

Essai de production et de multiplication du mycélium de *Pleurotus florida* à partir des spores sur différents milieux de culture à base des ingrédients locaux

Proust Rugendabanga Kachulire¹⁻²

¹Biologiste, assistant à l'Université libre des Grands lacs (UIGL), RD Congo

²Secrétaire facultaire adjoint, faculté de l'Agronomie, RD Congo

Copyright © 2017 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: This study consists at a trial production and the mycelien filament multiplication starting by pleurotus florida mushroom spores on the different media by using local ingredients. Our results have shown that there are bacteria which are developed in medium locally prepared by ingredient. We decided to try spores in these media. In general we chose six media by using soja, tomatoes, irish potatoes, carrots, corns and milk. Our laboratory experiences have given us positive results in multiplying mycelien fragment. But only filament productions with spores in carrot milieu gave negative result. We thought that our different media may easily replace media coming from myciculture activities.

KEYWORDS: Production, *Pleurotus florida* mycelium, spore, culture, local ingredients.

RESUME: Cette étude consiste a un essai de production et de multiplication des filaments mycéliens à partir des spores du champignon pleurotus florida sur des milieux à base d'ingrédients locaux. Nous sommes parti du principe selon lequel il aurait des bactéries qui se développent sur des milieux préparés localement a base des ingrédients. Nous nous sommes décidés d'y essayer les spores. Nous avons choisi au total 6 milieux : à base de soja, à base de carotte, à base de lait, à base de tomate, à base de pomme de terre et enfin à base de maïs. Nos expériences effectuées au laboratoire nous ont donné des résultats positifs pour la multiplication des fragments mycéliens ; Quant à la production des filaments à partir des spores, seul le milieu à base de carotte a pu donner un résultat négatif. Nous avons estime que nos milieux fabriqués localement peuvent facilement remplacer les milieux importés dans les activités de la myciculture.

MOTS-CLEFS: production, mycélium de *Pleurotus florida*, spore, farming, ingrédients locaux.

1 INTRODUCTION

Les nutriments ne sont pas absorbés par l'homme comme tels mais sous forme d'aliments. L'homme est armé de dispositif divers lui permettant de saisir les aliments, de les couper, de les broyer et de le digérer complètement pour retirer les éléments nutritifs dont il a besoin.

Au niveau des organes et des cellules, les nutriments absorbés subissent diverses transformations afin de produire de l'énergie dont l'organisme a besoin, les matériaux de construction, les hormones, les vitamines et les sels minéraux et autres.

Pour avoir tous les nutriments nécessaires au bon fonctionnement du corps humain, une alimentation suffisante et équilibrée est indispensable. Celle-ci doit satisfaire au quatre demandes suivantes : les besoins en énergie, les besoins en protéines, les besoins en oligo-éléments, en vitamines, en sels minéraux et enfin les besoins en eau.

Le champignon est à ce titre considéré comme un aliment de haute valeur compte tenu de sa richesse en protéines, en sels minéraux et en vitamine. Il a en outre la faculté de soigner ou d'aider l'organisme à lutter contre certaines maladies (KIYUKU, 1999)

Cela nous pousserait à admettre les champignons dans notre menu. Leur absence ou leur rareté est due au fait qu'ils sont presque introuvables au marché mais aussi leur culture est délicate comportant de nombreuses étapes depuis la sélection de la souche la mieux adaptée, la conduite de la culture jusqu'à la commercialisation du produit récolté.

Dans la nature, les champignons se multiplient en produisant des millions des spores. Quand elles tombent dans un environnement favorable, elles peuvent germer et se ramifier pour former le mycélium en utilisant les substances nutritives disponibles (OEI, 1991).

Pour la plupart de fois, la nature n'accorde pas aux spores des conditions écologiques favorables à leur développement et à leur fructification. Pour contourner l'obstacle dressé par la nature, l'homme a mis sur pied des milieux artificiels avec un environnement favorable pour la fructification et le développement du mycélium à partir des spores ou des tissus. La production du mycélium à partir des spores appelée encore production du blanc étant contestée par bon nombre d'auteurs et le coût élevé de ces milieux mis sur pied constituent un goulot d'étranglement particulier dans nombreux pays suite aux conditions non réunies pour la fabrication du blanc, semence de départ pour la culture de champignon (OEI, 1991).

Pour faire face à cet obstacle d'étranglement, nous essayerons de répondre aux questions suivantes à l'issue d'expérimentations :

- Les champignons sont-ils seulement adaptés à ces milieux artificiels connus pourtant chers ?
- Ne peuvent-ils pas croître sur des milieux fabriqués localement à partir des ingrédients locaux facilement trouvables et moins chers que les premiers ?
- Ces milieux sont-ils propices à la colonisation mycélienne à partir des spores, contestée par certains auteurs suite à leur dimension petite, difficilement manipulables et au manque de laboratoire spécialisé et équipe ?
- Quel est le milieu le plus favorable à la croissance mycélienne ?

L'originalité de ce travail se trouve dans la production du mycélium et la vérification de la colonisation des milieux à base d'ingrédients locaux par les spores du champignon *Pleurotus florida*. Ce travail offre aux vulgarisateurs un guide théorique sur la production des spores et du mycélium mais aussi une liste des milieux à base d'ingrédients locaux ; constituant ainsi un contour de tout obstacle dressé par le coût de milieux et la nature qui est un vrai problème pour la vulgarisation du blanc et de la culture de champignon.

