seulement transforme la façon dont nous considérons les micro-organismes, mais peut également avoir un impact révolutionnaire sur notre réalité quotidienne. En comprenant et en faisant progresser ce domaine, nous pouvons ouvrir la voie à des découvertes, à des produits innovants et à la durabilité à l'échelle mondiale.

1. Types de formulation (dans un contexte pratique -lesquels utilisons-nouset pourquoi ?).

Dans la conception et le développement de produits microbiologiques ayant des propriétés bénéfiques pour les plantes, les points clés pour obtenir un bon produit final sont les suivants (Vassileva et al. 2021) :

1. isolement et caractérisation d'une souche microbienne efficace ;
2. le développement d'un processus de fermentation efficace pour la production de biomasse et/ou de spores ;
3. une procédure de formulation efficace

L'aspect le moins étudié, mais qui a un impact décisif, est la sélection de la technique de formulation adéquate pour garantir l'efficacité et la stabilité maximales du produit dans les systèmes sol-plante. Parmi les formulations disponibles sur le marché, les produits liquides et solides dominent (Ibañez et al., 2023). Le choix de la procédure de formulation est lié au mode de fermentation - c'est le processus technologique qui produit finalement la biomasse/les spores qui doit être formulé. Par exemple, certaines entreprises produisent des produits de biocontrôle contenant des spores par fermentation à l'état solide, tandis que d'autres préfèrent des produits contenant des cellules dans un liquide par fermentation submergée.

Les formulations liquides sont basées sur des solutions aqueuses, des solutions huileuses ou des émulsions huile dans eau, avec une utilisation moins fréquente de polymères. Les micro-organismes présents dans les solutions liquides nécessitent souvent des additifs tels que des solutions nutritives contenant des nutriments de base ou des substances qui stabilisent l'ensemble de la formulation (Chaudhary et al. 2020). Inversement, des matériaux porteurs doivent être utilisés pour favoriser la persistance des micro-organismes dans le cas de produits à écoulement libre. Ces matériaux doivent être neutres pour l'environnement et se caractériser par une structure poreuse spécifique qui retient les cellules et les spores. Des matériaux tels que la tourbe, le talc, la lignite, la kaolinite et la zéolite sont des supports couramment utilisés. À INTERMAG, nous utilisons des bactéries pour former des formulations en vrac, obtenues par séchage de la biomasse à basse température et à basse pression (lyophilisation). Il convient de mentionner que les supports utilisés dans les formulations en vrac augmentent le taux de survie des bactéries, les protégeant des changements de teneur en humidité et augmentant le volume du produit, ce qui entraîne une dispersion uniforme des micro-organismes pendant l'application (Singleton et al. 2022), augmentant ainsi leur développement et leur efficacité dans les systèmes sol-plante.

Les formulations liquides et fluides ont leurs propres caractéristiques uniques qui doivent être prises en compte lors de la production d'un produit microbien. Ce qui n'est pas abordé dans les travaux scientifiques, c'est que la forme liquide des produits permet une préparation plus accessible et plus rapide du liquide de travail pour l'application. En outre, elle ne nécessite pas la préparation préalable d'une boue, comme c'est le cas pour les formules à écoulement libre. Un autre avantage important est que les formulations liquides présentent une meilleure miscibilité avec d'autres produits agrochimiques, ce qui réduit le risque de bouchage des buses lors de la pulvérisation. D'un point de vue pratique, la réduction du risque de bouchage des buses et la possibilité de mélanger avec d'autres formulations augmentent la flexibilité et l'efficacité de l'application. Il convient de noter que les formulations liquides peuvent être plus sensibles aux conditions de stockage qui peuvent affecter la dégradation ou l'oxydation des composants de la formulation.

Les emballages ont tendance à être plus grands et la concentration de micro-organismes en solution est inférieure à celle des formulations en vrac. La forte concentration de micro-organismes dans les produits à écoulement libre permet d'utiliser des emballages plus petits, ce qui les rend plus légers et plus faciles à transporter et à stocker. Cependant, l'application de ces produits est potentiellement plus difficile. La nécessité de disperser uniformément la poudre dans le liquide de travail et le risque de précipitation des fractions insolubles pendant l'application impliquent une plus grande implication lors de la préparation de la solution. Il convient de mentionner que les formulations à écoulement libre présentent une plus grande stabilité sur une période de stockage plus longue, ce qui leur confère une durée de conservation plus longue.

Tous les types de formulations contenant des micro-organismes destinés à être commercialisés doivent être testés quant à leur stabilité dans le temps et à la température et quant à leur compatibilité avec d'autres produits agrochimiques lorsque l'on recommande une utilisation combinée. D'un point de vue industriel, l'introduction de plusieurs types de produits agrochimiques dans un seul mélange en cuve qui n'a pas été préalablement testé pour une utilisation combinée peut entraîner des interactions négatives entre les micro-organismes et les ingrédients actifs contenus dans les différents types de formulations, ce qui peut entraîner une perte d'efficacité biologique d'un tel mélange en cuve. Le mélange en réservoir préparé pour les essais avec la formulation microbienne testée doit également être stable pendant au moins 4 heures. Dans les essais de compatibilité en mélanges, l'abondance et la survie des micro-organismes sont déterminées à intervalles réguliers.

Dans notre travail, lorsque nous développons un nouveau produit, nous essayons d'établir un contrôle de qualité rigoureux concernant la formulation et les tests d'efficacité sur une espèce de culture donnée, ainsi que l'impact sur l'environnement et la phytotoxicité éventuelle de doses supérieures à la normale. En conséquence, notre intention est de développer de nouveaux produits formulés, qui devraient être stables et adaptés après un stockage d'au moins 12 mois.

2. Technologie de fabrication de produits microbiens

Dans le monde dynamique d'aujourd'hui, la technologie de fabrication de produits microbiens est une industrie fascinante qui révolutionne de nombreux domaines, de l'agriculture et de la médecine à la protection de l'environnement. Les micro-organismes, tels que les bactéries et les champignons, deviennent des objets de recherche intensive et une source de solutions innovantes et de produits modernes.

La technologie microbienne est basée sur l'utilisation de micro-organismes pour produire une variété de substances, des enzymes et antibiotiques aux préparations agricoles spécialisées (Kuila et Sharma 2018). Il existe une interaction étroite entre la science biologique, la chimie, l'ingénierie des procédés et les aspects pratiques de la production industrielle. Les micro-organismes jouent un rôle clé dans cette technologie, agissant comme des usines biologiques capables de synthétiser divers composés chimiques. Les micro-organismes sont adaptés pour produire les substances souhaitées par fermentation ou par modification génétique, ce qui ouvre de nouvelles possibilités de production industrielle et agricole. La technologie de production de produits microbiens est applicable dans un large éventail de domaines. En agriculture, les micro-organismes produisent des métabolites qui améliorent le rendement des cultures, la résistance des plantes et la structure du sol. En médecine, ils sont une source d'antibiotiques et de médicaments biotechnologiques. Dans l'industrie alimentaire, ils produisent des produits fermentés. Dans le domaine de la protection de l'environnement, ils sont utilisés pour traiter les eaux usées et les sols.