2 GENERALITES SUR LA FABRICATION DU BLANC

2.1 LA CULTURE

La culture des champignons n'est que l'une des activités d'un système agricole complet. Elle permet une valorisation des déchets agricoles ou industriels en produit à la valeur azotée plus haute que celle d'autres cultures. Ils peuvent être exportés pour la consommation dans la communauté. Dans la plupart de cas, la vente de produit permet d'amortir rapidement les investissements initiaux (CIRIMWAMI, 2000).

La culture du départ ou la fabrication du blanc peut être réalisée à partir d'un carpophage frais et sain. A partir de cette culture, on prépare de nombreuses cultures sur gélose. Elles servent à inoculer des bouteilles avec du blanc et ces dernières permettent d'inoculer le substrat final du blanc (OEI, 1991).

a) Matériel et produit

Les matériels et les produits suivants sont nécessaires : les spores ou les tissus, un autoclave, des tampons de coton, des brûleurs ou bec bunsen, les scalpels d'inoculation, des bouteilles de verre, les réfrigérateurs, les tubes à essai, une casserole à pression, des désinfectants (formol+KMnO₄), de l'agar-agar, des substrats pour des cultures mères : grains de blé, de seigle, de millet, d'avoine, de sorgho et autres ou de bâtonnet de bois, des produits pour le blanc final par exemple la sciure de bois (OEI, 1991).

b) Salles blanches ou stériles

Un environnement stérile est indispensable à la production de blanc. En particulier les opérations au cours desquelles les récipients stérilisés sont ouverts, doivent se dérouler dans des conditions aseptiques car l'air contient en effet une infinité des particules et des microorganismes capables d'endommager les expériences. Il n'est pas possible de stériliser

complètement un environnement, mais le degré de contamination doit être maintenu en de ca d'un certain seuil. Les producteurs du blanc dans les pays industrialisés ne tolèrent que de très faibles taux de contamination : un taux de 5% est raisonnable pour les pays tropicaux compte tenu de l'environnement très infectieux et de l'insuffisance des moyens.

Pour aménager une zone d'inoculation « propre », il existe deux dispositifs : des simples armoires d'inoculation pour une petite production et des armoires à flux laminaire pour une production importante. Celles-ci filtrent efficacement l'air et fournissent un flux non turbulent d'air propre. Les armoires sont désinfectées chimiquement (OEI, 1991).

c) Préparation des milieux

On appelle « slant », les tubes à essai ou les bouteilles contenant des milieux favorables à la croissance mycélienne. La technique comprend la préparation des milieux, le remplissage des tubes à essai et leur stérilisation. Les milieux contiennent suffisamment des substances nutritives et un agent solidifiant. Dans un milieu acide l'agar solidifie mal s'il a été stérilisé. Aussi il convient de stériliser les extraits et de l'eau avant d'ajouter l'agar.

La plupart des espèces produisent des filaments mycéliens sur les milieux suivants : le PDA ou mélange pomme de terre-agar-dextrose, le milieu de décoction de son de riz, l'agar-blé, Malt-agar à 2%, Farine d'avoine-agar.

d) Avantage de ces milieux et stérilisation

Il est possible d'acheter ces milieux tout préparés. Le mode de préparation doit être écrit sur le paquet. Ces produits sont chers, mais présentent un gain de travail, l'autre avantage de la poudre est sa qualité constante, alors que notre produit varie selon les ingrédients utilisés. Certains milieux commercialisés contiennent des antibiotiques pour empêcher la croissance des bactéries sur les milieux. Pour obtenir le mycélium pur de tout contaminant, il faut absolument, au départ une culture pure et des milieux complètement stériles. Or certaines bactéries produisent des spores qui survivent à 100 °C. Par ailleurs, un comptage effectué dans un seul gramme de seigle donne plus de 50.000 bactéries, 200.000 ascomycètes, 12.000 autres champignons et des nombreuses levures.

Quelques organismes survivent au traitement thermique suffisant à gâter le blanc. La stérilisation des milieux sera donc réalisée en maintenant la température de 121 °C pendant 15 à 30 minutes pour que la chaleur atteigne le cœur du substrat dans les tubes, les bouteilles ou les sacs. En fonction de la taille de conteneur à stériliser, il faudra de 20 minutes à 4 heures pour une stérilisation complète.

Un autre mode de stérilisation consiste à traiter à la vapeur de façon intermittente, une heure par jour pendant trois jours. La pression n'est pas nécessaire. Si le premier traitement ne suffit pas à détruire toutes les spores des microbes. Celles-ci vont germer à la température appropriée pendant le refroidissement et pourront être détruites lors du 2ème passage à la vapeur. Pour plus de garantie un troisième traitement thermique est effectué le 3^{ème} jour.

Les cocottes- minutes en aluminium martelé sont les plus utilisées. L'eau doit être versée dans la cocotte jusqu'au niveau du grillage. Les bouteilles ou les tubes sont placées sur des étagères être couvertes de plastique pour empêcher l'eau de mouiller les bouchons de coton. Puis le couvercle est solidement refermé, la soupape pourra être ouverte au début pour laisser échapper l'air. Cela prend 5 à 10 minutes à partir du moment où l'eau bout et que la vapeur s'échappe. La stérilisation sous pression peut durer 20 minutes.

Lors de la mise en boîte du milieu, on augmentera la surface de la gélose en inclinant les tubes ou les bouteilles dès que la température atteint 45 °C. Il faut que l'agar soit encore fluide ; on veillera à ce que l'agar ne touche pas les bouchons de coton, il risque d'être contaminé. Ne retourne pas les tubes de haut en bas avant que l'agar ne soit solidifié, si non une petite partie pourrait se solidifier de l'autre côté du tube ou trop près des bouchons (OEI, 1991).

2.2 LA CULTURE DE TISSU

Il n'est pas possible de transférer éternellement des cultures sur agar car le mycélium dégénère. Il vaut mieux ne pas transférer plus de huit fois. On peut obtenir un mycélium jeune et vigoureux à partir de fructification en utilisant des jeunes champignons (âgé d'un à trois jours) de préférence à l'état de bouton. Le scalpel, l'alcool, le tube à essai ou bouteille d'agar stérilisé, le bec bunsen, une table de travail propre ou plutôt une armoire à flux laminaire ou une boîte à inoculation.

Laver minutieusement les champignons. Tremper le scalpel dans l'alcool puis porter au rouge sous la flamme, le laisser refroidir 10 secondes. Le champignon sera fendu dans sa longueur sans toucher la surface intérieure. Utiliser le scalpel chauffé pour détacher un petit morceau de tissu. Ouvrir le tube et chauffer l'orifice. Puis piquer le scalpel avec le tissu au milieu de l'agar. On remet immédiatement bouchon. On peut inoculer au moins trois cultures ou plus si possible (OEI, 1991).

En 3 ou 4 jours, le mycélium va couvrir le milieu et se ramifier sur l'agar. Si aucune pousse n'apparaît sur l'agar, on vérifie la comptabilité de ce type de milieu avec le champignon choisi en misant sur la bonne préparation du milieu, la viabilité du champignon, la possibilité que le mycélium ait été détruit par la chaleur du scalpel insuffisamment refroidi avant le prélèvement.

2.3 LA CULTURE DE SPORES

Pour cette culture, il est primordial que le chercheur se convainque que la stérilité est une exigence qui dominera tous les gestes, si non, il peut oublier ses ambitions. La culture de spores se déroule en 2 phases : l'obtention de l'empreinte des spores et la mise en route de la culture mère. Lors de la première phase, le champignon producteur des spores est sélectionné, cueilli, ôte le pied, dépose le chapeau sur un sachet en plastique neuf préalablement retourné, lui-même pose sur la table de travail. En tombant, les spores laissent une empreinte de stries rayonnantes (VERFAILLIE, 1983).

Lors de la deuxième phase, les spores sont déjà déposées sur le sachet, il faut compter une journée en préparant la gelée d'agar-agar qui servira de milieu nourricier dans les tubes. On porte 3,5 dl d'eau à l'ébullition y délayer une cuillère à soupe d'agar et une cuillère à soupe de flocon d'avoine. On laisse mijoter quelques minutes et on passe au mixage. Verser dans chaque tube 2ml de cette solution et boucher immédiatement avec un tampon d'ouate enfonce profondément. Après la cuisson d'un quart d'heure dans une casserole à pression pour la stérilisation, On peut ensemercer en étendant les spores sur le gel dans le tube à essai.

Au bout d'une bonne semaine, le feutrage mycélien apparaît. Et une dizaine de jour plus tard, le milieu de culture est entièrement couvert d'une épaisse couche de moisissure blanche (VERFALLIE, 1983).

Le mycélium doit être blanc et pousser à partir des spores ou du tissu prélevé. Si des mycéliums bleus, verts ou gris se forment ailleurs sur la surface, ils proviennent des contaminants. Une pousse crémeuse, brillante indique souvent une contamination bactérienne. La culture pourra être sauvée, si les filaments mycéliens ne sont pas mêlés aux filaments des contaminants, en le coupant et les transférant dans un nouveau tube de culture. On prendra garde de ne pas toucher la surface contaminée avec le scalpel (OEI,1991 et VERFAILLIE,1983).

Dans certains laboratoires, on utilise des boîtes de pétri à la place de tubes, mais elles sont plus facilement contaminées parce que la surface entière est exposée à l'air pendant l'inoculation. Par contre, ces boîtes sont bien adaptées aux expériences sur les vitesses de croissance du mycélium. Un environnement propre est alors beaucoup plus important dans le cas de transfert de tube à tube (OEI,1991).

2.4 UNE SOUS-CULTURE OU CULTURE REPIQUEE

Une fois que l'on a obtenu la culture pure du champignon désire, il faut la multiplier. Inoculer davantage de tubes selon les techniques décrites. On note le nombre de transfert en étiquetant les cultures d'origine : T_1 , le tube suivant T_2 (isole à partir de T_1), T_3 isole d3 T_2 etc.

Pour le repiquage on procède comme suit :

- 1^o Stériliser le scalpel ou la spatule à blanc à la flamme.
- 2^o Retirer les bouchons des tubes (pendant ce temps le scalpel se refroidit)
- 3^o Maintenir l'ouverture des tubes au-dessus de la flamme de bec bunsen
- 4^o Tailler un fragment mycélien du tube père.
- 5^o Placer ce fragment au milieu de l'agar du nouveau tube.
- 6^o Maintenir l'ouverture des tubes sur la flamme pendant 3 secondes.
- 7^o Refermer les tubes avec les bouchons de coton.
- 8^o Stériliser le scalpel une fois de plus à la flamme pour le transfert suivant.