Malgré de nombreux avantages, la technologie présente également des défis. L'introduction de solutions innovantes, la gestion de processus complexes et le maintien de pratiques durables sont quelques-unes des questions qui requièrent notre attention. Le développement de techniques modernes de génie génétique microbien ouvre de nouvelles perspectives et soulève des questions éthiques et réglementaires.

2.1. Sélection et isolement des micro-organismes

Les microbes ont colonisé les environnements où ils ont une chance de survivre, ce qui crée un large éventail d'endroits, depuis ceux où les conditions sont optimales pour la plupart des bactéries jusqu'aux endroits extrêmes où vivent des bactéries hautement spécialisées. Les micro-organismes jouent un rôle considérable dans l'environnement. Ils sont responsables de l'encerclement des éléments biogènes dans la biosphère (carbone, azote et phosphore) et de la distribution d'une grande partie des éléments biogènes dans les organismes vivants. L'azote moléculaire est un composant majeur de l'air mais inaccessible aux organismes supérieurs. Grâce à l'activité des micro-organismes, il est converti en composés disponibles pour les plantes. Le nombre d'espèces bactériennes dans un gramme de sol varie de quelques centaines à plus de onze mille (Elander et Chang 1979). La composition quantitative et qualitative de la communauté bactérienne dépend de plusieurs facteurs physicochimiques, ainsi que du type de sol et des espèces végétales qui y vivent, des pratiques agricoles, de la zone géographique, de la teneur en éléments nutritifs, de la salinité et de la contamination environnementale. Ils affectent l'altération des minéraux, contribuant ainsi aux changements dans les processus de formation des sols (Bednarski et Fiedurek 2012). En outre, ils décomposent et minéralisent la matière organique. En renouvelant les composés humiques, elles façonnent et améliorent la structure du sol. Elles préviennent l'érosion et protègent le sol de l'assèchement. Elles facilitent la dépollution des sols en participant à la décomposition des pesticides, des hydrocarbures et des antibiotiques.

La sélection de micro-organismes pour des produits agricoles tels que les engrais, les biostimulants et les produits phytosanitaires est un processus qui vise à sélectionner des souches de micro-organismes ayant des propriétés bénéfiques. La première étape consiste à définir les objectifs à atteindre par le micro-organisme. Il peut s'agir, par exemple, de la capacité à fixer l'azote, à produire des substances qui favorisent la croissance des plantes ou à supprimer les agents pathogènes.

Les étapes de la sélection des micro-organismes bénéfiques sont les suivantes :

- sélection primaire et isolement d'une culture pure,
- la sélection secondaire.

L'isolement primaire des micro-organismes à partir d'environnements spécifiques implique la sélection de micro-organismes présentant les propriétés souhaitées. Leur caractérisation approfondie suit l'isolement des micro-organismes. Leurs propriétés physiologiques, biochimiques et génétiques sont étudiées. Cela permet de déterminer si les micro-organismes possèdent les caractéristiques souhaitées. La sélection secondaire porte sur les isolats présentant la plus forte expression du caractère choisi (Steele et Stowers 1991).

Fig. 4.1. Colonies d'isolats bactériens cultivés sur milieu Tryptone-Soja-Agar (TSA) confirmant la diversité microbienne lors de l'isolement et de la sélection des micro-organismes bénéfiques pour les plantes.
Source : Intermag sp. z o.o.

Les tests de dépistage de l'activité spécifique jouent un rôle majeur dans la sélection de micro-organismes spécifiques. Les tests de laboratoire visant à confirmer les propriétés des micro-organismes comprennent une variété de méthodes et de techniques qui permettent une analyse approfondie de leur morphologie, de leur physiologie, de leur génétique et d'autres caractéristiques.

Fig. 4.2. Exemple d'isolement sélectif de micro-organismes du genre Bacillus *sur des milieux solides. Image de gauche - milieu chromogène pour la différenciation des micro-organismes acidifiants. Image de droite - milieu gélosé au mannitol pour la diversification des sources d'hydrates de carbone pour les bactéries gram-positives.*
Source : Intermag sp. z o.o.

La technique de sélection de base est la méthode d'enrichissement du milieu. Il s'agit de fournir un environnement adapté à la croissance de micro-organismes spécifiques tout en inhibant ou en létalisant les micro-organismes non ciblés. Par exemple, les micro-organismes anaérobies ne survivent pas en présence d'oxygène. La résistance aux métaux lourds, aux antibiotiques, aux oxydants et aux solvants organiques peut

également être appliquée à des environnements sélectifs pour des micro-organismes aux propriétés spécifiques.

Les avancées significatives dans le développement d'outils analytiques influencent considérablement la capacité à cribler des composés spécifiques. L'analyse instrumentale est utile pour le criblage secondaire et primaire lorsque des techniques plus simples ne sont pas disponibles. Des instruments tels que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la spectrométrie de masse (SM), la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et d'autres permettent une détection plus rapide, sélective et très sensible des produits métaboliques. L'utilisation d'outils de biologie moléculaire et de bio-informatique pour vérifier rapidement le potentiel génétique des micro-organismes revêt une importance croissante. L'ensemble spécifique de tests dépend du type de micro-organisme et de l'objectif de l'étude (Olicón-Hernández et al. 2022).

Les micro-organismes prometteurs en laboratoire sont testés sur le terrain. Cela permet d'évaluer leur efficacité dans des conditions agricoles réalistes. Les meilleurs micro-organismes sont sélectionnés en vue d'une nouvelle sélection sur la base des résultats des tests. Ce processus implique la sélection de génotypes présentant des caractéristiques souhaitables et leur reproduction en masse dans des conditions contrôlées.

2.2. Banque

Une fois le micro-organisme identifié et caractérisé, il doit être conservé dans des conditions qui garantissent sa stabilité physiologique, biotechnologique et génétique. Ce processus s'appelle la mise en banque et comprend la conservation des souches sélectionnées isolées en vue d'expériences ultérieures et de leur caractérisation.

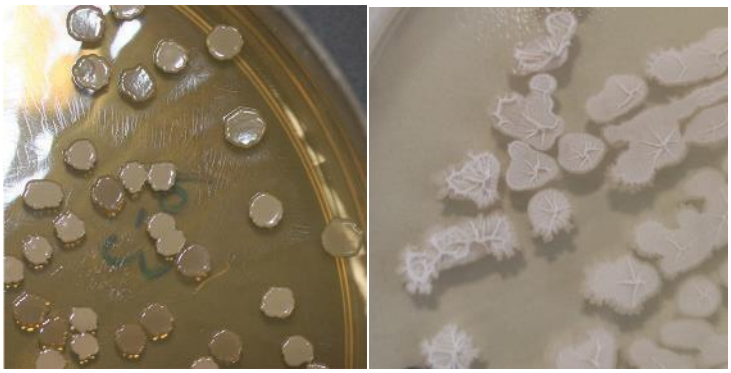

Fig. 4.3. Cultures bactériennes pures isolées à partir d'environnements. Image de gauche Bacillus pumilus*, image de droite* Bacillus subtilis.
Source : Intermag sp. z o.o.