Mettre les tubes nouvellement inoculés à incuber à 25°C pendant 10 jours (OEI,1991).

2.5 LES RECIPIENTS

Le choix des récipients pour le blanc mère ou le blanc commercialisé dépend des disponibilités locales. On utilise habituellement pour le blanc mère des bouteilles de verre ou de plastique résistant à la chaleur. On peut aussi utiliser des pots à large orifice, des bouteilles de lait, des bouteilles de dextrose.

Les sacs en polypropylène, avec filtre ou bouchon de coton pour l'aération sont beaucoup plus utilisés pour le blanc final sur la sciure ou sur le grain. En Europe, leur capacité varie de 2,5 à 5 litres pour le blanc sur le grain.

Pour la sciure de bois, on utilise habituellement de sacs de 1,2 kg. Certains types de sacs échouent la croissance mycélienne est beaucoup plus rapide en bouteille qu'en sac. Se rappeler qu'il faut un temps de stérilisation plus long pour de gros récipients. La conductivité thermique du blanc est généralement faible (OEI, 1991).

2.6 LE BLANC MÈRE

Il est utilisé pour inoculer, soit du blanc sur le grain, soit une deuxième génération de blanc ; on se sert par exemple de bâtonnets de bois qui a leur tour peuvent inoculer le blanc final. Certains fabricant de blanc les plongent dans une solution riche en substance nutritive avant la stérilisation, Ces bâtonnets peuvent être conservés 6 mois au réfrigérateur sans perdre leur vigueur.

On peut aussi utiliser ces baguettes congelées comme blanc final. Si leurs extrémités sont pointues, elles peuvent servir à perforer les sacs plastiques ce qui simplifie le travail d'ensemencement ;

On ne devrait pas utiliser de blanc mère sur grain pour inoculer une autre génération de blanc mère sur grain à cause du risque de contamination et de dégénérescence.

PREPARATION DU SUBSTRAT

On peut utiliser différentes sortes de grains comme le blé, le seigle, le millet, le riz, ou le sorgho. La qualité du substrat est très importante. En effet, le grain doit avoir été fraîchement récolté et ne contient que très peu d'amandes cassées, peu d'endospores bactériennes ou de débris étrangers. On fait tremper les grains dans l'eau pendant 2 heures, on le fait égoutter et les cuire dans l'eau pendant 10 à 15 minutes. Egoutter de nouveau puis mélanger minutieusement avec de la vermiculite, de la craie ou pierre à chaux (CaCO_3) et de la gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). La vermiculite empêche le grain de coller et a, comme le gypse, un effet positif sur la structure du substrat. Exemple de quantité : 4,5kg du blé, 100g du gypse et 25g de craie.

On remplit les bouteilles nettoyées soigneusement à l'intérieur du goulot au préalable, pour empêcher les spores de germer à cet endroit. Stérilisées dans l'autoclave, les bouteilles seront secouées à la sortie pour mêler les grains le plus humides et les plus secs et empêcher ceux du fond de se coller les uns aux autres. Dès que la température au centre des récipients est descendue en dessous de la température maximum de croissance mycélienne, ces récipients peuvent être inoculés. Les grains peuvent être facilement contaminés, c'est pourquoi il faut travailler dans une salle blanche. La durée de l'incubation prendra fin jusqu'à ce que ce mycélium ait envahi tout le substrat. Remuer une ou deux fois pendant la période d'incubation, à partir du 8^e jour ou bien tous les 3 ou 4 jours pour répartir le mycélium régulièrement et pour empêcher les grains de s'agglutiner. Pour la plupart des espèces, la colonisation du substrat se fait en deux semaines environ. Le blanc sera conservé au réfrigérateur et ne sera sorti que si nécessaire. Le blanc de grain peut se gâter en une nuit à une température supérieure à 25 °C (OEI, 1991).

2.7 QUALITE DU BLANC

Un bon blanc a une croissance mycélienne vigoureuse et est dépourvu d'autres micro-organismes. S'il a été très longtemps stocké, sa vigueur diminue. Ainsi le blanc de pleurote devient très dense après un stockage prolongé et très difficile à répartir convenablement au moment du lardage.

Cependant, il ne faut effectuer de multiplication trop rapprochée et il est recommandé de laisser le mycélium se reposer entre les transferts en le conservant quelque mois au réfrigérateur. La meilleure méthode consiste à répartir d'une culture mère fraîche à partir d'une culture de tissu ou des spores.

Le blanc de la plupart des champignons cultivés peut être conservé pendant 6 mois après la colonisation complète du substrat par le mycélium. Il sera conservé au frais en permanence (4 à 6°C), exception faite de *volvariella* (15 °C). Il faut toujours utiliser totalité d'une bouteille de blanc car le reste serait détérioré par les contaminants.

2.8 LE CONTAMINANTS

Le mycélium doit être blanc et filamenteux, sauf celui de *lepista nuda* et de *Morchella*. On reconnaît généralement la contamination par des champignons à la couleur caractéristique de leur mycélium. Quelques fois, on peut mettre en

évidence une zone distincte entre le mycélium inoculé et les contaminations. Le penicillium, l'aspergillus et le trichoderma sont très courants.

Il est recommandé de stériliser les contenants contaminés et de ne les ouvrir et les nettoyer qu'après. Plusieurs contaminants peuvent causer des maladies de la peau ou des alvéolites allergiques. Mais les bactéries se développent facilement dans le blanc sur grain et sont plus difficiles à détecter ; certains donnent au blanc l'aspect grasseux et une odeur aigre. Si elles ne sont pas détectées avant l'inoculation du blanc commercial, tout le blanc provenant de la bouteille contaminée sera inutilisable (OEI, 1991).

3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 MATÉRIELS

3.1.1 MATÉRIELS DE LABORATOIRE

Pour la réalisation de ce travail, nous avons utilisé le matériel habituel et indispensable d'un laboratoire de microbiologie : tube à essai, étuve, boîtes de petri, anse de platine, microscope optique, lampe à alcool, balance, Réfrigérateur, four pasteur, Autoclave de Chamberland, Erlenmeyer, distillateur, Bechet, bocal en verre, Ouate et parfois de bougies.

3.1.2 MATÉRIEL BIOLOGIQUE

a) Pleurotus florida (champignon) Le cycle de pleurotes montre qu'il y a deux phases essentielles : La production du mycélium étant la phase préalable indispensable à la fructification qui est la seconde phase. La première condition pour la réussite d'une culture est d'assurer un développement optimal du mycélium. Les filaments mycéliens sont les « organes » du champignon capable d'utiliser le substrat nutritif (INRA, 1995).

***Composition :** Comme tous les champignons supérieurs, le pleurote contient beaucoup d'eau : 82% à 92%, des protéines 27% à 48%, de la matière sèche, des lipides 2% à 8%, des hydrates de carbone 60%, cendres 7% à 11%. La valeur énergétique pour 1kg de pleurote varie entre 250 et 350 calories. En outre le pleurote florida contient des vitamines B1, B2, C (KIYUKU, 1999 ; IRENGE, 2002).

***Cadre systématique :**

- Embranchement de septomycota
- Sous-embranchement de basidiomycotina
- Classe de basidiomycetes
- Sous-classe de hymenomycetidae
- Ordre des Agaricales
- Famille de Polyporaceae
- Genre Pleurotus
- Espèce : Pleurotus florida (DELMA, 1989).

b) Daucus carota (carotte)

***Composition :** De faible teneur calorifique (37 kcal pour 100g) la carotte est par contre riche en vitamines, en particulier en carotène, pigment rouge précurseur de la vitamine A. 100g de carotte contiennent 500mg de carotène ; 0,06mg de vitamine B1 ; 0,04mg de vitamine B2 ; 0,6mg de vitamine PP, 6mg de vitamine C. En outre la carotte contient 85,5% d'eau ; 0,9% de protéines ; 0,2% des lipides ; 12,5% de glucides (KALIMUNDA, 1995 ; CHISHUGI, 2000).

c) Zea mays (maïs)

***Composition :** Protides 2,3%, lipides 0,7%, glucides 21,5% (TAVERNIER ET LIZEAUX, 1996).

d) Solanum tuberosum (pomme de terre)

***Composition :** Eau 75%, amidon 21%, matière azotée 2,1% ; matière minérale 1,0% ; cellulose 0,7%, matière grasse 0,2% (KALIMUNDA, 1995).

e) Lait de vache

***Composition :** Graisses 4,7% ; protéines 3,2% ; lactose 4,7% ; calcium 0,1% ; énergie 75 cal/100g ainsi que des vitamines hydrosolubles (vitamines B1, B2, C) ; liposolubles (vitamines A, D, E, K) et de traces d'éléments minéraux (NDJANGU, 1988 ; KARIN & PAULINE, 1985).

f) Farine de soja

***Composition :** Protéines 5,7% ; lipides 2,4% ; matières hydrocarbonées 1,4% ; cendres 0,8% ; eau 89,7% ; minéraux 2,0% ; PH 3,52 ; chlorure 0,117% ; phosphates 0,66%.

g) *Lycopersicum esculentum* (tomate)

***Composition :** les baies rouges sont riches en vitamines C, A, B et K. Elles sont aussi riches en protéines avec quelque trace de matière minérale.

h) *Sorghum vulgare* (Sorgho)

***Composition :** Les graines sèches contiennent 8 à 15% de protéines, 2 à 5% des matières grasses ; 65 à 75 % de glucides et 3% de cellulose (VANDEPUT, 1981). Ce milieu a été utilisé comme substrat secondaire lors de la production du blanc final.

3.1.3 PRODUITS OU COMPOSES CHIMIQUES

Nous avons utilisé la chaux et le benlate sur les grains de sorgho, l'éthanol à 95% pour alimenter la lampe à alcool et l'Agar-agar pour la solidification des milieux.

3.2 LES METHODES

3.2.1 RÉALISATION DES MILIEUX

a. Préparation des milieux de culture : Les différents milieux de culture utilisés ont été préparés à base des ingrédients locaux. Pour la préparation, les formules suivantes ont été considérées.