Les isolats sélectionnés sont stockés dans nos propres ressources et/ou dans des institutions externes - des collections (banques) de micro-organismes. Les banques de micro-organismes sont un outil important pour la science, la médecine, l'industrie et l'agriculture. Les nouvelles espèces ou souches aux caractéristiques jusqu'alors inconnues, décrites dans des publications scientifiques, doivent être accessibles à toutes les parties intéressées. Pour des raisons de sécurité, les isolats doivent être conservés par plusieurs moyens alternatifs. Les micro-organismes sont conservés dans la collection à l'état lyophilisé, à l'état surgelé à -80°C

dans de l'azote liquide à des températures allant jusqu'à -195°C, ou dans des conteneurs spéciaux contenant un agent conservateur (Stackebrandt et al. 2014).

Fig. 4.4. Systèmes de conteneurs pour la conservation des micro-organismes à basse température

Chaque culture est soigneusement documentée et contient des informations sur l'espèce, la souche, les conditions de culture, les caractéristiques physiologiques et d'autres données importantes. Les banques microbiennes jouent un rôle crucial dans la préservation des ressources biologiques, contribuent au progrès scientifique et technologique et garantissent la continuité et la reproductibilité de la production de préparations à base de micro-organismes actifs.

2.3. Inoculum

Un inoculum microbien est un terme décrivant une culture microbienne cultivée dans des conditions spécifiques et utilisée pour démarrer un processus de culture à grande échelle. Dans le contexte de la technologie de formulation microbienne pour l'agriculture, l'inoculum joue un rôle clé en tant que source de micro-organismes qui, après un processus de fermentation, seront introduits dans les formulations qui affectent le sol et les plantes. Il sert de point de départ, fournissant le nombre nécessaire de micro-organismes actifs et sains pour avoir un impact positif sur l'environnement agrotechnique. Le processus de production d'inoculum microbien est une étape soigneusement contrôlée. Il commence par la collecte d'une souche active de micro-organismes, qui est ensuite cultivée à plus petite échelle pour former un inoculum. Au cours de ce processus, on veille à ce que les conditions de culture soient adéquates, notamment en ce qui concerne la composition du milieu, la température et l'humidité, afin de garantir la capacité des micro-organismes à se multiplier efficacement. La qualité de l'inoculum est un facteur clé de l'efficacité des préparations microbiennes. Les micro-organismes de l'inoculum doivent être actifs, capables de concurrencer les pathogènes du sol, d'améliorer la disponibilité des nutriments et de favoriser une croissance saine des plantes. Les producteurs veillent à contrôler les paramètres de culture en surveillant la qualité microbiologique et génétique. L'efficacité de l'inoculum microbien en agriculture dépend principalement de sa capacité à s'adapter aux conditions du sol. Les producteurs doivent adapter le processus de culture des micro-organismes pour qu'ils s'habituent aux conditions environnementales spécifiques dans lesquelles ils seront appliqués. Cette adaptation permet aux micro-organismes de mieux coloniser le sol et d'avoir un effet positif sur les plantes.

Une fois que l'inoculum optimal a été obtenu à petite échelle, le processus de production à plus grande'échelle est mis en place. Les bioréacteurs et les fermenteurs cultivent des micro-organismes dans des

conditions contrôlées afin de produire de grandes quantités de micro-organismes actifs prêts à être utilisés dans des formulations agricoles.

L'efficacité finale des préparations microbiennes en agriculture est directement liée à la qualité de l'inoculum. Un inoculum correctement préparé garantit l'apport d'un nombre adéquat de micro-organismes actifs sur le terrain, ce qui se traduit par une biostimulation accrue des plantes, une réduction des agents pathogènes du sol et une amélioration de la santé générale du sol. Le contrôle du processus de production de l'inoculum et de sa composition microbienne est essentiel pour maintenir des normes élevées de qualité et d'efficacité dans la technologie de production des préparations microbiennes pour l'agriculture.

2.4. Les milieux nutritifs

Les milieux nutritifs sont un élément de base dans la technologie des préparations microbiennes pour l'agriculture. Il s'agit de nutriments spécialement ajoutés pour fournir aux micro-organismes les ingrédients nécessaires à leur croissance et à leur activation. Un milieu de croissance ou de culture est une combinaison solide, liquide ou semi-solide de substances destinées à favoriser la croissance des micro-organismes. Lors de la production de formulations microbiennes, un milieu de croissance adéquatement sélectionné est crucial pour la qualité et la productivité des micro-organismes introduits dans l'environnement agricole. La composition des milieux microbiens est adaptée aux exigences des différents micro-organismes cultivés. Ils contiennent généralement des sources de carbone, d'azote, de phosphore, de macro- et micronutriments et d'autres nutriments. En fonction du type de micro-organismes, les solutions nutritives peuvent être ajustées pour maximiser leur croissance et leur activité. La composition optimale de la solution nutritive est cruciale pour obtenir de grandes quantités de cultures microbiennes actives. Dans certains cas, il peut être économiquement intéressant d'utiliser des déchets agro-industriels comme milieu de production (Vassilev et al. 1998).

Fig. 4.5. Milieux microbiologiques couramment utilisés en laboratoire.
Source : Intermag sp. z o.o.

Les milieux microbiologiques jouent un rôle clé dans le processus de culture des micro-organismes à grande échelle. Les fabricants de préparations microbiologiques adaptent soigneusement les milieux aux spécificités des souches cultivées, ce qui permet une croissance rapide et saine des micro-organismes. Ils fournissent les nutriments, la stabilité et l'uniformité des conditions de culture, ce qui est important pour obtenir des préparations efficaces. La composition des milieux de culture influence les caractéristiques des micro-organismes cultivés dans la production de préparations microbiologiques. Des milieux de culture correctement ajustés peuvent affecter la production de métabolites, l'activité enzymatique ou la capacité à

concurrencer les agents pathogènes. Un contrôle minutieux de la composition des solutions nutritives permet à la production d'adapter les micro-organismes à des applications agricoles spécifiques, augmentant ainsi l'efficacité des formulations.

La production de milieux microbiens implique un mélange minutieux et un apport contrôlé de nutriments. Au cours de cette étape, les fabricants doivent veiller à maintenir les bonnes proportions d'ingrédients pour répondre aux exigences des micro-organismes cultivés. Le contrôle de paramètres tels que le pH, la température et la concentration en nutriments est essentiel pour obtenir des conditions de culture optimales.

La qualité finale des préparations microbiennes utilisées en agriculture est étroitement liée à la qualité du milieu microbien utilisé. La composition efficace du milieu affecte positivement la reproduction, l'activité et la viabilité des micro-organismes, ce qui se traduit par l'efficacité de la formulation. Les fabricants contrôlent précisément cet élément du processus, en veillant à ce que le milieu soutienne les caractéristiques attendues des micro-organismes et garantisse l'uniformité du produit final. Pour obtenir des résultats optimaux dans ce domaine, il faut veiller à adapter précisément le milieu aux besoins des micro-organismes cultivés.

2.5. Principaux éléments de la chaîne de production

L'élément clé de toute usine de biotechnologie est le bioréacteur, autour duquel toute l'usine est construite pour produire le produit fini. Selon les besoins, il peut s'agir de mélangeurs, de centrifugeuses, de systèmes de filtration, de sécheurs, de lyophilisateurs, de clarificateurs et de décanteurs.