- Pour la pomme de terre : 500g de pomme, 50g de sucre, 50g de poudre d'agar pour 1,5 litres d'eau distillée. L'extrait de pomme de terre, après chauffage jusqu'au ramollissement, ajoute à l'agar et du sucre a été chauffé légèrement puis mise en bouteille.
- Pour la tomate : 500g de tomates pesées et coupées en morceaux ont été chauffées pendant 45 minutes au réchaud. L'extrait, nous avons ajouté 15g de sucre, 20g d'Agar pour 1l d'eau distillée.
- Pour la carotte : 1kg de carottes coupées en morceaux et portées à l'ébullition pendant 45 minutes dans 1,5l d'eau distillée. Nous y avons soutiré un extrait de 500ml auquel nous avons ajouté 20g d'Agar et 15g de sucre. Puis chauffé légèrement pour liquéfier la poudre d'agar.
- Pour le lait : 300ml de lait de vache ont été ajoutés à 300ml d'eau distillée. On y ajoute également 20g d'Agar et 15g de sucre. Puis la solution a été chauffée légèrement.
- Pour le soja : 25g de farine de soja, 20g d'agar et 15g de sucre ont été mélangés dans 750ml d'eau distillée. Le chauffage a été arrêté avant l'ébullition de la solution.

b. Stérilisation des matériels et des milieux

Les matériels comme les boîtes de pétri, pinces et autres matériels en verre ou en métal étaient stérilisés à une température sèche dans le four pasteur. L'anse de platine était chaque fois flambée à la flamme de la lampe à alcool. Les mains étaient lavées au savon puis imbibées de l'éthanol ou de l'alcool dénaturé après séchage.

3.2.2 RÉCOLTE DES SPORES

Pour la récolte, nous avons pris des chapeaux murs et frais que nous avons déposés sur une plaque en verre propre ou sur un sachet blanc léger. Il peut tout de même être nécessaire d'humidifier le chapeau d'une goutte d'eau. En laissant reposer pendant une nuit nous avons recouverts des verres retournés pour empêcher la dessiccation. Il peut tout de même être nécessaire d'humidifier le chapeau d'une goutte d'eau. En laissant reposer pendant une nuit nous avons pu obtenir une

bonne empreinte des spores que nous avons alors rassemblées à l'aide d'une lame de rasoir un jour avant l'ensemencement (ROGER,1981).

3.2.3 ENSEMENCEMENT

Après coulage de milieux dans des boîtes de pétri, celles-ci étaient exposées à l'étuve pour la solidification de l'Agar et l'élimination de la buée formée sur le couvercle de la boîte.

L'ensemencement s'effectuait par le prélèvement d'une quantité non négligeable de la poudre de spores à l'aide de l'anse de platine. Toutes ces activités se faisaient dans une aire circulaire de 20cm de rayon autour de la lampe à alcool. Parfois nous étions obligés d'entourer cette aire des bougies pour accroître le champ aseptique autour du bec bunsen.

3.2.4 INCUBATION

Après l'activité précédente, les boîtes de petri ont été gardées dans une armoire dans le laboratoire. La température dans l'armoire variait entre 20 et 25⁰ C.

3.2.5 PRÉPARATION DU SUBSTRAT SECONDAIRE

Le substrat secondaire était préparé à partir des grains de sorgho. Les grains de sorgho étaient portés à l'ébullition pendant une durée variant entre 30 et 45 minutes ensemble avec 2 à 5% de chaux pour permettre au substrat un PH neutre ou légèrement alcalin, et le benlate, une substance fongicide capable d'éliminer des contaminants fongiques comme le trichoderma.

Après avoir porté à l'ébullition, ces grains étaient mis dans des sachets autoclaves ou dans des bocaux en verre. La stérilisation s'effectuait à l'autoclave à une température de 130⁰ C et une pression de 1,5 atmosphères pendant 30 minutes.

L'inoculation du blanc obtenu sur les grains intervient un jour après la stérilisation de ces derniers. Les sachets et les bocaux déjà inoculés étaient gardés dans l'armoire à la température ambiante.

4 LES RESULTATS

4.1 PRESENTATION DES RESULTATS

Après de nombreux essais expérimentaux d'ensemencement des spores se terminant par plusieurs échecs dus aux contaminants et à la température, nous sommes parvenus avant de multiplier les filaments sur tous les milieux préparés, à faire germer les spores sauf sur le milieu à base de carottes qui a fait apparaître une sorte de voile à la surface de la boîte de petri donnant des taches qui nous sont inconnues.

Les milieux de pomme de terre, de tomate et soja ont enfin produit beaucoup des filaments mycéliens avec un feutrage envahissant une surface considérable dans la boîte de petri après une incubation allant de 2 à 6 jours à une température de 25⁰ C à l'étuve. Le milieu à base de lait montrait moins de feutrage touffu et peu flasque.

Les filaments mycéliens obtenus de spores ont été repiqués plusieurs fois sur tous les milieux afin d'obtenir des filaments isolés des contaminants et une grande quantité de semence du blanc mère à inoculer sur grains. Tous les milieux sans exception ont été favorables à la colonisation de ces filaments à des différentes vitesses.

4.2 ETABLISSEMENT DU TABLEAU ET DE GRAPHIQUE

Après la colonisation des différents milieux par le feutrage filamenteux, nous nous sommes donné l'audace de calculer la vitesse de croissance du mycélium sur ces milieux.

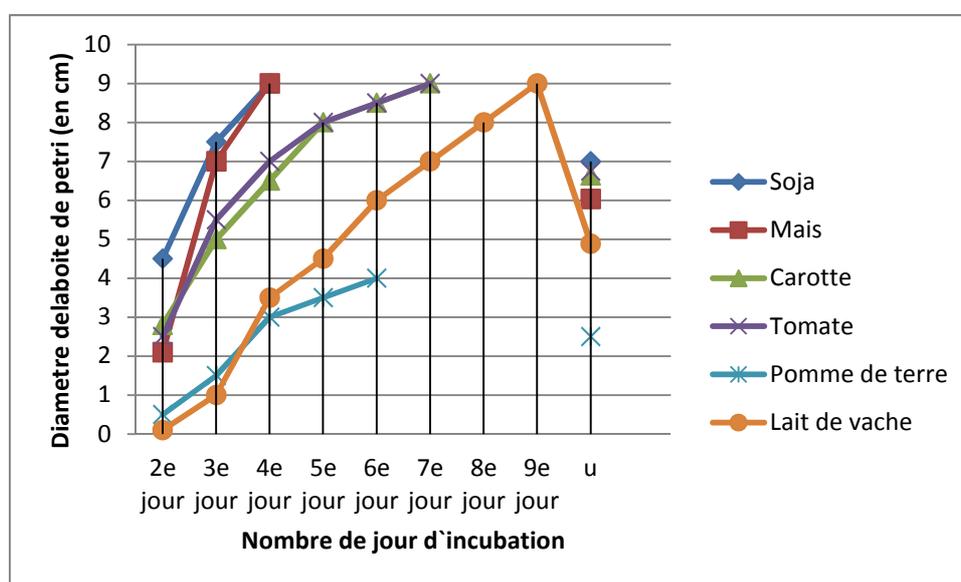
De ce fait, nous avons introduit une quantité presque égale de filament mycélien dans chaque boîte de petri contenant un milieu bien déterminé. Au bout de deux jours, nous sommes passés au mesurage du diamètre du cercle ou de la circonférence produit l'envahissement mycélien sur ce milieu. Ce mesurage s'effectuait par une latte de 15 cm.

Le tableau suivant a été élaboré progressivement à la prise de mesure pour chaque milieu depuis le deuxième jour après l'ensemencement jusqu'à l'arrêt de la croissance ou jusqu'au remplissage de la surface de la boîte de petri par les filaments mycéliens.

Tableau : Résultat de la croissance mycélienne sur différents milieux

MILIEU \ JOUR	2 ^e jour	3 ^e jour	4 ^e jour	5 ^e jour	6 ^e jour	7 ^e jour	8 ^e jour	9 ^e jour
M1 : SOJA	4,5 cm	7,5 cm	9 cm					
M2 : MAIS	2,1cm	7 cm	9 cm					
M3 : CAROTTE	2,8 cm	5 cm	6,5 cm	8cm	8,5 cm	9 cm		
M4 : TOMATE	2,5 cm	5,5 cm	7 cm	8 cm	8,5 cm	9 cm		
M5 : POMME DE TERRE	0,5 cm	1,5 cm	3 cm	3,5 cm	4 cm			
M6 : LAIT DE VACHE	0.1 cm	1 cm	3,5 cm	4,5 cm	6 cm	7 cm	8 cm	9 cm

Le remplissage de la boîte de petri se réalisait chaque fois que le diamètre atteignait 9 cm qui correspond au diamètre de la boîte. Les données présentées dans le tableau nous ont permis d'élaborer le graphique de vitesse ci-dessous.



Graphique espace-temps: montrant les courbes de la croissance mycélienne sur les six milieux à base d'ingrédients locaux

4.3 INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats de nos expériences montrent que le feutrage se développe normalement sur les différents milieux à partir des spores, en germant, sauf le milieu à base de carottes ou les spores avaient difficile à produire des filaments. Par contre, l'ensemencement des filaments sur ce milieu à base de carotte, ces derniers se développent très vigoureusement.

La vitesse moyenne de croissance est de 7 cm/jour pour le soja, 6.03 cm/jour pour le maïs, 6,63 cm/jour pour la carotte, 6.75 cm/jour pour la tomate, 2.5 cm/jour pour la pomme de terre, 4.88 cm/jour.

Par curiosité scientifique nous nous sommes décidés à pousser les pensées un peu loin et chercher à déterminer quel pourrait être le milieu le plus compatible de ces milieux ou quel est le meilleur milieu à la croissance mycélienne à partir de la vitesse de croissance.

Pour vérifier cela, nous sommes passés au mesurage du diamètre du cercle forme dans la boîte de petri lors de la colonisation de chaque milieu par les filaments. Le remplissage de la boîte de petri contenant le milieu à base de soja et de maïs (C a d 9 cm) a eu lieu le 4^e jour après ensemencement. Ce diamètre de 9 cm a été atteint le 7^e jour par les milieux à base de tomate et de carotte ; Par contre, pour le milieu à base de lait, ce diamètre est atteint le 9^e jour. Quant au milieu à base de pomme de terre la croissance s'est arrêtée le 6^e jour.

Nous estimons que le milieu à base de soja, de maïs, de tomate et de carotte sont les meilleurs milieux vis-à-vis de leur vitesse de croissance (le milieu à base de soja et de maïs) et de la vitesse moyenne de croissance la plus élevée (milieu de soja, de tomate et de carotte). Mais le milieu de soja reste le plus performant de tous de par la vigueur du feutrage mycélien qui s'y développe, suivi du milieu de tomate. Cette vigueur s'explique par la présence d'une couche abondante des filaments mycéliens.