La plupart des processus biotechnologiques utilisant des micro-organismes visent à les faire passer de leur habitat naturel à une boîte de Petri, puis à des bioréacteurs, également connus sous le nom de fermenteurs. Les bioréacteurs et leurs procédés sont généralement la pièce maîtresse de toute biotechnologie. C'est dans ces bioréacteurs que se produisent la croissance du micro-organisme et la production ou la transformation du produit souhaité. En termes strictement techniques, un bioréacteur est considéré comme : "Un espace clos de toute taille et de toute forme dans lequel il est possible d'échanger de l'énergie, de la chaleur et de la masse avec l'environnement et de provoquer une réaction chimique. Le bioréacteur doit contenir un biocatalyseur pour lequel de telles conditions de fonctionnement sont créées afin d'obtenir l'effet désiré sous la forme d'un déroulement prédéterminé d'une réaction biochimique ou d'une croissance des cellules d'un organisme vivant". (Olicón-Hernández et al. 2022).

Comme indiqué ci-dessus, la définition d'un bioréacteur est très générale, de sorte que les bioréacteurs font l'objet de nombreuses classifications basées sur différents éléments de structure, modes de fonctionnement ou biocatalyseurs. La division la plus générale concerne leur différenciation en termes de mode d'exécution du processus :

- bioréacteurs pour la culture immergée,
- bioréacteurs pour la culture sur milieu solide,
- bioréacteurs pour la culture d'un biocatalyseur immobilisé.

Le type de bioréacteur utilisé pour le processus dépend principalement des exigences de croissance du micro-organisme. Les fermenteurs les plus couramment utilisés sont ceux destinés aux procédés aérobies immergés. Dans ce type de fermenteur, le milieu est à l'état liquide et le biocatalyseur y est en suspension.

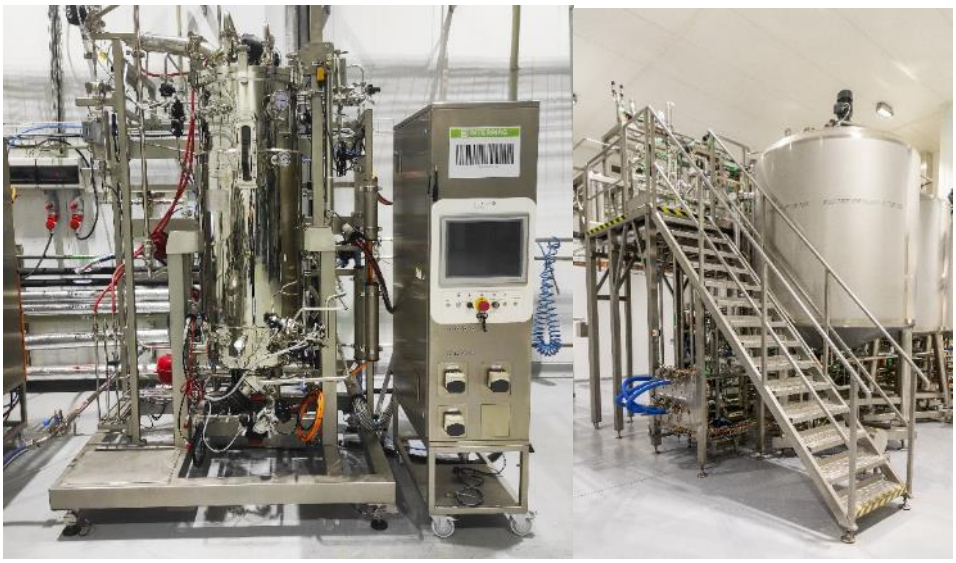

Fig. 4.6. Bioréacteurs pour la production de produits microbiens à INTERMAG.
Source : Intermag sp. z o.o.

Comme indiqué ci-dessus, le bioréacteur est un point essentiel de la plupart des processus de production biotechnologique, et chaque composant ultérieur est sélectionné en fonction du fonctionnement d'un bioréacteur particulier ou de ses assemblages. Une telle installation peut comprendre des mélangeurs pour combiner la biomasse avec des composants de formulation, des membranes de filtration ou des centrifugeuses capables de séparer la biomasse du liquide de culture, des sécheurs ou des lyophilisateurs pour obtenir un produit en vrac, des homogénéisateurs pour libérer le bioproduit de l'intérieur des cellules, et bien d'autres pièces d'équipement souvent développées et construites spécifiquement pour la production d'un produit particulier.

Fig. 4.7. Ligne de production de produits microbiens à INTERMAG.
Source : Intermag sp. z o.o.

2.6. Technologie de production de biopréparation

Une biopréparation peut être : un micro-organisme sous différentes formes, un métabolite, un milieu de post-digestion ou un mélange des trois. Théoriquement, le plus facile à obtenir est un mélange de post-digestion contenant à la fois le micro-organisme et le milieu de post-digestion avec tous les métabolites.

Cette production est basée sur la multiplication du micro-organisme en culture discontinue, c'est-à-dire la préparation du milieu, l'inoculation, la culture et la collecte de la biomasse produite. Dans la pratique, plusieurs problèmes se posent ici, liés à la viabilité du micro-organisme dans le produit fini, à la stabilité des métabolites secondaires constituant les propriétés du produit, au stockage de la biomasse elle-même ainsi que du produit, et surtout à un conditionnement approprié pour éliminer le risque de contamination par une microflore indésirable, pour laquelle la biomasse elle-même peut servir de milieu.

Afin de préserver les propriétés du bioproduit le plus longtemps possible, une température de stockage réduite est utilisée, ce qui fonctionne bien pour les produits à base de bactéries telles que *Rhizobium* spp. ou *Azotobacter* spp. Les produits contenant des bactéries sporulées, par exemple *Bacillus* spp. se caractérisent par une durée de conservation plus longue, précisément en raison de la stabilité de la forme des spores.

Les formulations solides nécessitent un traitement ultérieur de la biomasse post-culture, c'est-à-dire un compactage approprié et l'ajout de substances protectrices et porteuses. Les méthodes les plus courantes pour obtenir des formulations sèches sont la pulvérisation et la lyophilisation. Les deux procédés visent à éliminer l'eau de la biomasse, mais ils le font différemment.

La lyophilisation, également connue sous le nom de séchage par sublimation, est un processus qui se déroule à basse température et sous vide. La préparation du micro-organisme pour le processus de lyophilisation consiste à concentrer la biomasse autant que possible, c'est-à-dire à éliminer l'eau dans un premier temps par filtration ou centrifugation. La biomasse concentrée est ensuite mélangée à un cryoprotecteur, c'est-à-dire une substance censée protéger les cellules du micro-organisme contre la rupture par les cristaux de glace au cours de la première étape de la lyophilisation, c'est-à-dire la congélation jusqu'à -80°C. Les agents protecteurs les plus courants sont la maltodextrine, le saccharose, le lait écrémé en poudre, le tréhalose et le glycérol. Le principal avantage de la lyophilisation est la concentration élevée du produit, qui élimine presque entièrement l'eau et prolonge la durée de conservation du produit. Il s'agit toutefois d'un processus coûteux, ce qui se traduit en fin de compte par un prix plus élevé du produit commercial.