Nous ne nous sommes pas attardés sur le milieu de pomme de terre pour savoir ce qui a été à la base de l'arrêt de croissance. Mais nous nous permettons d'émettre deux hypothèses : la première pourrait être suite à la diminution de la température dans la cellule d'incubation ; la deuxième, cet arrêt pourrait être dû à l'apparition sur ce milieu dans la partie non colonisée, d'une sorte de voile blanchâtre qui traduirait peut-être une altération du milieu ou une susceptibilité d'une contamination par ce milieu.

Ainsi, nous avons estimé que nos différents milieux ont donné des résultats ou de réponses positives à nos hypothèses émises dans la partie introductive. Tous ces milieux ont produit des filaments mycéliens après ensemencement, des spores, sur le milieu à base de carotte. La seule différence est que la durée d'incubation ou la durée entre l'ensemencement des spores et l'apparition des filaments varie d'un milieu à l'autre et c'est entre deux et quatre jours.

Vu le comportement des spores vis-à-vis du milieu à base de carotte, nous avons estimé que ce milieu pourrait servir aux différents repiquages des filaments mycéliens lors du processus de multiplication du mycélium.

La dernière étape de nos expériences consistait à inoculer la semence ou les filaments qui est le résultat obtenu après l'ensemencement des spores sur les grains de sorgho qu'on peut appeler substrat secondaire. Au bout de 4 ou 5 jours, le substrat sera colonisé par les filaments et plus tard on obtiendra la semence principale ou le blanc final qu'on peut inoculer sur d'autres comme les rafles de maïs, la paille et d'autres pour la culture des champignons. L'aboutissement au bon résultat de ce stade nous a permis d'atteindre la finalité de ce travail qui était celle de la production du mycélium ou blanc final à partir de spores.

5 CONCLUSION

Ce travail consistait à produire et à multiplier le mycélium à partir des spores du champignon *Pleurotus florida* sur des milieux préparés à base des ingrédients locaux coûtant moins chers que ceux importés afin de déduire et de décider l'usage de ces milieux comme étant capables de remplacer ces milieux importés dans la myciculture et de déterminer le meilleur ingrédient local pour cette activité. Les résultats obtenus nous ont permis de trouver des réponses à nos hypothèses et de conclure que :

- Les spores de *Pleurotus florida*, prétendues par certains auteurs comme étant difficiles à manipuler pour la fabrication du blanc ne sont pas seulement adaptées aux milieux importés et coûtant cher, mais aussi elles peuvent développer des filaments mycéliens sur des milieux préparés à base des ingrédients locaux.
- Ces milieux à base des ingrédients locaux se sont montrés très propices à la colonisation mycélienne à partir des spores. Le milieu à base de lait, malgré sa lente colonisation remarquée, reste le milieu très favorable par sélectivité qui délimite le développement des contaminants concurrents.

Nous n'avons pas trouvé un solidifiant local pouvant remplacer l'Agar-agar, ni même traiter tous les aspects ayant trait avec ce sujet comme faire des essais avec les spores d'*Agaricus campestris*, ou essayer tous les ingrédients locaux.

REFERENCES

- [1] OEI, P.1991, La culture des champignons, Ed. du ministère Français de la coopération du C.T.A 319 PAGES, en deux exemplaires A et B.
- [2] VERFALLIE, M.1983, Mon savoureux petit coin aux champignons. Manuel de culture du champignoniste amateur. 2^e Ed.SL. 163 pages.
- [3] I.N.R.A 1995, Dossier pleurote, 11^e Ed. CEDEX France. 350 pages.
- [4] DELMA, J. 1989, Les champignons et leur culture. La culture actuelle et potentielle des champignons supérieurs. La Maison rustique. Ed. Flammarion, Paris 969 pages.
- [5] NDJANGU, C et alii, 1988 << IV journée scientifique du CERPRU consacrées au manioc >> cahier du CERPRU. N^o5 Bukavu.
- [6] KARIN. R et PAULINE, E.1985. La préparation de laitages, Ed. Wageningen. Pays-Bas. 91 pages.
- [7] ROGER, P. 1981. Les champignons, Ed. solar. 550 pages.
- [8] TAVERNIER, R/ LIZEAUX, C, 1996. Sciences de la vie et de la terre, Ed. Bordas 6^e 191 pages.

- [9] VANDENPUT, R, 1981. Les principales cultures en Afrique centrale, Ed. A.G.C.D 1050 Bruxelles 1095 pages.
- [10] KITUKU, P. 1999, Deuxième stage de formation sur les champignons, Ed. Réseau mycicole des Grands-Lacs, Bujumbura. 73 pages
- [11] KALIMUNDA, M, 1995. Essai de préparation des milieux de culture a base des ingrédients locaux et étude comparative de la croissance des germes du lait, de l'eau et de l'urine avec les milieux de culture usuels. Mémoire.
- [12] CHISHUGI, B.2000. Essai de préparation de milieux de culture pour la levure *saccharomyces cereviciae* à base d'ingrédients locaux et étude comparative du rendement de production par rapport aux milieux usuels. Mémoire.
- [13] IRENGE, K. 2002. Etude comparative des rendements de trois souches de pleurotus (cas de Hk7, Hk51 et pleurotus florida) culture sur les rafles de maïs, paille de sansevière, paille de chaume et leur mélange. Mémoire.
- [14] CIRIMWAMI.2000, Session de formation sur la culture des champignons tenue à Bandari du 27 au 28 mars 2000. 10 pages.