Fig. 4.8. Le lyophilisateur de production d'INTERMAG.
Source : Intermag sp. z o.o.

Le séchage par atomisation est un processus à haute température dans lequel la biomasse est pulvérisée dans de l'air chaud. La préparation de la biomasse, comme pour la lyophilisation, consiste à la compacter pour obtenir la plus grande quantité possible de matière sèche, qui produira les grains appropriés du produit fini dans le séchoir. Le séchage par atomisation est utilisé avec des micro-organismes pouvant être exposés à des températures élevées (principalement des bactéries sporulées, par exemple *Bacillus* spp.) ou des substances stabilisantes appropriées, par exemple des protéines de lactosérum, de la maltodextrine, de l'amidon, des polysaccharides.

Pour les produits basés sur un métabolite spécifique, tels que les facteurs NOD ou les enzymes spécifiques, la culture des micro-organismes doit être effectuée dans des conditions qui orientent le métabolisme du microbe vers la production. Cela peut se faire en modifiant les conditions physiques de la culture ou la composition appropriée du milieu de culture.

2.7. Surveillance et contrôle des variables affectant la croissance microbienne et le qualité

Le contrôle de la culture des micro-organismes est un processus clé dans les laboratoires, l'industrie biotechnologique, la production pharmaceutique et la recherche scientifique. Il s'agit notamment de contrôler les conditions de culture, d'évaluer la croissance microbienne, de suivre la production de métabolites et de maintenir la pureté et la qualité de la culture. Le contrôle de la culture microbienne est essentiel dans la recherche et l'industrie pour assurer le contrôle des processus, optimiser les performances et produire des résultats cohérents. Dans le domaine de la biotechnologie industrielle, la culture microbienne est une étape fondamentale dans la production d'une variété de substances, des médicaments aux produits agricoles. Pour garantir des conditions de croissance optimales, il est nécessaire de surveiller étroitement les variables affectant les micro-organismes. Ce processus implique le contrôle des paramètres environnementaux, de la densité de culture, de la production de métabolites et de la pureté de la culture.

Un diagramme bien connu de la croissance des micro-organismes pendant la culture stationnaire est connu sous le nom de culture discontinue. La courbe de croissance d'un micro-organisme, ainsi que la production d'un produit biotechnologique, comporte quatre étapes caractéristiques :

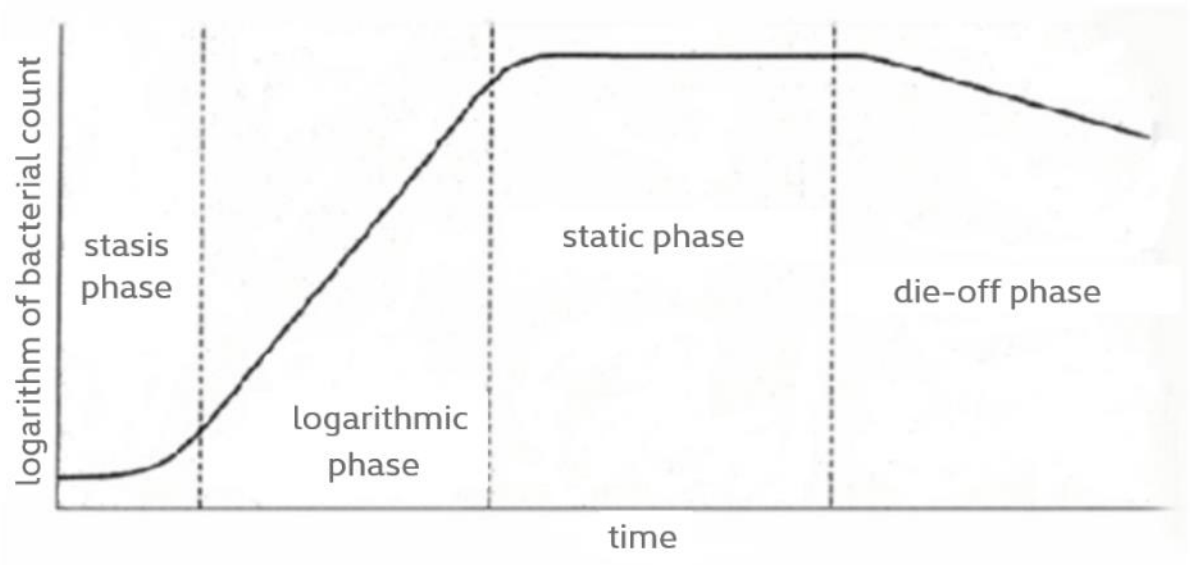

Fig. 4.9. Courbe de croissance de la culture en discontinue
Source : Schlegel 2004

1. La phase de latence est la période pendant laquelle le micro-organisme s'adapte au nouvel environnement de culture et commence sa croissance ;
2. La phase de croissance exponentielle dépend de la disponibilité des nutriments et de l'accumulation de métabolites qui limitent la croissance de la culture, comme c'est le cas pour la fermentation alcoolique ;
3. La phase stationnaire où le nombre de divisions cellulaires est égale au nombre de cellules mourantes ;
4. La phase de déclin commence lorsque les cellules commencent à mourir rapidement.

Ce graphique est important pour le contrôle du processus de production, car il est nécessaire de placer correctement les moments importants du processus de production sur la courbe ci-dessus. Un contrôle habile du processus basé sur la connaissance de l'état de la culture et des besoins du micro-organisme dans les différentes phases de croissance permet un contrôle efficace du processus et une grande efficacité de la production. Le contrôle du processus et les cultures sont influencés par des facteurs physiques et chimiques tels que la température, le pH, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone.

La température a un effet décisif sur l'activité enzymatique et le métabolisme microbien. Le contrôle de la température dans les cultures en bioréacteur est effectué en chauffant et en refroidissant la chemise d'eau du bioréacteur (utilisée le plus souvent dans les grands fermenteurs industriels) ou les échangeurs de chaleur situés dans la cuve de culture (populaires dans les petits réacteurs de laboratoire). Le contrôle de la température dans les bioréacteurs se fait en plusieurs étapes et comprend le contrôle de la température de la cuve de culture, de la température de l'enveloppe chauffante ou de l'échangeur de chaleur, ainsi que du fluide de chauffage et de refroidissement.

Un pH adéquat est essentiel à la bonne structure des protéines et au bon fonctionnement des enzymes. Chaque micro-organisme a une plage spécifique de tolérance au pH de la solution dans laquelle il peut

survivre et une plage optimale étroite spécifique qui lui permet de se développer le plus efficacement possible. Le pH est contrôlé en fonction des relevés des électrodes de pH placées dans le bioréacteur.

Des niveaux d'oxygène adéquats sont essentiels pour les micro-organismes aérobies, tandis que les anaérobies ont besoin d'un environnement pauvre en oxygène. La forme du réacteur, l'agitateur utilisé et sa puissance, la forme du dispositif d'aération et son emplacement dans la cuve de culture sont des facteurs importants pour la distribution des gaz. Le contrôle de la saturation relative du milieu en oxygène est effectué à l'aide d'électrodes à oxygène. Dans le cas d'organismes anaérobies, il convient d'éliminer l'oxygène du milieu en le saturant avec un gaz inerte, tel que l'azote, car il est nocif pour de nombreux organismes, tels que les bactéries méthanogènes. Dans les bioréacteurs équipés d'un agitateur mécanique, le maintien des conditions d'oxygénation souhaitées de la culture implique une intensification de l'agitation pendant la phase d'augmentation de la demande en oxygène, ce qui peut entraîner des forces de cisaillement élevées à l'intérieur de l'agitateur.

Outre les variables physicochimiques du bioréacteur, il est très important de contrôler la croissance du micro-organisme et la qualité du milieu pendant la culture. En fonction du produit cible, on mesure l'utilisation par le micro-organisme des composants du substrat, par exemple le glucose, à l'aide de tests en bandelettes ou, dans des systèmes plus avancés utilisant la spectroscopie proche infrarouge, la croissance d'un métabolite au fil du temps, par exemple la production d'antibiotiques par *Streptomyces*. D'autre part, on peut contrôler la croissance des microagrégats en comptant les bactéries *in situ* à l'aide de sondes de densité optique OD 600 ou de solutions plus sophistiquées effectuant des mesures cytométriques et de capacité électrique de la culture, ce qui est en corrélation avec le nombre de cellules viables en solution.

2.8. Considérations hygiéniques pour l'ensemble de la ligne

Dans une configuration idéale, toute la production biotechnologique devrait se dérouler dans des conditions stériles, depuis l'inoculation du premier flacon jusqu'à la confection du produit fini. Garantir la stérilité des cultures est le processus clé et le plus gourmand en ressources de la microbiologie industrielle, car il commence dès le stade de la conception des locaux et des lignes de production, ainsi que des produits ciblés. Les normes de qualité de base définissant les lignes de production en biotechnologie sont les exigences établies par la FDA américaine (Food and Drug Administration ; FDA) et la certification 3A qui spécifient plusieurs exigences, telles que des surfaces de soudure parfaitement lisses et électropolies qui entrent en contact avec le produit. Cette procédure se traduit par une utilisation ultérieure de l'installation, car une rugosité fine peut piéger le biofilm, entraînant une contamination ; la porosité du matériau, qui peut empêcher le dégazage du récipient pendant la stérilisation, conduisant à la non-stérilité du bioréacteur ou d'un autre récipient. L'étape suivante consiste à sélectionner des matériaux appropriés pour la production prévue, c'est-à-dire résistants aux températures élevées lors de la stérilisation à la vapeur et aux produits chimiques agressifs lors des processus de nettoyage et de désinfection.

3. Efficacité biologique et commercialisation

3.1. Vérification de l'efficacité biologique en laboratoire

La vérification de l'efficacité biologique des formulations microbiennes est une étape clé du processus de développement et d'évaluation. Elle implique une série de tests en laboratoire visant à confirmer que les

micro-organismes contenus dans les formulations présentent l'activité biologique et physico-chimique attendue. Dans ce contexte, l'efficacité peut inclure la capacité à solubiliser le phosphore, à assimiler l'azote, à contrôler les pathogènes, à améliorer la santé des plantes ou à affecter la structure microbienne du sol.

Diverses méthodes de laboratoire sont utilisées pour évaluer l'efficacité biologique des préparations microbiennes. Il peut s'agir de tests *in vitro*, d'analyses microscopiques, de techniques de biologie moléculaire ou d'études sur la production de métabolites par les micro-organismes. Des procédures spécifiques sont utilisées en fonction de l'objectif et du type de préparation afin d'obtenir une image complète de l'efficacité biologique. L'un des tests couramment utilisés est l'analyse antagoniste, qui teste la capacité des micro-organismes d'une préparation à entrer en compétition avec les agents pathogènes. Par exemple, les tests antimicrobiens peuvent montrer si une formulation microbienne inhibe la croissance et le développement des micro-organismes pathogènes, ce qui est un indicateur important de l'efficacité.

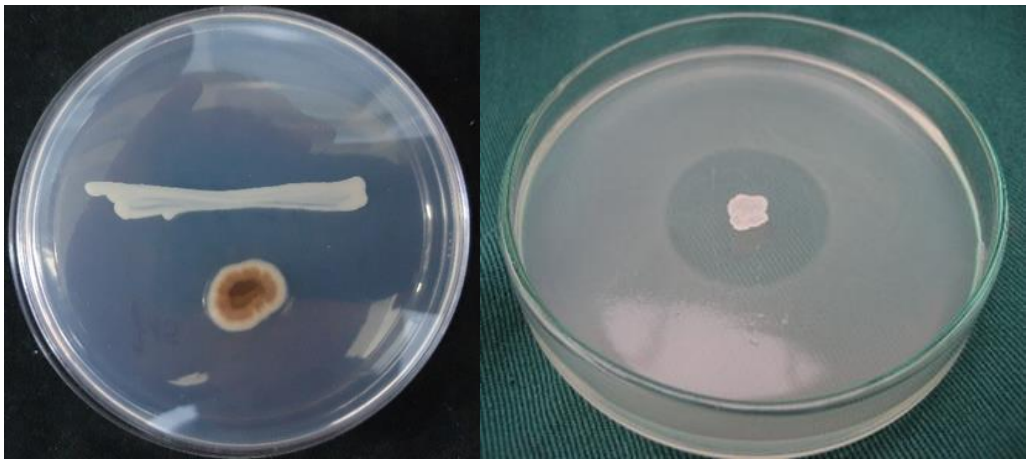

Fig. 4.10. Exemple de vérification des propriétés des micro-organismes en termes d'activité de biocontrôle - Bacillus amyloliquefaciens *contre* Botrytis cinerea *(à gauche) et solubilisation du silicium par* Paenibacillus polymyxa *(à droite).*
Source : Intermag sp. z o.o.

Un autre test des propriétés des micro-organismes est leur capacité à solubiliser les éléments nutritifs tels que le phosphore ou à assimiler l'azote.

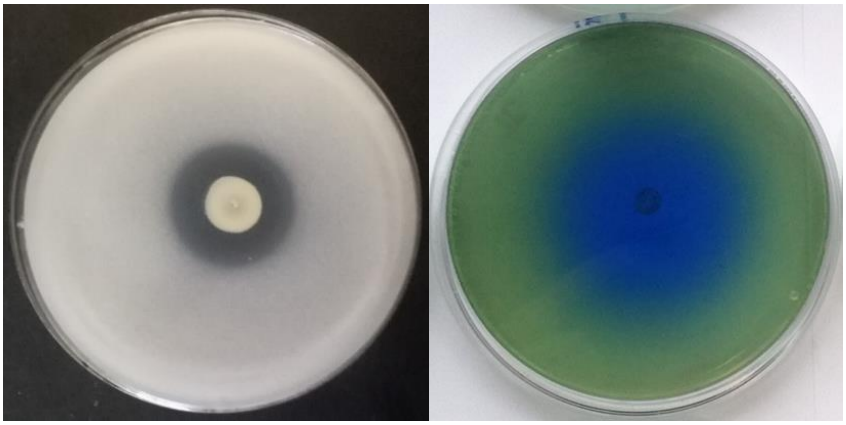

Fig. 4.11. Test de propriété - (à gauche) solubilisation du phosphore par Bacillus pumilus *- la décoloration autour des micro-organismes indique que le processus se déroule correctement ; (à droite) fixation de l'azote par* Paenibacillus polymyxa *- l'apparition de bleu autour de la colonie bactérienne indique une fixation active de l'azote.*
Source : Intermag sp. z o.o.

Les analyses génétiques et moléculaires permettent d'identifier les micro-organismes dans les préparations et de suivre leur activité biologique ; l'analyse précise des quantités d'expression génique de l'ADN ou de l'ARN peut fournir des informations sur la réponse des micro-organismes aux conditions de laboratoire, ce qui permet d'évaluer leurs performances. Le contrôle de la croissance et de l'activité des micro-organismes dans les préparations microbiologiques est essentiel pour évaluer leur capacité à coloniser et à se reproduire dans des conditions spécifiques. La mesure de paramètres tels que le nombre de cellules, la quantité de substances chimiques sécrétées ou le taux de division cellulaire fournit des informations importantes sur l'efficacité biologique (Sana et al. 2023).

La vérification finale de l'efficacité biologique des formulations microbiennes implique des tests réalisés dans des conditions qui simulent des environnements naturels, tels que le sol ou l'eau. Cela permet de vérifier que les micro-organismes conservent également les propriétés souhaitées dans des conditions plus complexes, ce qui est essentiel pour évaluer leur adéquation dans des conditions agricoles réelles.

3.2. Vérification de l'efficacité biologique dans des conditions contrôlées

La vérification de l'efficacité biologique dans des conditions contrôlées est le processus d'évaluation de l'efficacité d'une souche ou d'une formulation dans des conditions contrôlées, c'est-à-dire dans un phytotron ou une serre de culture. Ce processus vise à comprendre l'efficacité d'une substance ou d'un produit testé dans un contexte biologique (environnement), c'est-à-dire l'effet sur la croissance et le développement des plantes.

Étapes de la vérification de l'efficacité biologique (dans la culture des plantes) dans des conditions contrôlées :

1. Conception de l'expérience - définition de l'objectif de l'expérience et de sa méthodologie, définition des résultats attendus et sélection des paramètres appropriés.
2. Préparation d'un espace contrôlé - création d'un environnement expérimental où des facteurs tels que la température, l'humidité et l'éclairage peuvent être contrôlés pour garantir la reproductibilité et la comparabilité des résultats.
3. Application de la substance ou du produit - application de la substance ou du produit conformément aux instructions.
4. Surveiller les paramètres biologiques pendant la croissance - étudier les paramètres biologiques tels que la hauteur des plantes, la teneur en chlorophylle, la teneur en macro et micronutriments, etc.
5. Détermination des paramètres biologiques après la fin de la culture - l'étude des paramètres biométriques des plantes, c'est-à-dire le poids végétatif.
6. Analyse statistique des données - traitement et analyse des données collectées, comparaison des résultats de l'expérience avec le groupe de contrôle et interprétation des résultats obtenus.

La vérification de l'efficacité biologique est une étape clé de la recherche scientifique, en particulier dans des domaines tels que l'agriculture, la biologie, la biotechnologie et la médecine. Elle permet aux scientifiques, aux chercheurs et aux entreprises de formulation agricole d'évaluer si un nouveau produit ou une nouvelle substance a l'effet escompté dans des conditions contrôlées, ce qui est essentiel avant de pouvoir l'utiliser dans la pratique agricole.

3.3. Vérification de l'efficacité biologique en conditions réelles

La vérification de l'efficacité biologique dans des conditions de terrain fait référence à l'évaluation de l'efficacité des substances ou des produits dans l'environnement dans des conditions de terrain. Contrairement aux conditions contrôlées que l'on trouve dans un phytotron, les conditions de terrain comprennent une variété de facteurs environnementaux, tels que les conditions météorologiques variables, la composition variable du sol et les effets des différents organismes dans un écosystème. Étapes de la vérification de l'efficacité biologique en conditions réelles :

1. Conception de l'expérience dans les conditions du terrain - élaboration d'un plan de recherche tenant compte des conditions spécifiques du terrain dans lesquelles l'expérience sera menée ;
2. Préparation du site - sélection d'une zone appropriée pour l'expérience, préparation du site en fonction des objectifs de la recherche et application des garanties nécessaires, telles que les règles éthiques ou les permis d'expérimentation ;
3. Application de la substance ou du produit - application de la substance ou du produit dans des conditions réelles, en tenant compte des spécificités de la substance ou du produit, du type de culture et de l'environnement ;
4. Surveillance des paramètres biologiques de la culture sur le terrain - mesures de plantes sélectionnées dans les parcelles, détermination de la levée, de la vigueur et de la santé des plantes, mesure de la teneur en chlorophylle, surveillance des indices de végétation, c'est-à-dire NDVI (Normalized Difference Vegetative Index ; NDVI)
5. Mesure de la quantité et de la qualité du rendement ;
6. Collecte de données et analyse statistique - analyse des données collectées dans le contexte de l'effet de la substance ou du produit sur la croissance, le développement et le rendement de la plante, ainsi que de l'influence des facteurs externes.
7. La vérification de l'efficacité biologique dans des conditions de terrain est importante car elle fournit des informations sur la manière dont les produits ou les substances affectent la plante dans l'environnement réel. Cette approche est fondamentale dans les domaines de l'agriculture, de la conservation et de l'écologie, où les interactions entre les plantes et leur environnement sont complexes et peuvent être difficiles à refléter dans des conditions de laboratoire.

En résumé, la vérification de l'efficacité biologique des formulations microbiennes est un processus en plusieurs étapes qui combine diverses méthodes d'essai. L'attention portée à des tests précis, fiables et représentatifs permet aux fabricants de fournir des formulations microbiennes qui sont efficaces dans des conditions contrôlées et qui répondent aux attentes dans un environnement agricole diversifié et dynamique.

3.4. Solubilité, miscibilité et stabilité des biopréparations

Le contrôle de la stabilité des formulations microbiennes est une étape importante de leur fabrication et de leur utilisation. La stabilité désigne la capacité d'une préparation à conserver ses propriétés biologiques, physicochimiques et microbiologiques pendant une période donnée et dans diverses conditions de stockage. Les tests en laboratoire permettent d'évaluer si les micro-organismes présents dans la préparation conservent leur capacité de croissance et ne se dégradent pas lorsqu'ils sont exposés à divers facteurs tels que la température, la lumière ou l'humidité. Les tests de stabilité comprennent également la surveillance

des changements éventuels dans la composition chimique de la formulation et l'évaluation de la dégradation des substances actives. Ce point est important car l'efficacité d'une formulation microbienne dans l'agriculture dépend largement du maintien de l'intégrité des micro-organismes pendant le stockage. Des tests de stabilité minutieux permettent aux fabricants de déterminer avec précision la durée de conservation d'une formulation et de garantir aux agriculteurs qu'ils bénéficieront d'un produit d'une qualité et d'une efficacité constantes. Les tests sont utilisés pour évaluer la durée pendant laquelle une biopréparation conserve son efficacité dans les conditions de stockage, ce qui peut inclure le stockage de la biopréparation à différentes températures, la réalisation d'analyses de la composition microbienne, telles que l'évaluation du nombre de micro-organismes viables et l'analyse de la diversité génétique après une certaine période, ainsi que l'évaluation des changements physiques et chimiques. La stabilité est vérifiée à différentes échelles, depuis les tests en laboratoire jusqu'aux tests de production à grande échelle, en passant par les tests à l'échelle pilote, afin d'évaluer si le produit conserve ses propriétés au cours des différentes étapes de la production et du stockage.

Le contrôle de la solubilité des préparations microbiologiques est un aspect important de leur efficacité et de leur utilisation. Dans ce contexte, le processus vise à évaluer dans quelle mesure les formulations peuvent se dissoudre et se distribuer uniformément dans diverses substances porteuses, telles que l'eau ou d'autres agents auxiliaires. Les tests de solubilité sont essentiels car ils affectent l'uniformité de l'application d'une formulation dans la zone cible, déterminant l'efficacité et l'efficience des micro-organismes sur le terrain. Les fabricants effectuent généralement ces tests en laboratoire, en simulant différentes conditions d'application. En pratique, les tests de solubilité comprennent l'évaluation du temps nécessaire pour que le produit se dissolve complètement, le degré de dissolution à différentes températures ou pH, ainsi que l'évaluation de tout changement physicochimique. Un suivi attentif de ces paramètres permet aux fabricants d'ajuster les formulations microbiennes afin de garantir des méthodes d'application optimales. Il est important de préparer efficacement les formulations microbiennes en vue de leur application pour qu'elles soient utilisées avec succès dans l'agriculture, l'horticulture et la protection de l'environnement. Les tests de solubilité évaluent la façon dont un bioproduit se dissout dans de l'eau de différents niveaux de dureté ou dans d'autres substances. Pour ce faire, on prépare des solutions de biopréparation dans divers agents solubilisants et on évalue le degré de solubilité. Les tests de solubilité ne sont pas nécessaires pour les produits solides contenant des micro-organismes actifs appliqués directement sur un support solide.

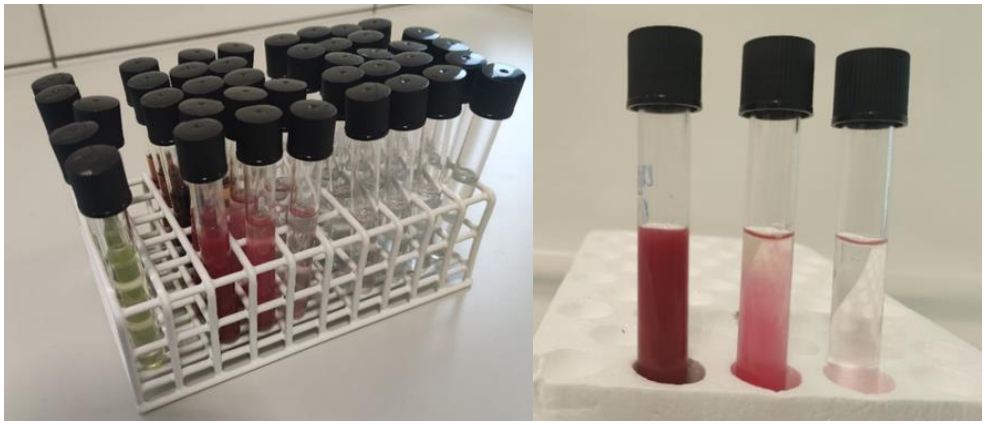

Fig. 4.12. Tests de mélange de produits agrochimiques avec des produits microbiens dans un spray multicomposant. Source : Intermag sp. z o.o.

Le contrôle de la miscibilité et de la compatibilité des formulations microbiennes avec d'autres substances est une étape clé de leur application dans la pratique agricole. La miscibilité fait référence à la capacité d'une formulation à se mélanger uniformément avec d'autres substances, telles que des engrais ou des pesticides, sans former de dépôts indésirables ou de changements dans la structure physico-chimique. La compatibilité, quant à elle, désigne la capacité d'une formulation à interagir avec différents produits chimiques sans perdre son efficacité, c'est-à-dire, dans le cas des formulations microbiologiques, à maintenir la viabilité des micro-organismes actifs. Les tests de mélange et de compatibilité sont réalisés en laboratoire et permettent d'évaluer la stabilité de la formulation dans différents mélanges et les interactions possibles avec d'autres substances. Les fabricants peuvent ainsi proposer aux agriculteurs des formulations microbiennes facilement miscibles avec d'autres agents utilisés en agrotechnologie, sans perdre leur efficacité. Une recherche méticuleuse dans ce domaine permet de minimiser le risque d'interactions chimiques indésirables, garantissant ainsi une utilisation efficace et sûre des préparations microbiologiques dans la pratique agricole (Ledakowicz 2012).

Références

Bednarski W., Fiedurek J. 2012. Podstawy biotechnologii przemysłowej. Wydawnictwo WNT.

Chaudhary T., Dixit M., Gera R., Shukla A.K., Prakash A., Gupta G., Shukla P. 2020. Techniques from improving formulation of bioinoculants. 3 Biotech, 10, 1-9.

Elander R.P., Chang L.T. 1979. Microbial Culture Selection. In: Peppler H.J., Perlman D. (eds.) Microbial Technology, Second Edition. Academic Press, 243-302.

Kuila A., Sharma V. (Eds.) 2018. Principles and Applications of Fermentation Technology. John Wiley & Sons.

Ledakowicz S. 2012. Inżynieria biochemiczna. Wydawnictwo WNT.

Olicón-Hernández D.R., Guerra-Sánchez G., Porta C.J., Santoyo-Tepole F., Hernández-Cortez C., Tapia-García E.Y., Chávez-Camarillo G.M. 2022. Fundaments and concepts on screening of microorganisms for biotechnological applications. Mini review. Current Microbiology, 79(12), 373.

Sana S., Sheikh A., Maheen Z., Mukhtar N., Ali S., Aftab M., Liaqat I. 2023. Fundamentals of Microbiology: A Laboratory Manual. Scintific Knowleadge Publisher.

Schlegel H.G. 2004. Mikrobiologia ogólna. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Singleton P.W.; Keyser H.; Sande E. 2022. Development and Evaluation of Liquid Inoculants. In: Herridge D. (ed.) Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam. ACIAR Proceeding, 109e, 52-66.

Stackebrandt E., Smith D., Casaregola S., Varese G.C., Verkleij G., Lima N., Bridge P. 2014. Deposit of microbial strains in public service collections as part of the publication process to underpin good practice in science. SpringerPlus, 3, 1-4.

Steele D.B., Stowers M.D. 1991. Techniques for selection of industrially important microorganisms. Annual Review of microbiology, 45, 89-106.

Vassilev N., Vassileva M., Azcón R., Fenice M., Federici F., Barea J.M. 1998. Fertilizing effect of microbially treated olive mill wastewater on Trifolium plants. Bioresource technology, 66(2), 133-137.

Vassileva M., Malusà E., Sas-Paszt L., Trzcinski P., Galvez A., Flor-Peregrin E., Shilev S., Canfora L., Mocali S., Vassilev N. 2021. Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-Inoculant Production and Quality. Microorganisms 9(6), 1254.